



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อป้องกันเชื้อชาติปดัส
ที่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมเพื่ออุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ

โดย รศ.ดร. สมศักดิ์ อภิสัทธาวิช

เมษายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อป้องกันเชื้อไวรัส
ที่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมเพื่ออุตสาหกรรมเชื้อกระดาษ

ผู้วิจัย

สังกัด

รศ.ดร. สมศักดิ์ อภิสัทธาวิช คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์

ชุดโครงการวิจัย “ การพัฒนาอุตสาหกรรมไม้และเชื้อ ”

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1	บทนำ
1.1	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา
1.2	วัตถุประสงค์ของการทดลอง
1.3	ข้อจำกัดของงานวิจัย
1.4	ผลที่คาดว่าจะได้รับ
1.5	การนำผลงานไปใช้ประโยชน์
บทที่ 2	เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2.1	ยูคาลิปตัสคามาลูเลนซิส
2.2	การใช้ประโยชน์ของยูคาลิปตัสคามาลูเลนซิส
2.3	ดินแคลเซียมสูง
2.4	การขาดธาตุอาหารของพืชในดินที่มีแคลเซียม
2.5	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเครื่องหมายดีเอ็นเอ
2.6	ชนิดของลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเครื่องหมายดีเอ็นเอ
2.7	ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
2.8	Amplified fragment length polymorphism
2.9	Sequence related amplified polymorphism
บทที่ 3	วิธีการดำเนินงานวิจัย
3.1	การทดลอง
3.2	วัสดุ สารเคมี และครุภัณฑ์
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิจารณ์
4.1	การทดสอบยูคาลิปตัสในสภาพปลอดเชื้อเพื่อทดสอบความเครียดในสภาพที่มีแคลเซียมสูง
4.2	การทดสอบยูคาลิปตัสในสภาพดินธรรมชาติ 3 ชนิด
4.3	การสกัดดีเอ็นเอ
4.4	การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP
4.5	การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP
4.6	ผลการวิเคราะห์ดิน และ การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากยีนที่จำเพาะ
4.7	วิจารณ์ผลการทดลอง
4.8	สรุป
หนังสืออ้างอิง	

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่1	ยูคาลิปตัสที่ได้เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสูตร MS6 ที่เติม BAP 500 ppm และน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์เพื่อชักนำให้เกิดยอดหลายยอด	27
ภาพที่2	ยูคาลิปตัสโคลน วน2 ในอาหารที่ไม่มี CaCO_3 (แถวที่1) และ ในอาหารที่มี CaCO_3 (แถวที่2)	28
ภาพที่3	ยูคาลิปตัสโคลน P7 ในอาหารที่ไม่มี CaCO_3 (แถวที่1) และในอาหารที่มี CaCO_3 (แถวที่2)	28
ภาพที่4	ยูคาลิปตัสโคลน CT76 ในอาหารที่ไม่มี CaCO_3 (แถวที่1) และในอาหารที่มี CaCO_3 (แถวที่2)	29
ภาพที่5	แถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบยูคาลิปตัส (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder)	31
ภาพที่6	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ SRAP ในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ 32 ทน และไม่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ C1-D1, C2-D2, C3-D3, C4-D4, C5-D5, C6-D6, C7-D7, C8-D8, C8-D1, C7-D2 ตามลำดับ	32
ภาพที่7	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ SRAP ในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทน และไม่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ C6-D3, C5-D4, C3-D6, C2-D7, C1-D8, C2-D1, C3-D1, C1-D2, C2-D3, C5-D2 ตามลำดับ	33
ภาพที่8	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ SRAP ในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทน และไม่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ C4-D5, C3-D2, C1-D3, C6-D2, C5-D3, C7-D3, C6-D4, C7-D4, C1-D7, C2-D8 ตามลำดับ	34
ภาพที่9	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ AFLP ในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทน และไม่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ M-CAC/E-AAC, M-CAG/E-AAC, M-CTA/E-AAC, M-CTC/E-AAC, M-CAT/E-AAG, M-CTT/E-AAG, M-CAA/E-AAG ตามลำดับ	36
ภาพที่10	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ AFLP ในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทน และไม่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ M-CTA/E-ACA, M-CAA/E-ACC, M-CAA/E-ACG, M-CTC/E-ACG, M-CAT/E-AGC, M-CAC/E-AGG, M-CAT/E-AGG, M-CTC/E-AGG ตามลำดับ	37
ภาพที่11	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ AFLP ในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทน และไม่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ M-CTG/E-AGG, M-CTT/E-AAC, M-CAT/E-AAC, M-CAA/E-AAC, M-CTC/E-AAG, M-CTA/E-AAG, M-CAC/E-AAG, M-CAG/E-AAG, M-CTC/E-ACT, M-CTA/E-ACG, M-CAC/E-ACT, M-CAA/E-ACG, M-CTC/E-AGC, M-CTG/E-AGC ตามลำดับ	38

		หน้า
ภาพที่12	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>ZIP1</i> ของ <i>Arabidopsis thaliana</i> ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank	39
ภาพที่13	ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน <i>ZIP1</i> โดยใช้อุณหภูมิในการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต่างๆ กัน ได้แก่ 55, 55.9, 57.8, 59.3, 61.0, 62.7, 68.9 และ 70 องศาเซลเซียสตามลำดับ	41
ภาพที่14	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>ZIP4</i> ของ <i>Arabidopsis thaliana</i> ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank	42
ภาพที่15	ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน <i>ZIP4</i> โดยใช้อุณหภูมิในการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต่างๆ กัน ได้แก่ 55, 55.9, 57.8, 59.3, 61.0, 62.7, 68.9 และ 70 องศาเซลเซียสตามลำดับ	42
ภาพที่16	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>NRAMP1</i> ของ <i>Arabidopsis thaliana</i> ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank	43
ภาพที่17	ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน <i>NRAMP1</i> โดยใช้อุณหภูมิการจับคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต่างๆ กัน ได้แก่ 53, 56 และ 59 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส	44
ภาพที่18	ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน <i>NRAMP1</i> โดยใช้อุณหภูมิการจับคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอที่ 59 องศาเซลเซียสโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลโพลีอะคริลลาไมด์	44
ภาพที่19	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>IRT1</i> ของ <i>Arabidopsis thaliana</i> ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank	45
ภาพที่20	ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน <i>IRT1</i> โดยใช้อุณหภูมิในการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต่างๆ กัน ได้แก่ 51, 53, 54, 55.2, 57 และ 58 องศาเซลเซียสตามลำดับ	45
ภาพที่21	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>YsI</i> ของ <i>Zea mays</i> ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank	47
ภาพที่22	ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน <i>YsI</i>	48
ภาพที่23	แสดงผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบสและใช้อุณหภูมิในการจับกันระหว่างดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ต่างๆ กัน ได้แก่ 55, 56.3, 59.2, 61.4, 63.9 และ 66.7 องศาเซลเซียสตามลำดับ	49
ภาพที่24	ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบสเป็นครั้งที่สอง	49

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่1	ค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร	29
ตารางที่2	ความทนทานต่อดินร่วนต่างๆ ของยูคาลิปตัส 23 สายพันธุ์	30
ตารางที่3	ผลการวิเคราะห์ดินทั้ง 3 ชนิด	40

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัย และเงินวิจัย ขอขอบคุณฝ่ายอุตสาหกรรม (ฝ่าย 5) ที่กระตุ้นให้เกิดแนวความคิดในการวิจัยครั้งนี้ และทำหน้าที่เป็นผู้ประสานโครงการวิจัยที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณบริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด สำหรับโจทย์ปัญหาของการคิดโครงการวิจัย ความอนุเคราะห์เงินวิจัย ตัวอย่างพืชและดินที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ต่างๆ สำหรับทำวิจัย ขอขอบคุณที่ปรึกษาโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. สมกิต สิริพัฒน์ดิลก ผู้ให้ความคิด และแลกเปลี่ยนความคิดเห็นในงานวิจัย ตัวอย่างพืช และกำลังใจตลอดมา และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยที่เปรียบเสมือนแขน ขา ที่ทำให้งานวิจัยนี้ดำเนินไปด้วยดี

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ (Project Title)

- (ไทย) : การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อป้องกันเชื้อราที่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมเพื่ออุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ
- (อังกฤษ) : DNA marker development for tolerant/sensitive eucalypt clone detection on calcareous soil

ชื่อหัวหน้าโครงการ (Principal Investigator)

- ชื่อ-สกุล : รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช
- ที่อยู่ : ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
- โทรศัพท์ : 0-29428716-7 โทรสาร 0-25795528
- E-mail Address fscissa@ku.ac.th

ผู้ประกอบการที่ร่วมโครงการ (Co-investigator)

- บริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด
- ที่อยู่ : 99 หมู่ 6 ถนนแสงชูโต (สายเก่า) ต. วังศาลา อ. ท่าม่วง กาญจนบุรี 71130
- โทรศัพท์ : 034-615000-20 โทรสาร 034-615079

ระยะเวลาดำเนินการ (Duration)

12 เดือน

วัตถุประสงค์ (Specific Objective)

- เพื่อทดสอบความเครียดของยูคาลิปตัสในสภาพที่มีแคลเซียมสูง
- เพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อความทนทานสภาพที่มีแคลเซียมสูง
- สังเคราะห์ไพรเมอร์ดีเอ็นเอเพื่อใช้สำหรับตรวจสอบยูคาลิปตัสที่ทนทาน/อ่อนแอต่อสภาพแคลเซียมสูงด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง (Background and Rationale)

ยูคาลิปตัสเป็นไม้ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมเยื่อกระดาษของประเทศไทย ในอดีต

ยูคาลิปตัสได้รับการกล่าวขานว่าสามารถเจริญเติบโตในสภาพดินเสื่อมโทรมหรือดินเลว ในภาคตะวันตกของประเทศไทยยูคาลิปตัสที่ปลูกในดินที่มีแคลเซียมสูงมักจะตายหลังจากปลูกได้ 2-3 ปี ก่อให้เกิดผลกระทบต่อวัตถุดิบในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและไม้ ตลอดจนรายได้ในภาคเกษตรกรรมก็ลดลงด้วย

ผลการดำเนินงาน

บรรลุตามวัตถุประสงค์

การนำผลงานไปใช้ (Implementation)

1. ในการทดลองที่ใช้โคลนยูคาลิปตัสจากทางบริษัทพบว่า ผลการวิจัยสามารถบ่งบอกโคลนที่มีความทนทานและอ่อนแอต่อดินที่มีแคลเซียมสูง และสามารถนำไปใช้ได้ในระดับหนึ่ง โดยปัจจุบันบริษัทได้มีการผลิตโคลนที่ตรวจสอบแล้วว่าทนทานต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูงบางโคลนแก่เกษตรกร
2. เครื่องหมายดีเอ็นเอนี้สามารถตรวจสอบยูคาลิปตัสที่ทนทาน/อ่อนแอต่อสภาพที่มีแคลเซียมสูงได้ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ซึ่งใช้เวลารวดเร็ว (1-2 วัน) และสามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่ระยะที่เป็นต้นกล้า

Executive Summary

Project Title

DNA marker development for tolerant/sensitive eucalypt clone detection on calcarious soil

Principal Investigator

Mr. Somsak APISITWANICH, Associate Professor, Dr.Agr.Sci.

Dept. of Genetics, Fac. of Science, Kasetsart University

Tel. 0-29428716-7, Fax. 0-5795528

Co-investigator

The Siam Forestry Co., Ltd.

99 Moo 6, Saeng Xuto Rd., Wangsala, Tha Muang, Kanchanaburi 71130

Tel. 034-615000-20 Fax. 034-615079

Duration

12 Months

Specific Objectives

1. To test the stress of eucalypt in calcarious condition.
2. To find out DNA markers which are specific to calcarious tolerance.
3. To design and synthesize DNA primer for calcarious tolerant eucalypt clone detection using PCR (polymerase chain reaction).

Background and Rationale

Eucalypts are important trees for paper pulping in Thailand. In the past, it was said that eucalypts could grow on any poor or worse soil. In the western part of Thailand, plenty of eucalypts are died after 2-3 years planted in the calcarious soil. This decreases not only raw materials for paper pulp and wood industries but also income of agricultural sector.

Result of This Project

Acchieved as purposed.

Implementation

1. Result of this project detected the tolerant and sensitive eucalypt clones for calcareous soil. Primarily, the Siam Forestry Co., Ltd. has produced some tolerant clones which used in this project for farmers.

2. These DNA markers can use to detect the eucalypts for tolerant and susceptible clone to calcareous soil in seedling stage using PCR technique. It takes 1-2 days for the result.

บทคัดย่อ

การทดสอบยอคยูคาลิปตัส 3 โคลน ได้แก่ วน2, CT76 และ P7 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS6 ที่เติม BAP 500 ppm น้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ และ CaCO_3 ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300 และ 400 mM เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า CaCO_3 ความเข้มข้น 400 mM สามารถชักนำให้พืชแสดงอาการเครียด เกิดสารสีแดงขึ้นทั้งลำต้น และใบ ยูคาลิปตัสโคลน CT76 แสดงอาการเครียดน้อยที่สุด เมื่อตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ ascorbate peroxidase พบว่า ยูคาลิปตัสโคลน วน2, P7 และ CT76 มีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น 2.98, 6.60 และ 12.57 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อทดสอบยูคาลิปตัสจำนวน 23 โคลนในดินที่มีแคลเซียมสูง พบว่าพันธุ์ที่ทนทาน ได้แก่ CT76, CT395, CT397 และ SF8 เมื่อสกัดดีเอ็นเอและรวมดีเอ็นเอของโคลนที่ทนทานเข้าด้วยกัน และดีเอ็นเอของโคลนที่อ่อนแอเข้าด้วยกัน หลังจากนั้นสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ SRAP และ AFLP เพื่อหาเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอทั้ง 2 กลุ่มได้จำนวน 4 คู่ แต่เมื่อตรวจสอบตัวอย่างแต่ละตัวอย่างแยกกัน พบว่าแสดงความแตกต่างไม่ชัดเจน จึงหันมาศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับอาการ chlorosis และธาตุอาหาร พบว่าในสภาพดินที่มีแคลเซียมสูงนั้นทำให้พืชประสบปัญหาในการนำหรือขนส่งธาตุแมงกานีส และเหล็ก ยีนที่เกี่ยวข้องคือ *NRAMP1* และ *Ys1* และยีน *Ys1* น่าจะมีบทบาทสูงกว่ายีน *NRAMP1* ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอ *NRAMP1* และ *Ys1* จึงควรเป็นเครื่องหมายที่สามารถใช้คัดเลือกยูคาลิปตัสที่ทนทานต่อดินที่มีแคลเซียมสูง

ABSTRACT

The experiment of shoot tips of 3 eucalypt clones, FT2, CT76 and P7, on synthetic MS6 media supplemented with 500 ppm of BAP, 20 percent of coconut water and various concentration of CaCO_3 for 1 month found that the concentration of 400 mM CaCO_3 could induce stress in eucalypt's shoots by expression of red color on leaves and stems. The CT76 clone got the least stress. Measurement of ascorbate peroxidase quantity of those 3 clones on the stress condition showed that FT2, CT76 and P7 could increase enzyme producing for 2.98, 6.60 and 12.57 percent, respectively. For plant tolerant/sensitive in calcareous soil testing, the clones of CT76, CT395, CT397 and SF8 were observed. All 23 plant DNAs were extracted and either tolerant DNAs or sensitive ones were pooled separately then DNA fingerprinting were performed according to SRAP and AFLP protocols. DNA fingerprints of four primer pairs showed polymorphic bands between tolerant and sensitive group. After doing individual DNA fingerprint, result was not clear cut according to semitolerant and semisensitive clones. Because of this reason, the research was focused on genes caused chlorosis symptom on plant and metal minor elements. The *NRAMP1* produces protein transferring Mn^{2+} from root to stem and *Ys1* producing protein for Fe^{2+} channel showed interesting results. The expression of *Ys1* should be higher than *NRAMP1*. Both DNA marker, RAMP1 and Ys1 should be useful for detection the eucalypt clones for calcareous soil.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พื้นที่ปลูกยูคาลิปตัสในประเทศไทยที่มีความผันแปรในความอุดมสมบูรณ์และความเป็นกรด-ด่าง การคัดเลือกโคลน (clone) หรือสายพันธุ์ (strain) ให้มีความเหมาะสมต่อพื้นที่ปลูกจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อให้ได้ผลผลิต ภาคตะวันตกของประเทศไทยโดยเฉพาะบริเวณรอยต่อกับประเทศพม่าเป็นแนวเทือกเขาตะนาวศรีซึ่งเป็นเขาหินปูน ดังนั้นจึงมักพบหินปูนปะปนอยู่กับดินในภาคนี้ของประเทศ หินปูนเมื่อได้รับน้ำจะเกิดปฏิกิริยา ionization ก็จะได้ Ca^{2+} และ CO_3^{2-} และอาจรวมตัวกับ OH^- จากน้ำ ทำให้เกิดเป็นเกลือของเบส จึงทำให้ pH ของดินสูงขึ้น หรือ H^+ รวมกับ Na^+ เป็น NaHCO_3 ซึ่งอาจทำให้ pH ของดินเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

อย่างไรก็ตามในสภาพที่ดินมี Ca^{2+} Ca^{2+} ที่มากเกินไปจะไปรวมกับออลอนลบจากแร่ธาตุต่างๆในดิน เกิดโครงสร้างแข็งซ้อนขึ้น ทำให้ความสมดุลของดินเปลี่ยนไป พืชจึงไม่สามารถดูดแร่ธาตุอาหารบางชนิดจากดินมาใช้ได้ และมีผลกระทบต่อการทำงานหรือสรีรวิทยา พืชจึงแสดงอาการขาดธาตุอาหารหรืออ่อนแอ และถูกโรคหรือแมลงแทรกซ้อน และในที่สุดก็จะตายได้ พืชแต่ละชนิดจะมีความสามารถหรือทนต่อสภาพแวดล้อมได้แตกต่างกันอันเนื่องมาจากยีนหรือพันธุกรรมของพืชนั้นๆ

ยูคาลิปตัสเป็นไม้เศรษฐกิจที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมเยื่อกระดาษของประเทศไทยในสภาพที่พื้นที่ปลูกในภาคตะวันตกที่มีหินปูนอยู่ปะปน จึงสมควรที่จะต้องมีการคัดเลือกโคลนและ/หรือพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพดังกล่าว เพื่อให้ยูคาลิปตัสสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตที่เหมาะสม

ดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตมีความเป็นเอกลักษณ์ สามารถตรวจสอบและติดตามได้ในทุกที่และไม่ผันแปรตามสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ดีเอ็นเอยังทำหน้าที่เป็นยีน โดยมีการสร้าง mRNA และได้แปลผลเป็นโปรตีน หรือรวมกับสารเคมีอื่นเกิดเป็นลักษณะ (phenotype) ที่ปรากฏให้เห็น จากเหตุผลดังกล่าวถ้าสามารถทราบเครื่องหมายดีเอ็นเอหรือทรานส์คริปต์ที่เกี่ยวข้องกับการทนทานต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมปนอยู่ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือก โคลน/พันธุ์ ยูคาลิปตัสก่อนที่จะส่งเสริมหรือปลูกในสภาพแปลงที่มีพื้นที่มาก

ออลอนของแคลเซียม (Ca^{2+}) สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ในสภาพที่เกิดความเครียดต่างๆในต้นพืชได้เช่น Erlandson และ Jensen (1989) ติดตาม $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ที่เติมลงในอาหารเพื่อเลี้ยงข้าวสาลี (winter wheat) ในสภาพอุณหภูมิ 20°C พบว่าสภาพอุณหภูมิต่ำจะทำให้เกิดการสะสมแคลเซียมในต้นพืชสูงกว่าปกติ Cramer และ Jones (1996) ทดลองใน *Arabidopsis* ในสภาพความเค็มที่เติม NaCl โดยการติดตามสี fura-2 ที่มีความไวต่อแคลเซียม พบว่าระดับแคลเซียมใน cytosol นั้นลดลง Prill และคณะ (1994) พบว่า oxidative stress เป็นสาเหตุที่ทำให้ Ca^{2+} ใน cytosol เปลี่ยนแปลง H_2O_2 ความเข้มข้น 10 mM ทำให้แคลเซียมภายในเซลล์ของยาสูบนั้นออกมานอกเซลล์ สาร lanthanum และ ruthenium red สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของ H_2O_2 ได้ Gong และคณะ (1998) และ Knight และคณะ (1991) พบว่าความร้อน (heat shock) จะทำให้การดูด Ca^{2+} เข้าสู่ต้นยาสูบเกิดได้รวดเร็วขึ้น แต่เมื่อ pretreat ด้วย EGTA (ethylene glycol bis-(β -aminoethylether)N,N,N,N'-tetraacetic acid) จะช่วยให้การดูด Ca^{2+}

เกิดขึ้นอย่างช้าๆ ในทำนองเดียวกันความร้อนทำให้เซลล์แขวนลอยของแพร์และโปรโตพลาสต์ของแพร์และถั่ว
ลันเตาคูด Ca^{2+} เข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น (Klein และ Ferguson, 1987)

เครื่องหมายโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอสามารถใช้ร่วมกับการศึกษาอนุกรมวิธาน ความสัมพันธ์
ทางพันธุกรรม การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งจะทำให้การศึกษาดังกล่าวมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น (Weising
และคณะ, 1995) William และคณะ (1990) พบเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้
ไพรเมอร์ที่มีขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ในการทำ PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนต่างๆ ในยีนอม เทคนิคนี้มีข้อดี คือ
ทำได้สะดวก ง่าย รวดเร็ว ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากพอสมควร (ประมาณ 10-15 แถบ) แต่มีความไวต่อสภาพการ
ทดลอง ทำให้แถบดีเอ็นเอบางแถบเปลี่ยนไปจากเดิม restriction fragment length polymorphism (RFLP) เป็นการ
ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอของยีนอมและใช้โพรบไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอที่ถูกตัดในส่วนที่ต้องการซึ่งเรียกว่า
Southern hybridization เทคนิคนี้ทำซ้ำแล้วได้ผลเหมือนเดิม แต่มีข้อด้อยคือ ดีเอ็นเอที่ใช้ต้องมีปริมาณมาก ใช้
เวลามาก และผู้ปฏิบัติต้องมีความชำนาญมาก (Weising และ Kahl, 1997) Tautz (1989) ใช้ไพรเมอร์ที่สามารถ
เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนอมในส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันไม่มากด้วยการเพิ่มแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR
ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า simple sequence repeat (SSR)

Vos และคณะ (1995) พบเทคนิคการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยประยุกต์จากเทคนิค RFLP และ RAPD
และเรียกเทคนิคนี้ว่า amplified fragment length polymorphism (AFLP) เทคนิคนี้กระทำโดยการตัดดีเอ็นเอจากยีน
โนมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด และต่อขึ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย adapter ซึ่งมีทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับ
เอนไซม์ตัดจำเพาะ และลำดับของนิวคลีโอไทด์สุ่ม หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR เทคนิคนี้สามารถให้
แถบดีเอ็นเอซึ่งมากกว่า RAPD ประมาณ 10 เท่า ทำให้สามารถตรวจสอบ polymorphism ได้ง่าย เทคนิคลายพิมพ์
ดีเอ็นเอต่างๆ สามารถนำมาใช้สร้างแผนที่ยีน เช่น Vaneck และคณะ (1995) ใช้เทคนิค RFLP ไอโซไซม์ และ
AFLP เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลบนแผนที่ยีนของข้าวบาร์เลย์ Mackill และคณะ (1996) ทำแผนที่ยีนของข้าว
ด้วยเทคนิค AFLP Wang และคณะ (1997) ทำแผนที่ยีนของแตงแคนตาลูปด้วย AFLP RAPD และ SSR ส่วน การ
ใช้ประโยชน์จากเครื่องหมายโมเลกุล เช่น Meksem (1995) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีน *Ri* ในการ
ตรวจสอบมันฝรั่งที่ต้านทานต่อเชื้อ *Phytophthora infestans* Ballova และคณะ (1995) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วย
ในการหาตำแหน่งยีน *GroI* ซึ่งเป็นยีนต้านทานต่อ root cyst nematode (*Globodera rostochiensis*) ของมันฝรั่งซึ่ง
พบว่ายูบูนโครโมโซมแท่งที่ 7 Pakniyat และคณะ (1997) พบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะทนเค็ม
ในข้าวบาร์เลย์ หรือใช้คัดเลือกมันสำปะหลังที่ต้านทานต่อโรคราไหม้ (bacterial blight) (Sanchez และคณะ,
1999)

1.2 วัตถุประสงค์การทดลอง

- 1.2.1 ทดสอบหาลักษณะของการทนต่อแคลเซียมที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึม หรือ เมทาบอลิซึม
- 1.2.2 เพื่อหาดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความจำเพาะต่อการทนทานในสภาพดินที่มีหินปูน
- 1.2.3 ออกแบบและสังเคราะห์ดีเอ็นเอไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อการ
ตรวจสอบยาลิปดัสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction)

1.3 ข้อย้ำสำคัญของงานวิจัย

การเจริญเติบโตและความอยู่รอดของยูคาลิปตัสในสภาพดินที่มีแคลเซียมเกิดจากปัจจัยหลายปัจจัย ทั้งปัจจัยที่เป็นสิ่งมีชีวิต (biotic) และปัจจัยที่ไม่มีชีวิต (abiotic)

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1. ทราบดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสชนิดที่ใช้ในการวิจัยในโครงการว่าทนต่อสภาพที่มีแคลเซียมหรือไม่
- 1.4.2. ทราบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สามารถบ่งบอกความจำเพาะต่อการทนทานดินที่มีแคลเซียม
- 1.4.3. ทราบไพรเมอร์ที่สามารถใช้ตรวจสอบยูคาลิปตัสที่ทนทาน / ไม่ทนทานต่อสภาพดินที่มีหินปูน

1.5 การนำผลงานไปใช้ ประโยชน์

1. สามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอไปใช้ตรวจสอบยูคาลิปตัสก่อนที่จะทำการขยายให้เกษตรกรปลูก ในสภาพดินที่มีหินปูนเพื่อป้องกันการเกิดปัญหาที่จะตามมา
2. สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีดีเอ็นเอนี้ไปยังบริษัทเอกชนต่างๆ

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

2.1 ยูคาลิปตัสคามาลดูลเลนซิส

ยูคาลิปตัสคามาลดูลเลนซิส (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.) มีชื่อพ้องคือ *E. rostrata* Schlecht มีชื่อสามัญคือ red gum, red river gum, Murra red gum และ river gum เป็นไม้ยืนต้นที่อยู่ในหมวด (division) Magnoliophyta ชั้น (order) Myrtales วงศ์ (family) Myrtaceae สกุล (genus) *Eucalyptus* สกุลย่อย (subgenus) *Symphomyrtus* หมู่ (section) *Exsertaria* ชุด (series) *Tereticornes* ชนิด (specie) *E. camaldulensis* Dehnh (Pryor และ Johnson, 1971; Samuel และ Arlene, 1987)

ยูคาลิปตัสคามาลดูลเลนซิสเป็นไม้พื้นเมืองของออสเตรเลียที่มีขอบเขตการกระจายกว้างขวาง อยู่ระหว่างเส้นรุ้ง 12.5 – 38 องศาใต้ ที่ระดับความสูง 20 – 700 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง แต่พบมากทางตอนเหนือของทวีป ลักษณะพื้นที่ที่ ยูคาลิปตัสคามาลดูลเลนซิสกระจายพันธุ์อยู่มีหลายลักษณะ ทั้งพื้นที่แห้งแล้ง กึ่งแห้งแล้ง ตามริมธารและแม่น้ำ และพื้นที่ลาดชันบนเขา ลักษณะภูมิอากาศที่ ยูคาลิปตัสคามาลดูลเลนซิสกระจายพันธุ์อยู่มีความหลากหลายเช่นเดียวกันคือสามารถพบได้ทั้งในเขตร้อนซึ่งมีอุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ยรายเดือนของเดือนที่ร้อนอยู่ในช่วง 27 – 40 องศาเซลเซียส จนถึงเขตอบอุ่นซึ่งมีอุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ยรายเดือนของเดือนที่หนาวอยู่ในช่วง 3 – 15 องศาเซลเซียส ปกติพบในพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนอยู่ในช่วง 250-625 มิลลิเมตรต่อปี แต่บางพื้นที่ปริมาณน้ำฝนอาจสูงถึง 1,250 มิลลิเมตรต่อปี หรือบางพื้นที่ปริมาณน้ำฝนอาจต่ำเพียง 150 มิลลิเมตร (Chippendale, 1973; FAO, 1979; National Academy of Science, 1980; Boland และคณะ, 1997; Eldridge และคณะ, 1997)

Grunwald และ Karschon (1979) ได้รายงานว่ายูคาลิปตัสคามาลดูลเลนซิสมีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ ต่อมา Grattapaglia และ Bradshaw (1994) ได้ทำการศึกษาหาปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสโดยใช้เทคนิค flow cytometry ของพืชในสกุลยูคาลิปตัสจำนวน 12 ชนิดซึ่งได้แก่ *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. grandis*, *E. pellita*, *E. nesinifera*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. citriodora* และ *E. torelliana* และลูกผสมอีก 5 ชนิดได้แก่ *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. grandis* x *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* x *E. grandis*, *E. citriodora* x *E. torelliana* และ *E. urophylla* x *E. alba* พบว่าปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสของยูคาลิปตัสอยู่ในช่วง 0.77 pg/2C (ใน *E. citriodora*) ถึง 1.47 pg/2C (ใน *E. saligna*) และมีขนาดของแฮพพลอยด์จีโนมอยู่ในช่วง 370 – 700 ล้านคู่เบส นอกจากนั้นยังพบว่าชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันจะมีปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสใกล้เคียงกัน ลูกผสมจะมีปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสอยู่กึ่งกลางระหว่างพ่อแม่และไม่พบลูกผสมที่เป็นพวกพอลิพลอยด์

ยูคาลิปตัสคามาลดูลเลนซิสเจริญเติบโตได้ในระดับความสูงเหนือน้ำทะเล 30 – 230 เมตร ในช่วงอุณหภูมิเฉลี่ย 11 – 35 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 200 – 1,250 มิลลิเมตรต่อปี สามารถทนสภาพน้ำท่วมขังนาน 1 – 2 เดือน ดินที่เหมาะสมสำหรับการปลูกคือดินร่วนปนทราย pH 6 – 8 แต่ไม่ทนทานในสภาพดินที่มีแคลเซียมหรือหินปูนสูง โดยจะปรากฏอาการใบเหลือง (FAO, 1980; FAO, 1981)

2.2 การใช้ประโยชน์ของยูคาลิปตัสคามาเลเดนซิส

ยูคาลิปตัสคามาเลเดนซิสสามารถใช้ประโยชน์ได้หลายๆ ด้านดังนี้

2.2.1 เยื่อกระดาษ (pulp and paper)

พบว่าผลผลิตส่วนใหญ่ของยูคาลิปตัสคามาเลเดนซิสใช้เป็นวัตถุดิบใน อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ ในรูปแบบเยื่อสั้น จากการศึกษาคูณสมบัติของเส้นใย (fiber) ของยูคาลิปตัสคามาเลเดนซิสที่มีอายุ 10 ปี โดยทศนีย์ และคณะ (2525) พบว่ามีความยาวของเส้นใย 1.1895 มิลลิเมตร มีความกว้างของเส้นใย 0.0220 มิลลิเมตร และมีความกว้างของ fiber lumen 0.0150 มิลลิเมตร และจากการที่เส้นใยยูคาลิปตัสคามาเลเดนซิสมีผนังเซลล์บาง ทำให้มีแนวโน้มที่เส้นใยยึดติดกันได้ดี ทำให้แรงยึดระหว่างเส้นใยสูง เมื่อใช้ทำกระดาษจะได้กระดาษที่แข็งแรงและเหนียว

2.2.2 ไม้แปรรูป (lumber)

เนื่องจากในปัจจุบันไม่สามารถนำไม้จากป่าธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ในด้านนี้ได้แต่ยังคงมีความต้องการใช้อยู่ ดังนั้นนอกจากการนำเข้าไม้จากต่างประเทศแล้ว เราสามารถแก้ไขได้โดยหันมาใช้ไม้ยูคาลิปตัสคามาเลเดนซิสที่มีอายุมาก เนื้อไม้ยูคาลิปตัสคามาเลเดนซิสมีแก่นสีน้ำตาล สีของแก่นต่างจากสีของกระพี้ เนื้อไม้ค่อนข้างละเอียด มักบิดเมื่อแห้ง ลักษณะของเส้นเป็นเส้นสนและเส้นเป็นคลื่น มีความหนาแน่นของเนื้อไม้ 980 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร (FAO, 1979) แต่ถ้ามีอายุน้อยความหนาแน่นต่ำกว่านั้น เนื้อไม้แตกได้ง่ายถ้าเก็บรักษาไม่ดี การแปรรูปควรทำขณะไม้ยังสดอยู่ เพราะถ้าทิ้งไว้ให้แห้งจะทำให้แตกง่ายได้ จากการศึกษาของสุชาติ (2525) พบว่าเนื้อไม้ยูคาลิปตัสคามาเลเดนซิส มีความแข็งแรงในการตัดในสภาพแห้ง 1,344 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร มีความแข็งแรงสูงถึง 868 กิโลกรัม มีค่าความเหนียวซึ่งวัดจากการเคาะในสภาพแห้ง 2.33 กิโลกรัม-เมตร จากค่าต่างๆ ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเนื้อไม้ยูคาลิปตัสคามาเลเดนซิสมีความยุ่งยากในการแปรรูป มีความแกร่งสูง เปราะและแตกหักได้ง่ายเป็นเส้นสนและเส้นเป็นคลื่น มีความหนาแน่นของเนื้อไม้ 980 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร

2.2.3 ไม้ฟืนและถ่าน (fuel และ charcoal)

เนื้อไม้ยูคาลิปตัสคามาเลเดนซิสสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในครัวเรือนหรือในอุตสาหกรรมบางชนิด ทั้งในรูปของถ่านหรือฟืน พบว่า ฟืนไม้ยูคาลิปตัสคามาเลเดนซิสมีค่าความร้อนประมาณ 4.74 กิโลกรัมแคลอรีต่อกรัม และถ่านไม้ยูคาลิปตัสคามาเลเดนซิสมีค่าความร้อน 7.35 กิโลแคลอรีต่อกรัม (อรุณ และวินัย, 2528)

2.2.4 ไม้เสาเข็ม (pole)

ไม้ยูคาลิปตัสความสูงเฉลี่ย 3 เมตร ใช้ทำเสาเข็ม โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการก่อสร้าง ขนาดของเสาเข็มที่ใช้โดยทั่วไปมีเส้นผ่าศูนย์กลางตรงกลางท่อน 3, 4, 5 และ 6 นิ้ว และมีความยาว 3, 4, 5 และ 6 เมตรตามลำดับ (ชาลิต และสวลี, 2528)

2.2.5 การใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ

นอกจากการใช้ประโยชน์ในด้านที่กล่าวมาแล้ว ยูคาลิปตัสความสูงเฉลี่ยยังใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมแผ่นชั้นไม้อัด แผ่นใยไม้อัด ชันไม้ผสมปูนซีเมนต์ (สุชาติ, 2528)

2.3 ดินแคลเซียมสูง (Calcareous soil)

แคลเซียมเป็นธาตุที่พบได้ในดินทั่วไป จัดเป็นธาตุอาหารหลัก มีอยู่มากใน middle lamella และผนังเซลล์ของพืชในรูป calcium pectate จึงช่วยให้เซลล์พืชมีความแข็งแรง ในสภาพที่เซลล์พืชมีแคลเซียมสูงจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polygalacturonase ทำให้เพคตินถูกสลายได้น้อย แคลเซียมที่อยู่ในใบ ส่วนใหญ่อยู่ในแวคิวโอลช่วยรักษาสมดุลของออสโมติกและลบภายในเซลล์ (ยงยุทธ, 2546)

ดินที่มีแคลเซียม หรือดินเนื้อปูน เป็นดินที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตปนอยู่ จัดอยู่ในกลุ่มดิน Renolzinas มักมีคุณสมบัติเป็นเบส ($\text{pH} > 7.2$) สามารถตรวจสอบได้โดยหยดกรดเกลือความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในตัวอย่างดิน จะเห็นฟองของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ปรากฏออกมา ในดินที่มีแคลเซียมค่า pH และคาร์บอเนตเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ลึกลงไปดิน เนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนตถูกชะจากผิวดินลงสู่ชั้นล่าง

ประเทศไทยมีดินที่มีแคลเซียมในชุดดินลพบุรี ตาคลี บ้านหมี่ โกลกกระเทียม ชัยบาดาล ลำานารายณ์ หินซื่อน หรือ บุรีรัมย์ เป็นต้น ส่วนใหญ่กระจายอยู่ในจังหวัด ลพบุรี สระบุรี นครสวรรค์ ราชบุรี และกาญจนบุรี ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 800,000 ไร่

2.4 การขาดธาตุอาหารของพืชในดินที่มีแคลเซียม

พืชที่ปลูกในดินที่มีแคลเซียมมักพบว่าปรากฏอาการของการขาดธาตุหลัก สังกะสี และบางครั้งก็ขาดแมงกานีสด้วย

2.4.1 ธาตุเหล็ก

เหล็กเป็นธาตุที่พบในโลกจำนวนมาก ในสภาพแวดล้อมทั่วไปที่มีออกซิเจนจำทำให้เหล็กอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ Fe(III)hydroxide และ Fe(III)phosphate แต่ในสภาพที่ดินมี pH เป็นกรดจะทำให้เกิด Fe(III) สามารถละลายได้ โดยปกติพืชจะปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาบริเวณรอบๆ รากทำให้เกิดการจับอนุมูลของ Fe^{3+} อยู่ในรูป Fe(II)chelate และมีเอนไซม์ ferric reductase ทำการเปลี่ยน Fe(III)chelate เป็น Fe(II) และส่งผ่านไปตามท่อลำเลียง (xylem และ phloem) ความเข้มข้นของเหล็กภายในเซลล์พืชขึ้นอยู่กับระยะทาง 50 – 259 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง(กรัม) พืชที่ขาดธาตุเหล็กพบว่า จะปรากฏอาการเหลืองที่ใบอ่อน แต่เส้น veins ยังคงมีสีเขียว

นอกจากนี้ยังปรากฏจุดสีน้ำตาล (necrosis) ที่ใบด้วย จนกระทั่งยอดตาย เหล็กในพืชเป็นองค์ประกอบของ คลอโรฟิลล์ จึงมีความจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง ตลอดจนปฏิกิริยาออกซิเดชัน และรีดักชัน

เหล็กเป็นธาตุหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช แม้ว่าเหล็กเป็นธาตุที่มีมากบนผิวโลกแต่ในสภาพที่เป็นเบส ($\text{pH} > 7$) เหล็กส่วนมากจะอยู่ในสภาพที่ไม่ละลาย หรือ Fe^{2+} และ Fe^{3+} ที่อยู่ในดินนั้นต่ำมาก ทำให้มีผลต่อการเจริญของพืช ในพืชชนิดต่างๆ ยกเว้นหญ้า พืชจะปล่อย H^+ ไปสู่ดินทำให้ดินมี pH ต่ำลง มีผลทำให้ Fe(III) chelate reductase ทำงานทำให้เกิด Fe^{2+} ซึ่งสามารถละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น (Robinson และคณะ, 1999) และส่งผ่านเข้าสู่ต้นพืชด้วยการที่พืชปล่อย chelator (Strategy I)

พืชตระกูลหญ้าเช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี จะปล่อยสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่เรียกว่า phytosiderophores จากรากในสภาพที่ขาดธาตุเหล็ก siderophores จะจับกับ Fe(III) ในรูปสารเชิงซ้อน (Fe(III) -siderophore complex) และดูดขึ้นสู่ต้นพืชโดยผ่าน receptor (Curie และคณะ, 2001) (Strategy II)

จากการทดลองเปรียบเทียบระหว่าง Arabidopsis ที่มียีน FRO2 สร้างเอนไซม์ ferric chelate reductase กับ Arabidopsis ที่เกิดการกลายของยีนนี้พบว่าต้นพันธุ์กลาย จะมีการดูดซึมเหล็กได้น้อยกว่า

YS1 เป็นโปรตีนที่อยู่ผิวเมมเบรนได้รับการเสนอให้เป็น Fe(III) -phytosiderophore transporter (Bell และคณะ, 1958) ในสภาพที่ขาดธาตุเหล็กข้าวโพดพันธุ์กลาย ys1 แสดงลักษณะ chlorosis (ใบเหลือง) แต่เมื่อได้รับอาหารที่มี Fe-EDTA ใบพืชจะกลับมาเป็นปกติ หรือใบเขียว (Bell และคณะ, 1962)

Phytosiderophores ค้นพบขึ้นครั้งแรกในปี 1976 โดย Takagi และการทำงานของมันทราบในปี 1981 (Sugiara และคณะ, 1981) phytosiderophore ไม่ได้พบเฉพาะในพืชเท่านั้นแต่ยังพบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นด้วยเช่น ยีสต์ (von Wirén, 1993) ใน Arabidopsis Fe(III) chelates ถูกรีดิวซ์เป็น Fe(II) ที่เซลล์เมมเบรน (Robinson และคณะ, 1999) และส่งเข้าสู่รากโดยผ่าน IRT1 (Eide และคณะ, 1996) ยีน IRT1 มักจะแสดงออกในสภาพที่พืชขาดเหล็ก แต่การแสดงออกของยีนนี้จะลดลงเมื่อมีสังกะสี และแคดเมียมในปริมาณที่สูง (Erin และคณะ, 2002)

2.4.2 ธาตุสังกะสี

สังกะสีที่อยู่ในพืชนั้น ปกติมีประมาณ 30 – 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง(กรัม) ถ้าพืชขาดสังกะสีจะปรากฏอาการใบเหลือง เจริญเติบโตช้าทำให้ปล้องสั้น หรือตาลี ใบที่ปลายยอดมีขนาดเล็ก หรือจนกระทั่งมีสีดำ และตายในที่สุด สังกะสีมีความสำคัญต่อการทำงานของฮอร์โมนออกซิน ช่วยในกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และโปรตีน กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด ช่วยในการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตอย่างง่ายไปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสต่างๆ

2.4.3 ธาตุแมงกานีส

แมงกานีสมีความสำคัญต่อพืชมากเช่นเดียวกับเหล็กและสังกะสีคือ เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดชัน รีดักชัน ไฮโดรไลซิส และการสร้างกรดอินทรีย์ เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ ในวัฏจักรเครบ เมื่อพืชขาดแมงกานีสจะแสดงอาการเช่นเดียวกับพืชที่ขาดสังกะสี

2.5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เนื่องจากสิ่งมีชีวิตมีมากมายหลายชนิด จึงเกิดการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน การเปรียบเทียบทางกายวิภาคศาสตร์ (anatomy) สัณฐานวิทยา (morphology) การศึกษาเอ็มบริโอ (embryology) และสรีรวิทยา (physiology) ต่อมาการศึกษาวิเคราะห์ในระดับโมเลกุล โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลที่มีพื้นฐานมาจากการแสดงความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ในระดับโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอ เครื่องหมายทางโมเลกุลมีส่วนช่วยให้การศึกษานุกรมวิธาน ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์พืช ทำได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Weising และคณะ, 1995)

การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในช่วงแรกเป็นการศึกษาในระดับโปรตีน โดยเริ่มจากการศึกษาอัลโลไซม์ (allozymes) มาตั้งแต่ช่วงปี ค.ศ. 1960 (May, 1992) ขั้นตอนการทดลองเริ่มจากสกัดโปรตีนจากเซลล์ แยกโมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างกันด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยอาศัยความแตกต่างของประจุรวมและขนาดของโมเลกุล จากนั้นย้อมแถบโปรตีนที่ต้องการโดยใช้สารที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับโปรตีนแต่ละกลุ่มและเกิดตะกอนขึ้น อัลโลไซม์นำมาใช้ศึกษาในแบคทีเรีย พืช และสัตว์หลายชนิด แต่วิธีนี้เป็นการศึกษาเฉพาะยีนที่มีการแสดงออกจึงมีจำนวนยีนที่สามารถตรวจสอบได้ไม่มาก พบโพลิมอร์ฟิซึมน้อย และการเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างต้องใช้เนื้อเยื่อชนิดเดียวกันและเจริญเติบโตในระยะเดียวกัน นอกจากนี้สิ่งแวดล้อมภายนอกบางอย่างมีผลต่อการแสดงออกของยีน (สมศักดิ์, 2540; สุรินทร์, 2540; Weising และคณะ, 1995)

ต่อมาเริ่มมีการศึกษาในระดับดีเอ็นเอซึ่งตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอทั้งในนิวเคลียสหรือออร์แกเนลล์อื่นๆ เช่น คลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรีย (สุรินทร์, 2540) โดยสิ่งมีชีวิตมีลำดับเบสในดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวและมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอครั้งแรกเกิดจากการศึกษาในคนโดย Jeffreys และคณะ ในปี ค.ศ. 1985 โดยสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วตรวจหาโพลิมอร์ฟิซึมด้วยวิธี Southern blot hybridization ใช้โพรบที่จับกับบริเวณอินทรอน (intron) ของยีนไมโอโกลบิน (myoglobin gene) ซึ่งเป็นมินิซาทเทลไลท์ (minisatellite) โดยมีลำดับเบสซ้ำกัน 4 ชุดต่อเนื่องกัน แต่ละชุดมีความยาว 33 คู่เบส โพรบที่ใช้สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งบนโครโมโซม (multilocus probe) ทำให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีจำนวนมาก และมีลักษณะจำเพาะกับแต่ละบุคคล (Weising และคณะ, 1995) แถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อลักษณะใดๆ หรือสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งจัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

2.6 ชนิดของลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มตามวิธีการได้แก่

2.6.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อาศัยไฮบริไดเซชัน (hybridization based)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกลุ่มนี้เกิดขึ้นจากการเข้าคู่กันของคู่สมระหว่างดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการศึกษากับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่คาดว่าจะทำให้เกิดความแตกต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายได้ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวเรียกว่าโพรบดีเอ็นเอ (DNA probe) ตัวอย่างเทคนิคและการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกลุ่มนี้ได้แก่ restriction fragment length polymorphism (RFLP)

2.6.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction based)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกลุ่มนี้เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนต่างๆ โดยอาศัยการเลียนแบบการลอกรหัสของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต แต่กระทำในหลอดทดลองเป็นจำนวนหลายรอบ เช่นเดียวกับปฏิกิริยาลูกโซ่ ตัวอย่างการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้ เช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), และ sequence related amplified polymorphism (SRAP) เป็นต้น

2.7 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) เป็นปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นซ้ำๆ กันโดยใช้ oligonucleotide เป็นตัวตั้งต้น หรือที่เรียกว่าไพรเมอร์ (primer) ไพรเมอร์นี้จะเป็นส่วนลำดับของดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณส่วนต้นและส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยอาศัยดีเอ็นเอของตัวอย่างในการศึกษาเป็นต้นแบบ (template) ในสภาวะที่มีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) เอนไซม์ DNA polymerase และ แมกนีเซียมคลอไรด์ ในหลอดทดลอง แต่ละรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสประกอบด้วย 4 ขั้นตอนคือ

การทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งอยู่ในสภาพเส้นคู่แยกเป็นเส้นเดี่ยว หรืออาจเรียกว่าการทำให้เสียสภาพ (denaturing) ทำโดยให้ดีเอ็นเอต้นแบบอยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง 93 – 95 องศาเซลเซียส การให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ขั้นตอนนี้ทำโดยให้ดีเอ็นเอต้นแบบและไพรเมอร์อยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิเหมาะสม (annealing temperature, Ta) อุณหภูมิที่เหมาะสมนี้สามารถคำนวณได้อย่างง่ายจากชนิดและจำนวนนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ดังนี้

$$T_a (^{\circ}\text{C}) = [2(\text{จำนวน A} + \text{T}) + 4(\text{จำนวน C} + \text{G})] - 5$$

ตัวอย่างเช่น ถ้าไพรเมอร์โมเลกุลหนึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น ACGTTAGCGATGATCGGT สามารถคำนวณค่า Ta ได้คือ

$$Ta(^{\circ}C) = [2(4+5) + 4(5+6)] - 5 = 57^{\circ}C$$

การนำนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบมาต่อเป็นสายยาว (extension) โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่สามารถทนต่อสภาพอุณหภูมิสูงได้ เอนไซม์ดังกล่าวมีชื่อว่า *Taq* polymerase ซึ่งได้จากแบคทีเรียในน้ำพุร้อนชื่อ *Thermus aquaticus* เอนไซม์นี้จะทำงานได้ดีในสภาพที่มีอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้จึงเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตามที่เรากำลังต้องการหรืออย่างน้อยก็มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนต้นและส่วนท้ายตามต้องการ เมื่อผ่าน 1 รอบของปฏิกิริยา เราจะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 โมเลกุล ถ้าปฏิกิริยาถูกใช้ไปเมื่อเรสมี่จำนวน 40 รอบ เราจะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2^{40} โมเลกุล

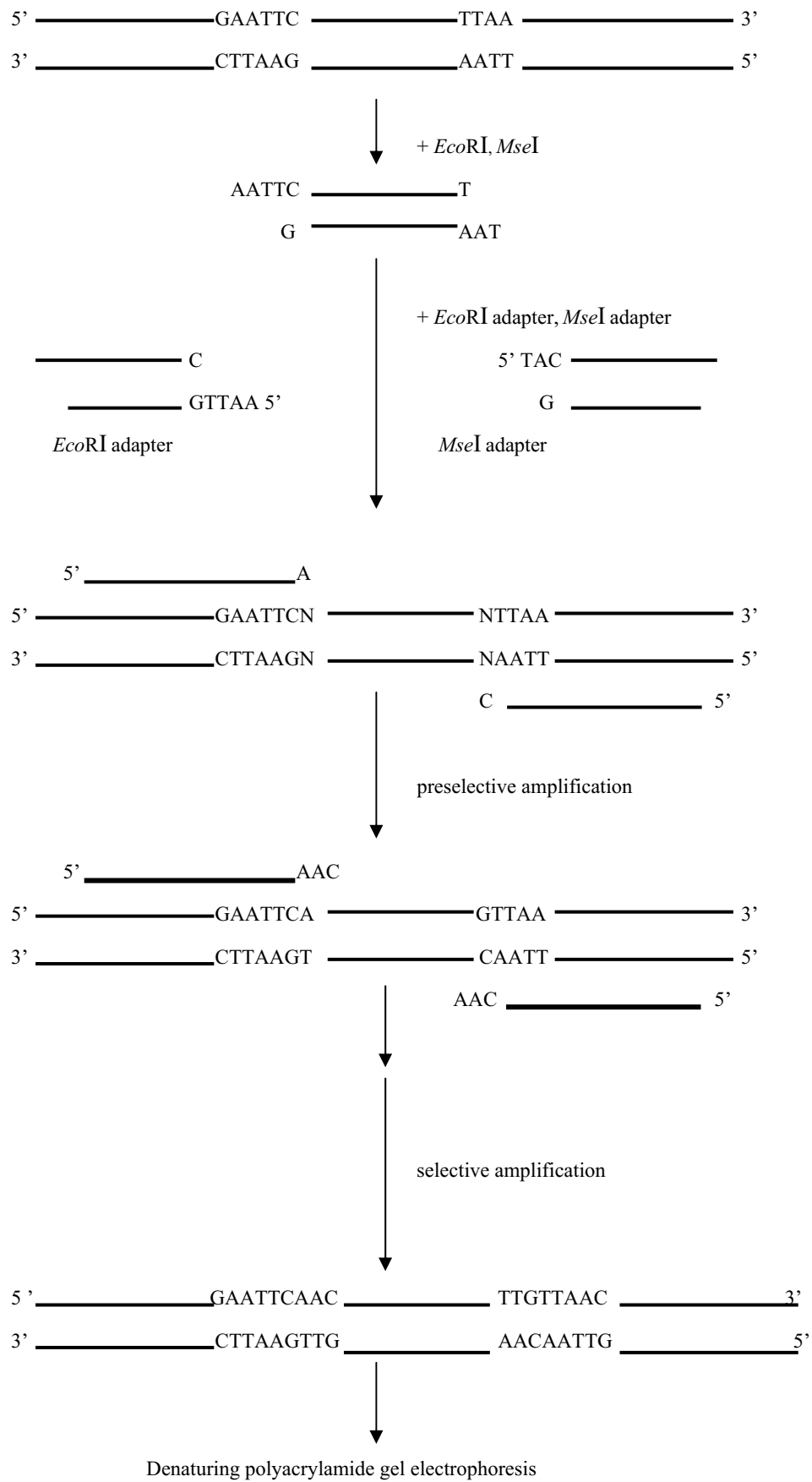
2.8 Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

เทคนิค AFLP พัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos และได้จดสิทธิบัตรในปี 1993 โดยใช้ชื่อว่า selective restriction fragment amplification (SRFA) เทคนิคนี้เป็นการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งคล้ายกับเทคนิค RFLP แต่เปลี่ยนการตรวจสอบผลจากวิธี Southern blot hybridization เป็นการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอแบบสุ่มด้วย PCR แทน ขั้นตอนเริ่มจากการนำดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นเชื่อมปลายของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดแล้วเข้ากับ adapter ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ มีปลายทั้งสองข้างเป็นปลายเหนียว โดยปลายข้างหนึ่งมีลำดับเบสที่สามารถเชื่อมกับชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้พอดี สาเหตุที่ต้องต่อ adapter เข้าที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นที่จับของไพรเมอร์เพราะทราบลำดับเบสในส่วนนี้ เมื่อเชื่อม adapter เข้ากับปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอแล้วจึงนำมาทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยเลือกเพิ่มปริมาณเพียงบางส่วนของแบบสุ่ม ขั้นตอน PCR แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเรียกว่า preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสด้านปลาย 5' เป็นคู่สมกับ adapter และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะและเพิ่มนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' ของอีก 1 ตัวเพื่อเลือกเพิ่มเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนของที่มีลำดับเบสที่ปลายทั้งสองข้างเป็นคู่สมกับไพรเมอร์เท่านั้น

การทำ PCR ครั้งที่สองเรียกว่า selective amplification ใช้ไพรเมอร์ใหม่ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' อีก 2 – 3 ตัวเพื่อเลือกเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วนของเท่านั้น ในการทำ PCR ครั้งที่สองนี้ได้ออกผลในช่วง annealing สูงในรอบแรก และลดอุณหภูมิลงในรอบต่อๆ มา เพื่อเลือกเพิ่มเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับไพรเมอร์ สาเหตุที่ใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วน เนื่องจากเมื่อตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอจำนวนมาก เมื่อนำมาทำ PCR แล้วแยกขนาดด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสจะได้แถบดีเอ็นเอต่อเนื่องกันไม่สามารถแยกเป็นแต่ละแถบได้ จึงเลือกเพิ่มปริมาณเพียงบางส่วนของเท่านั้นเพื่อให้สะดวกต่อการตรวจสอบผล (Vos และคณะ, 1995; Vos และ Kuiper, 1997) จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาแยกขนาดด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท หรือทำออโตเรดิโอกราฟ ในกรณีที่ติดฉลากไพรเมอร์ด้วยสารกัมมันตรังสี หรือทำ Southern blot hybridization โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับไพรเมอร์หรือใช้เครื่องอัตโนมัติ automated laser fluorescent analysis (ALFA) ทำให้ได้ผลเร็วขึ้น (Aarts และคณะ, 1999)

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนิยมใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส เรียกว่า rare cutter เช่น *EcoRI* หรือ *Pst I* ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบสเรียกว่า frequent cutter เช่น *MseI* หรือ *TaqI* การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดจะทำให้ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอพอเหมาะและมีข้อดีอีกหลายประการ ดังนี้

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น frequent cutter จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นขนาดเล็ก ซึ่งจะเพิ่มปริมาณได้ดีในการทำ PCR และอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel
2. เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น rare cutter มีตำแหน่งที่จะตัดดีเอ็นเอได้น้อย จึงช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจากการทำ PCR ลง เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด หรือเกือบทั้งหมดเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ที่เป็น rare cutter และอีกด้านหนึ่งนั้นเป็น frequent cutter ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทั้ง 2 ด้านเป็นตำแหน่งของเอนไซม์แบบ frequent cutter เมื่อเชื่อมต่อกับ adapter แล้วจะมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำ (inverted repeat) เมื่อถูกทำให้เสียสภาพเป็นสายเดี่ยวจะสามารถกลับมาจับกันเองโดยเบสคู่สมเกิดเป็นโครงสร้างแบบ stem – loop ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับได้ ส่วนชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ที่เป็น rare cutter ทั้งสองด้านมักจะมีความยาวมาก จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในสภาวะที่ใช้ทดลอง
3. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ทำให้สามารถเลือกติดฉลากที่ไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ ดังนั้นจึงมีดีเอ็นเอที่ติดฉลากเพียงสายเดียว เมื่อนำไปแยกขนาดใน denaturing polyacrylamide gel ดีเอ็นเอทั้งสองสายอาจจะเคลื่อนที่ได้ระยะทางไม่เท่ากัน เกิดเป็นแถบดีเอ็นเอ 2 แถบคู่กัน (doublet) ในกรณีที่มีการติดฉลากเพียงสายเดียวจะตรวจพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวทำให้วิเคราะห์ได้ง่ายขึ้น
4. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดช่วยให้การปรับจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณความยืดหยุ่นดี โดยปรับจำนวนเบสเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน
5. สามารถทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้จำนวนมาก โดยใช้คู่ผสมของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดจำนวนน้อย เช่น มีไพรเมอร์ชนิดละ 5 แบบ จากการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ถึง 25 แบบ เป็นต้น



การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะต้องคำนึงถึงชนิดของตัวอย่างที่ใช้ศึกษาโดย Vos และ Kuiper (1997) พบว่าถ้าเป็นการศึกษาในสัตว์เอนไซม์ *TaqI* คู่กับ *EcoRI* จะให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้มากกว่าเอนไซม์ *EcoRI* คู่กับ *MseI* นอกจากเอนไซม์ 4 ชนิดนี้แล้วอาจใช้เอนไซม์อื่นได้อีก เช่น Kokotovic และคณะ (1999) ใช้เอนไซม์ *BglII* และ *MfeI* ในการศึกษา mycoplasma Meksem และคณะ (1995) ใช้ *HindIII* และ *MseI* ในการศึกษาแผนที่ยีนของมันฝรั่ง

ในการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สามารถใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวในการตัดดีเอ็นเอได้ดังในรายงานการทดลองของ Valsangiacamo และคณะ (1995) ใช้เอนไซม์ *HindIII* ในการศึกษา *Legionella pneumophila* และ Gibson และคณะ (1998) ที่ใช้วิธีการเดียวกันในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *Helicobacter pylori* โดยในการทดลองใช้ adapter ชนิดเดียวและใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิดที่ต่างกันเพียงนิวคลีโอไทด์ 1 ตัวที่เพิ่มเข้าไปด้านปลาย 3' โดยนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มมี 4 ชนิดคือ A, G, T, C และลดขั้นตอนการทำ PCR เหลือเพียงครั้งเดียว นอกจากนี้ได้ใช้ 1.5% เจลอะกาโรสแทน denaturing polyacrylamide gel ในการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอและย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งวิธีการนี้สามารถจำแนกสายพันธุ์ของ *Legionella pneumophila* และ *Helicobacter pylori* ได้

ขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นสิ่งสำคัญที่มีผลต่อการทดลองคือ ต้องตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ ถ้าตัดดีเอ็นเอไม่สมบูรณ์ผลที่ได้จะแตกต่างกับการตัดดีเอ็นเอสมบูรณ์อย่างชัดเจน และเป็นปัจจัยหลักที่มีผลให้ทำการทดลองซ้ำแล้วได้ผลเหมือนเดิม โดยคุณภาพของดีเอ็นเอมีผลโดยตรงต่อการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดีเอ็นเอที่นำมาทำ AFLP ต้องมีคุณภาพดี (Hill และคณะ, 1996; Chen และคณะ, 1999) โดย Reineke และคณะ (1998) ได้ทดลองเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากแมลงและ Arthropod 6 วิธีคือ วิธีที่รวดเร็ว (rapid) 1 วิธี, วิธีที่ใช้ฟีนอล – คลอโรฟอร์ม 4 วิธี และใช้ CTAB หนึ่งวิธี พบว่าวิธีที่สกัดดีเอ็นเอแล้วได้คุณภาพดีพอสำหรับการทำ AFLP คือวิธี CTAB และวิธีใช้ฟีนอล – คลอโรฟอร์ม 1 วิธีจากทั้งหมด 4 วิธี

adapter ที่ใช้ในการทดลองจะไม่เติมหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' เพราะจะทำให้ adapter ชนิดเดียวกันมาเชื่อมต่อกันเองเป็นคู่ (dimer) ไม่สามารถมาเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการและทำให้ปริมาณ adapter ที่ใช้ได้ลดน้อยลงไม่เพียงพอ adapter จะเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอได้เพียงสายเดียว คือ ปลาย 3' ของ adapter เชื่อมกับปลาย 5' ฟอสเฟตของชิ้นดีเอ็นเอด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ส่วนอีกสายหนึ่งจะเป็นช่องว่างระหว่างปลาย 5' ของ adapter กับ 3' ของชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเป็นหมู่ไฮดรอกซิลทั้งสองฝั่ง ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR ในขั้น preselective amplification ดีเอ็นเอสายที่มีช่องว่างจะทำหน้าที่เป็นต้นแบบ เป็นที่จับของไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายที่เป็นคู่สม ดังนั้นก่อนที่จะเริ่มปฏิกิริยาทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพควรใส่สารที่จำเป็นในปฏิกิริยาให้ครบทั้งหมดก่อน เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นส่วนปลายโมเลกุลที่มี adapter สายหนึ่งที่ไม่ได้เชื่อมต่อกับโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเสียสภาพหลุดออกไปก่อน แล้วเอนไซม์ *Taq* polymerase จะทำหน้าที่เติมเบสเข้าที่ปลาย 3' ของโมเลกุลดีเอ็นเอ (fill-in) แทนที่ส่วนของ adapter จนได้เป็นเกลียวที่สมบูรณ์ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุด ดีเอ็นเอจะเสียสภาพเป็นสายเดี่ยวทั้งโมเลกุล แต่จะไม่มีช่องว่างอีก จึงสามารถเกาะกับไพรเมอร์และสังเคราะห์สายคู่สมได้ตามปกติ (สุรินทร์, 2543)

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ได้กับ adapter สามารถทำพร้อมกันได้เนื่องจาก adapter ที่สังเคราะห์ขึ้นมานั้นออกแบบให้มีปลายที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลายเหนียวของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ แต่เบสที่อยู่ในตำแหน่งถัดมาเป็นเบสคนละชนิดกับเบสที่บริเวณจดจำของเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อ adapter เข้าไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอแล้วเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะไม่สามารถตัดได้อีก แต่ถ้าดีเอ็นเอที่ถูกตัดเชื่อมต่อกลับไปใหม่จะสามารถตัดได้อีก การเชื่อมต่อ adapter โดยมีเอนไซม์ตัดจำเพาะอยู่ด้วยจึงไม่มีผลเสียใดๆ และยังช่วยให้การตัดดีเอ็นเอเกิดได้สมบูรณ์อีกด้วย (สุรินทร์, 2543)

ขั้นตอน preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้น และช่วยให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการ ขั้นตอน preselective amplification นิยมใช้เมื่อต้องการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณขนาดใหญ่และต้องใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' มากกว่า 2 ตัวในขั้นตอน selective amplification ไพรเมอร์ที่ใช้ส่วนมากนิยมเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัวเข้าที่ปลาย 3' หรืออาจใช้ไพรเมอร์ที่ไม่มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' เลยก็ได้ (Lin และคณะ, 1996; Brigneti และคณะ, 1997) ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์คนละชนิดก็จะเพิ่มเบสคนละชนิดกัน การเพิ่มนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์มีผลต่อจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ โดยพบว่าถ้าใช้ไพรเมอร์ที่ไม่มีการเพิ่มเบส จะได้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่าการใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัว (Mackill และคณะ, 1996)

สำหรับขั้นตอน selective amplification จำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มด้านปลาย 3' ของไพรเมอร์นั้นไม่แน่นอนแล้วแต่วิธีการของตัวอย่าง ถ้าเป็นการศึกษาจีโนมขนาดเล็กหรือโคลนที่อยู่ในพลาสมิด คอสมิด หรือ bacterial artificial chromosome (BAC) ไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเป็นต้องเพิ่มนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากจำนวนดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีจำนวนน้อยอยู่แล้ว สำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใหญ่ เช่น แบคทีเรียและเชื้อราจะเพิ่มนิวคลีโอไทด์เพื่อคัดเลือก 1 – 2 ตัว ส่วนพวกที่มีจีโนมขนาดใหญ่จะเพิ่มนิวคลีโอไทด์มากกว่า 2 ตัวที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้จำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มให้กับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละตัวอาจไม่เท่ากัน เช่น Aarts และคณะ (1998) ใช้ไพรเมอร์สำหรับ *MseI* ที่ไม่มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์คู่กับไพรเมอร์สำหรับ *EcoRI* ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 2 ตัวสำหรับศึกษา *Salmonella* spp. หรือการใช้ไพรเมอร์สำหรับ *PstI* เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 2 ตัวและไพรเมอร์สำหรับ *MseI* เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวในการศึกษามันฝรั่ง (Bendahmane และคณะ, 1997; Brigneti และคณะ, 1997) Chen และคณะ (1999) ศึกษากล้วยไม้ในกลุ่มแวนด้า 2 สกุลคือ *Aranda* spp. และ *Mokara* spp. โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ *MseI* ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัว และ 3 ตัวคู่กับไพรเมอร์สำหรับ *EcoRI* ที่ไม่เพิ่มนิวคลีโอไทด์และเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 – 4 ตัว พบว่าไพรเมอร์สำหรับ *MseI* ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวกับไพรเมอร์สำหรับ *EcoRI* ที่ไม่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 4 ตัวให้ผลดีที่สุด

เทคนิค AFLP นอกจากใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์มาศึกษาแล้ว สามารถใช้ cDNA ที่สร้างมาจาก mRNA แทนดีเอ็นเอจากจีโนม เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน (Anonymus, 1996) หรือสร้างลายพิมพ์จาก mRNA (mRNA fingerprints) ในพืชที่มีชุดโครโมโซมพื้นฐานหลายชุด (polyploid) (Money และคณะ 1999) นอกจากนี้ในพืชยังสามารถนำเนื้อเยื่อส่วนใดก็ได้มาตรวจสอบ ไม่จำเป็นต้องใช้เนื้อเยื่อชนิดเดียวกัน Chen

และคณะ (1999) ได้ทดลองสกัดดีเอ็นเอจากใบและดอกของกล้วยไม้ในกลุ่มแวนด้ามาทำ AFLP พบว่าให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค AFLP มีลักษณะเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอใดก็ได้โดยไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมได้โดยการปรับจำนวนนิวคลีโอไทด์คัดเลือกว่า 3' ของไพรเมอร์ แบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างหรือโพลีเมอร์เฟซิมเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกว่าไพรเมอร์ที่ใช้ หรือเกิดจากมีขึ้นดีเอ็นเออื่นๆ ขาดหายไปหรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ก็ได้ผลที่เกิดขึ้น คือการมี แถบดีเอ็นเอหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งตัดนั้นๆ หรือขึ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากการทำ AFLP จึงมีทั้งแบบที่แสดงลักษณะข่ม (dominance) โดยปรากฏเป็นการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน (codominance) โดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบ AFLP marker แบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่า (สุรินทร์, 2543)

2.9 Sequence related amplified polymorphism (SRAP)

เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นในปี 2001 โดย Li และ Quiros เป็นเทคนิคที่อยู่ในกลุ่มที่ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือเครื่องหมายชนิดนี้ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดเช่นเดียวกับปฏิกิริยาลูกโซ่ได้แก่ ไพรเมอร์ forward ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 17 ตัว โดยมีลำดับหลัก (core sequence) 10 นิวคลีโอไทด์ ตามด้วย CCGG และ selective nucleotide อีก 3 ตัว ไพรเมอร์ reverse มีนิวคลีโอไทด์ 18 ตัว โดยมีลำดับหลัก 11 นิวคลีโอไทด์ ตามด้วย AATT และ selective nucleotide อีก 3 ตัว นิวคลีโอไทด์ 10 และ 11 ตัวแรกจากปลาย 5' เป็นนิวคลีโอไทด์สุ่ม นิวคลีโอไทด์อีก 4 ตัว CCGG มีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มปริมาณในส่วนที่เป็นยีน ซึ่งสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่พบว่าบริเวณดังกล่าวมีนิวคลีโอไทด์ C และ G มาก ส่วน AATT นั้นมีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มปริมาณในส่วนที่ไม่ใช่ยีนหรืออินทรอน ในปฏิกิริยาลูกโซ่ของเทคนิค SRAP นี้ใช้อุณหภูมิที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ 2 อุณหภูมิ คือ 35 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียสหลังจากนั้นก็ทำการแยกขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วย deaturing polyacrylamide gel electrophoresis และตรวจสอบด้วยการทำออดิโกราฟเมื่อติดฉลากไพรเมอร์ด้วย ^{32}P หรือย้อมด้วย silver nitrate

Li และ Quiros เปรียบเทียบเทคนิคนี้กับ AFLP ในการติดตามยีน GLS – ALK ในการศึกษาระหว่าง collard x cauliflower ในขณะที่ผลของ AFLP เป็น dominant นอกจากนี้เทคนิคนี้การทำยังง่ายกว่า AFLP อีกด้วย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยในช่วง 6 เดือนแรกมีจุดมุ่งหมายในการหาจุลินทรีย์ก่อโรค หรือโคลนต่างๆ ที่มีความทนทาน หรืออ่อนแอต่อดินที่มีแคลเซียม

3.1 การทดลอง

3.1.1 นำจุลินทรีย์ก่อโรค 2, CT76 และ P7 มาเลี้ยงในอาหารสภาพปลอดเชื้อสูตร MS6 นาน 1 เดือน แล้วย้ายลงอาหาร MS6 ที่เติม BAP 500 ppm และน้ำมะพร้าว 20 % และเติม CaCO_3 ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300 และ 400 mM เป็นเวลา 1 เดือนแล้วทำการตรวจสอบความเครียดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ ascorbate peroxidase

3.1.1.1 บดใบจุลินทรีย์ 0.5 กรัมใน 0.75 ml ของ 0.1M Sodium phosphate pH 7.8

3.1.1.2 ปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 12,000 g นาน 15 นาที

3.1.1.3 คัดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่และเติม 10% glycerol ทันที

3.1.1.4 คัดสารละลายเอนไซม์จาก 3.1.1.3 ปริมาตร 100 μl เติมลงใน 62.5 mM

phosphate buffer pH7.0, 12% sucrose, 100mM 3-aminotriazole, 100 mM

H_2O_2 และเก็บที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 10 นาที

3.1.1.5 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยจุ่มในน้ำแข็ง

3.1.1.6 วัดปฏิกิริยาจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (control) ที่ไม่ได้เติม CaCO_3 ลงในอาหารเลี้ยง

3.1.2 ออกสำรวจแปลงจุลินทรีย์ของเกษตรกร และแปลงปลูกของบริษัทสยามฟอเรสทรีในจังหวัดกาญจนบุรี และราชบุรีเพื่อเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ทนทานและอ่อนแอ

3.1.3 นำจุลินทรีย์โคลนต่างๆ ของบริษัทสยามฟอเรสทรี มาปลูกในดิน 3 ชุด ได้แก่ ดินที่มีแคลเซียม ดินชุดคาลิที่มีแคลเซียม และดินชุดปากช่องที่ไม่มีแคลเซียม สังเกตการเจริญเติบโตเพื่อการคัดแยกกลุ่ม

3.1.4 สกัดดีเอ็นเอจากใบจุลินทรีย์โดยใช้บัฟเฟอร์ 2X CTAB ตามวิธีการดัดแปลงจาก Agrawal และ คณะ (1992) ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

0.67% Cetyltrimethyl ammonium bromide

57 mM Tris-HCl pH8.0

263 mM NaCl

46.7 mM EDTA pH8.0

0.8% Sodiumdodesylsulphate

0.33% palvinylpyrrolidone – 360

100 μ l β - mercaptoethanol

โดยมีวิธีการดังนี้

1. นำใบอ่อนของยูคาลิปตัสจำนวน 1 กรัม มาล้างให้สะอาด เช็ดให้แห้งแล้วใส่ลงในโถรงบคยา เติมนไโครเจนเหลวให้ท่วมบดให้ละเอียดเป็นผง
2. นำตัวอย่างที่บดจนละเอียดลงในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย 2X CTAB buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร และสารละลาย β - mercaptoethanol จำนวน 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
3. นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยที่ทำการเขย่ากลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งทุกๆ 10 นาที
4. นำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
5. เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ
6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและคลอโรฟอร์มออกจากกัน
7. ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนใสหลอดใหม่ (ขนาด 50 มิลลิลิตร) เติมสารละลาย linear poly acrylamide จำนวน 140 ไมโครลิตร และเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 2 ใน 3 เท่าของปริมาตร ของเหลวที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันเบาๆ เพื่อช่วยในการตกตะกอนดีเอ็นเอ
8. นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
9. มาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000 g เป็นเวลา 15 นาที และเทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง
10. เติมสารละลาย wash buffer เพื่อล้างตะกอน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000 g เป็นเวลา 5 นาที
11. เทส่วนสารละลายทิ้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
12. ละลายตะกอนใน RNase buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วถ่ายลงในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
13. เติม RNase A จำนวน 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อกำจัด RNA
14. เติมสารละลาย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) จำนวน 500 ไมโครลิตร ปิดฝาและกลับหลอดเบาๆ เพื่อกำจัดโปรตีน และเอนไซม์ RNase A
15. นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000 g เป็นเวลา 10 นาที
16. ดูดสารละลายใสส่วนบนที่มีดีเอ็นเอใสในหลอดใหม่ และเติมสารละลาย คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) จำนวน 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000 g เป็นเวลา 5 นาที
17. ดูดสารละลายใสส่วนบนที่มีดีเอ็นเอใสหลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย linear polyacrylamide จำนวน 70 ไมโครลิตร สารละลายโซเดียมอะซิเตทปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรของเหลวที่มีอยู่ และเอทานอลปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรของเหลวที่มีอยู่

18. นำไปปั่นไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที
19. นำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000 g เป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำส่วนสารละลายทิ้งไป คงเหลือแต่ตะกอน
20. เติม 70% เอทานอลเพื่อล้างตะกอนและนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
21. ละลายตะกอนโดยเติมสารละลาย TE buffer จำนวน 200-300 ไมโครลิตร เก็บที่เย็นเอาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

3.1.5 การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอ

3.1.5.1 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยวิธีวัดการดูดกลืนแสง

การวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิกโดยวิธีวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer อาศัยหลักการที่เบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร ส่วนโปรตีนจะดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตร และสารละลายดีเอ็นเอที่เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260} หรือ OD_{260}) เท่ากับ 1 (สุรินทร์, 2540) ขั้นตอนของวิธีการวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีดังกล่าวมีดังนี้

1. นำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ
2. ใช้น้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อเป็นมาตรฐาน (blank) ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง
3. นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร
4. นำผลการวัดค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

5. ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบอัตราส่วนของค่า A_{260} / A_{280} ซึ่งถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ ถ้าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล และถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในสารละลายดีเอ็นเอมีอาร์เอ็นเอปนอยู่ (วัฒนาวลัย, 2536)

3.1.5.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอโดยวิธีการวัดการเรืองแสงของเอธิเดียมโบรไมด์ที่แทรกอยู่ในดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยวิธีการวัดการเรืองแสงของเอธิเดียมโบรไมด์ที่แทรกอยู่ในดีเอ็นเออาศัยหลักการที่โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะไปแทรกอยู่ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปตรวจภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (UV) จะเห็นการเรืองแสงขึ้นเป็นแถบ ความเข้มข้นของแสงบนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับแถบของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว ทำให้สามารถประมาณปริมาณดีเอ็นเอ นอกจากนี้การแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสยังสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ว่าการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอหรือไม่ โดยดูจากการปรากฏ

ของแถบอาร์เอ็นเอที่เคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอ รวมทั้งสามารถตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ ขั้นตอนของการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอมีวิธีดังนี้

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย
2. ชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม เติมน้ำบัฟเฟอร์ TAE
3. หลอมอะกาโรสโดยอุ่นให้ร้อน หรือใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรสหลอมละลายจนหมด
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50 – 55 องศาเซลเซียสแล้วเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร เสียบขั้วลงไปที่ตรงตำแหน่งเพื่อทำให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง
5. เมื่อเจลแข็งตัว ค่อยๆ ดึงขั้วออกนำแผ่นเจลไปวางลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ใส่บัฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมเจล โดยให้สูงกว่าผิวเจล 2 – 3 มิลลิเมตร
6. ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ loading buffer ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 แล้วหยดลงไปในช่องแผ่นเจลที่เตรียมไว้ และทำการหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดและความเข้มข้น (1 kb DNA ladder marker)
7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้มีแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์
8. ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนไปพอประมาณ โดยดูจากสีที่ผสมอยู่ใน loading buffer หรือหลังจากเริ่มต้นต่อกระแสไฟฟ้าเป็นเวลาประมาณ 30 – 45 นาทีแล้วจึงปิดเครื่อง
9. นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 10 – 15 นาที แล้วนำแผ่นเจลใส่ลงในกล่องพลาสติก และนำไปล้างน้ำไหล เพื่อล้างเอธิเดียมโบรไมด์ที่ไม่ได้เกาะกับดีเอ็นเอออกประมาณ 5 นาที
10. นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต โดยใช้ UV transillumination บันทึกภาพโดยใช้กล้องถ่ายภาพโพลาไรซ์
11. เปรียบเทียบความเรืองแสงของสารละลายดีเอ็นเอและสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณของดีเอ็นเอในสารละลายดีเอ็นเอ และตรวจสอบการปนเปื้อนโดยอาร์เอ็นเอ และการแตกหักของดีเอ็นเอจากลักษณะของแถบเรืองแสงที่ปรากฏ

3.1.6 สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด SRAP (Sequence-related amplified polymorphic DNA) โดยมีวิธีการดังนี้

3.1.6.1 สังเคราะห์ไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ชุด C จำนวน 8 ชนิด และชุด D จำนวน 8 ชนิด

ไพรเมอร์ชุด C :

C1 : GACTGCGTACGAATTTGA

C2 : GACTGCGTACGAATTGCT

C3 : GACTGCGTACGAATTCTA
 C4 : GACTGCGTACGAATTAGT
 C5 : GACTGCGTACGAATTTCA
 C6 : GACTGCGTACGAATTGTT
 C7 : GACTGCGTACGAATTTTCG
 C8 : GACTGCGTACGAATTACT

ไพรเมอร์ชุด D :

D1 : TGAGTCCAAACCGGAAG
 D2 : TGAGTCCAAACCGGATG
 D3 : TGAGTCCAAACCGGACC
 D4 : TGAGTCCAAACCGGAGC
 D5 : TGAGTCCAAACCGGAAT
 D6 : TGAGTCCAAACCGGATT
 D7 : TGAGTCCAAACCGGACA
 D8 : TGAGTCCAAACCGGAGA

3.1.6.2 เตรียมปริมตรสารในการทำปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอเรสใส่ในหลอด micro tube ดังนี้

ดีเอ็นเอ	2 μ l
10 X PCR buffer	2 μ l
50 mM MgCl ₂	2 μ l
2 mM dNTP	2 μ l
Primer A (5 pmole/ μ l)	2 μ l
Primer B (5 pmole/ μ l)	2 μ l
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/ μ l)	0.2 μ l
น้ำกลั่น	7.8 μ l

ปฏิกิริยาดังกล่าว ทำ 30 reaction / 1 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ C1-D1, C2-D2, C3-D3, C4-D4, C5-D5, C6-D6, C7-D7, C8-D8, C8-D1, C7-D2, C6-D3, C5-D4, C3-D6, C2-D7, C1-D8, C2-D1, C3-D1, C1-D2, C2-D3, C5-D2, C4-D5, C3-D2, C1-D3, C6-D2, C5-D3, C7-D3, C6-D4, C7-D4, C1-D7, C2-D8

3.1.6.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยนำหลอดจาก 3.1.6.2 ใส่ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermo cycler) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

1) denaturing 94 องศาเซลเซียส 1 นาที

2) annealing 35 องศาเซลเซียส 1 นาที

3) extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที

ในการทำ PCR 5 รอบแรกใช้สภาวะสำหรับขั้นตอนต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ส่วน 35 รอบหลังในขั้นตอน annealing ได้เปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียส

3.1.6.4 การแยกดีเอ็นเอด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

1. การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

1.1 นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น

1.2 เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และเอทานอล 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก

1.3 นำกระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกระต่ายเช็ดให้ทั่วด้วย repel silane เพื่อให้เจลเกาะติดกระจก ปลอยให้แห้งประมาณ 5 – 10 นาที

1.4 นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุดโดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทำ bind silane และ repel silane เข้าหากัน

การเตรียม polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (acrylamide:bisacrylamide 19:1, 7.5 M urea) โดยมีส่วนผสมดังนี้

30% acrylamide (19:1)	3 มิลลิลิตร
5 X TBE	3 มิลลิลิตร
ยูเรีย	6.75 กรัม
น้ำกลั่น	3.75 มิลลิลิตร
10% APS*	150 ไมโครลิตร
TEMED*	7.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	15 ไมโครลิตร

*เติมภายหลัง

10TBE = 89 mM Tris-borate, 2.5mM EDTA

APS = ammoniumpersulfate

TEMED = N,N,N',N' – tetramethylethylenediamine

ผสม polyacrylamide บัฟเฟอร์ TBE น้ำ และยูเรียในบีกเกอร์หรือขวดรูปชมพู่ เขย่าเบาๆ ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ให้ยูเรียละลายหมด รองอุณหภูมิ ลดลงประมาณเท่าอุณหภูมิห้อง จึงเติม 10% APS และ TEMED เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม แล้วใส่หัวลงไปด้านบน ถ้าเป็นหัวแบบฟันฉลาม (shark tooth type) ให้ใส่ด้านตรงข้ามที่เป็นรนาบลงไป ปลอยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง ถ้าจะปลอยเจลไว้ข้ามคืนควรใช้แผ่นใสห่ออาหารปิด ด้านบนและด้านล่างของเจลไว้เพื่อให้มีความชื้น

2. อิเล็กโทรโฟรีซิส

2.1 เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหัวออก และประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส เดมบัฟเฟอร์ TBE ลงในช่องขั้วบวกและขั้วลบ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้กระจก ในกรณีกระจกขนาด 15x17 เซนติเมตร ใช้ 1M TBE และกระจกขนาด 16x30 เซนติเมตร ใช้ 0.5M TBE

2.2 ต่อสายไฟเข้ากับเครื่อง power supply ทำ pre-run 20-30 นาที เจล ขนาด 15x17 เซนติเมตร ใช้ความต่างศักย์คงที่ 300 โวลต์ ส่วนเจลขนาด 16x30 เซนติเมตร ใช้ความต่างศักย์ 550 โวลต์

2.3 ใช้เข็มฉีดยาคูบัพเฟอร์ มาล้างผิวหน้าของเจลเพื่อล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหัวแต่ละช่องให้หมด

2.4 กระจกขนาด 15x17 เซนติเมตร หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 3.5 ไมโครลิตร ส่วนกระจกขนาด 16x30 เซนติเมตร หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 6 ไมโครลิตรผสมกับ loading buffer (95% formamide, 10mM EDTA, 0.1% bromphenol blue, 0.1% xylene cyanol) 2 ไมโครลิตร นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที หลังจากนั้นนำไปหยอดในแต่ละช่อง

2.5 เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์เท่าเดิม กระจกขนาด 15x17 เซนติเมตร ใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง ส่วนกระจก 16x30 เซนติเมตร ใช้เวลา 4-5 ชั่วโมง จนกว่าสี xylene cyanol (สีبن) เคลื่อนลงประมาณ 1 ใน 4 ส่วนของเจล

2.6 ปิดเครื่อง นำเจลไปย้อมด้วย silver nitrate

3. การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยการย้อมด้วยสารละลาย silver nitrate

3.1 นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาล้างในน้ำกลั่นนาน 10 นาที พร้อมกับเขย่าเบาๆ

3.2 แช่แผ่นเจลในสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำ 250 มิลลิลิตร, CTAB 0.25 กรัม) นาน 30 นาที พร้อมเขย่าเบาๆ อย่างต่อเนื่อง

3.3 แช่แผ่นเจลในสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์(น้ำ 250 มิลลิลิตร, แอมโมเนีย 750 ไมโครลิตร) นาน 15 นาที เขย่าตลอดเวลา

3.4 แช่แผ่นเจลในสารละลาย silver nitrate (น้ำ 250 มิลลิลิตร, ซิลเวอร์ไนเตรด 0.4 กรัม, 3M NaOH 330 ไมโครลิตร และเติมแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ 960 ไมโครลิตร) เขย่าเบาๆ อย่างสม่ำเสมอ 20 นาที

3.5 นำแผ่นเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

3.6 ย้ายแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย developer ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเขย่าเบาๆ อย่างสม่ำเสมอ 5 – 25 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน (สารละลาย developer ประกอบด้วย น้ำ 250 มิลลิลิตร, 2% โซเดียมคาร์บอเนต, 0.02 % ฟอรัมาลดีไฮด์)

3.7 นำแผ่นกระจกมาล้างน้ำอย่างรวดเร็ว

3.8 หยดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลใส่ในสารละลายกลีเซอรอล 1.5-3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำ 250 มิลลิลิตร, กลีเซอรอล 4.5 มิลลิลิตร) นาน 15 นาทีแล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.1.7 สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

3.1.8 การวิเคราะห์ดิน

นำดิน 3 แหล่งที่ปลูกยูคาลิปตัสได้แก่ ดินหินปูน ดินซุดปากช่อง และดินซุดตาคีที่มีหินปูน ไปตรวจวิเคราะห์ หาค่าและปริมาณต่างๆ ได้แก่ pH, เปอร์เซ็นต์ N, ปริมาณ P, K, Ca, Mg, Na, SO_4^{2-} , Cl, Zn, Mn, Fe, Cu และ Al ที่ภาควิชาปฐพี คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.9 การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากยีนจำเพาะ

ตรวจสอบผลการวิเคราะห์ดิน และหาว่าธาตุอาหารใดบ้างที่เกี่ยวข้องกับดินเหนียว

3.1.10 หาข้อมูลของยีนที่มีการทำงานเกี่ยวข้องกับธาตุอาหาร หาลำดับของยีนจาก GenBank ออกแบบลำดับไพรเมอร์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ สังเคราะห์ไพรเมอร์ และทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาPCR และตรวจสอบผลที่ได้

3.2 วัสดุ สารเคมี และครุภัณฑ์

3.2.1 วัสดุ

3.2.1.1 วัสดุการเกษตร

- ดิน
- กระถาง และจานรอง
- กรรไกรตัดกิ่ง

3.2.1.2 วัสดุการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ขวดแก้ว
- จานแก้ว
- ขวดแอลกอฮอล์
- ใบมีดและด้ามมีดผ่าตัด
- กระบอกตวง
- ปีกเกอร์
- ปิเปตต์
- ขวดปรับปริมาตร

3.2.1.3 วัสดุการสกัด และการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

- เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ปีกเกอร์ ฟลาสก์ จานแก้ว ขวดแก้ว ปิเปตต์ เป็นต้น

- เครื่องพลาสติกต่างๆ เช่น tip, ถังพลาสติก, microtube, หลอด centrifuge, ขนาด 15 ml และ 45ml, rack วางหลอด, ที่ดูดปิเปตต์ เป็นต้น

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- NH_4NO_3
- KNO_3
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- KI
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- KH_2PO_4
- H_3BO_3
- $\text{Na}_4\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{C}_{10}\text{H}_4\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Na_2EDTA)

3.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับการตรวจสอบเอนไซม์ ascorbate peroxidase

- Disodium hydrogenphosphate
- Sodium dihydrogen phosphate
- Disodium EDTA
- Polyvinyl pyrrolidone
- Phenyl sulfomyl fluoride
- Sucrose
- Ascorbate
- 3 – aminotriazole
- 30% hydrogenperoxide

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ SRAP

- ไนโตรเจนเหลว
- Cethyltrimethyl ammonium bromide
- Tris-HCl
- Sodium chloride
- disodium EDTA

- Sodium dodecyl sulfate
- Polyvinyl pyrrolidone
- β – mercaptoethanol
- Chloroform
- Isoamylalcohol
- Isopropanol
- RNase A
- Phenol
- Agarose
- Acrylamide
- bis – acrylamide
- Bromophenol blue
- Xylene cyanol
- Sucrose
- Boric acid
- Acetic acid
- Ethidium bromide
- MgCl_2
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Ultrapure water
- *Taq* polymerase
- Bind silane
- Repel silane
- Urea
- Ammonium persulphate
- N,N,N',N' – tetramethylethylenediamine
- Formamide
- Silver nitrate
- Ammonium hydroxide
- Sodium hydroxide
- Formaldehyde
- Sodium carbonate

3.2.5 วัสดุภัณฑ์

- ตะเกียงแก๊ส
- Laminar airflow

- ตู้และห้องควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส และแสง 18 ชั่วโมง
- Water bath
- Magnetic stirrer – hot plate
- เครื่องกวนสาร Vortex
- ตู้เย็น
- -20°C Freezer
- -80°C Freezer
- ถังเก็บไนโตรเจนเหลว
- heating box
- Refrigerated centrifuge
- Centrifuge
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาถูกละโซ่โพลีเมอเรส (PCR)
- Power supply
- ชุดแยกขนาดดีเอ็นเอแบบ horizontal agarose gel electrophoresis
- ชุดแยกขนาดดีเอ็นเอแบบ vertical polyacrylamide gel electrophoresis
- Orbital shaker
- Gel document (เครื่องดูเจลชนิดใช้แสง UV)
- Fume hood
- pH meter
- UV-spectrophotometer
- Autoclave
- Hot air oven

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดสอบยูคาลิปตัสในสภาพปลอดเชื้อเพื่อทดสอบความเครียดในสภาพที่มีแคลเซียมสูง

การเลี้ยงยูคาลิปตัสในสภาพปลอดเชื้อสูตร MS6 ที่เติม benzylaminopurine 500 ppm และน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มปริมาณยอด โดยจากยอดเริ่มต้น 1 ยอดจะได้ยอดใหม่ 7-10 ยอดในยูคาลิปตัสทั้ง 3 พันธุ์ (วน2, CT76, P7) หลังจากนั้นทำการแยกยอดแต่ละยอดเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม (MS6) และเพิ่ม CaCO_3 ความเข้มข้นต่างๆ (0, 100, 200, 300, 400 mM) ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของ CaCO_3 0, 100, 200 และ 300 mM นั้นให้ผลไม่แตกต่างกันคือ พืชมีการเจริญปกติ ใบสีเขียวสด ไม่มีอาการของความเครียด แต่ในอาหารที่เติม CaCO_3 ความเข้มข้น 400 mM พบว่าพืชแสดงอาการเครียด ทั้งลำต้นและใบมีสีแดงเกิดขึ้น โดยพบว่ายูคาลิปตัส วน2 และ P7 แสดงอาการดังกล่าวมากกว่า CT76 เมื่อนำยูคาลิปตัสไปทำการตรวจวัดความเครียดจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ascorbate peroxidase โดยตั้งสมมติฐานว่าสารที่ทำให้เกิดความเครียดตัวหนึ่งได้แก่ H_2O_2 พืชที่สามารถทนต่อความเครียดได้ดี จำเป็นต้องมีเอนไซม์ ascorbate peroxidase ปริมาณมากเพื่อสลาย $\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ในสภาพที่มี ascorbate ดังภาพ



ภาพที่ 1 ยูคาลิปตัสที่ได้เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสูตร MS6 ที่เติม BAP 500 ppm และน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์เพื่อชักนำให้เกิดยอดหลายยอด



ภาพที่2 ยูคาลิปตัสโคลน วาน2 ในอาหารที่ไม่มี CaCO_3 (แถวที่1) และ ในอาหารที่มี CaCO_3 (แถวที่2)



ภาพที่3 ยูคาลิปตัสโคลน P7 ในอาหารที่ไม่มี CaCO_3 (แถวที่1) และในอาหารที่มี CaCO_3 (แถวที่2)



ภาพที่4 ยูคาลิปตัสโคลน CT76 ในอาหารที่ไม่มี CaCO_3 (แถวที่1) และในอาหารที่มี CaCO_3 (แถวที่2)

เมื่อทำการวัดปฏิกิริยาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตรพบว่าให้ผลดังนี้

ยูคาลิปตัส	ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงในสภาพที่มี CaCO_3 ความเข้มข้น (mM)					%ของ 400 mM ที่เพิ่มขึ้น
	0	100	200	300	400	
วน2	1.240	1.250	1.260	1.268	1.277	2.98
P7	1.165	1.178	1.182	1.189	1.242	6.60
CT76	1.265	1.297	1.356	1.400	1.424	12.57

ตารางที่1 ค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร

จากผลการทดลองเมื่อดูความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของ CaCO_3 ที่ 400 mM ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดกับ ความเข้มข้นของ CaCO_3 ที่ 0 mM ที่มีค่าต่ำสุดพบว่า ยูคาลิปตัส วน2 P7 และ CT76 มีการสร้างเอนไซม์ ascorbate peroxidase เพิ่มขึ้น 2.98, 6.60 และ 12.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สีแดงของลำต้นและใบ เมื่อประมวลผลร่วมกับลักษณะ จึงแสดงให้เห็นว่ายูคาลิปตัสพันธุ์ CT76 มีความทนทานต่อ oxidative stress ที่สูงกว่าวน2 และ P7 ซึ่งสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้น้อยกว่า เอนไซม์นี้จึงคาดว่าสามารถใช้ในการบ่งชี้พันธุ์ยูคาลิปตัสที่ทนทานหรืออ่อนแอในสภาพดินที่มีแคลเซียมได้ แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ ascorbate peroxidase นี้จะต้องมีความระมัดระวังอย่างยิ่งในช่วงของการบ่มเอนไซม์ให้ทำปฏิกิริยาจำเป็นต้องควบคุมให้เวลาของทุกตัวอย่างทดลองเท่ากับ 10 นาทีทั้งหมด ถ้าใช้เวลายาวนานกว่านี้จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

และถ้าใช้เวลาบ่มนานกว่านี้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้วตั้งแต่ 10 นาที จึงอยู่ในช่วง declining phase ทำให้การวัดเกิดการผิดพลาด

อย่างไรก็ตามการทดสอบยูคาลิปตัสในสภาพปลอดเชื้อสามารถทำได้โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่เติม

calcium carbonate 400mM

4.2 การทดสอบยูคาลิปตัสในสภาพดินธรรมชาติ 3 ชนิด

การปลูกยูคาลิปตัส 23 พันธุ์ในดินที่มีแคลเซียม ดินชุดปากช่อง และดินชุดตาคีที่มีแคลเซียม เป็นเวลา 60 วัน ในสภาพเรือนกระจก เพื่อตรวจสอบความทนทาน ให้ผลการทดสอบดังนี้

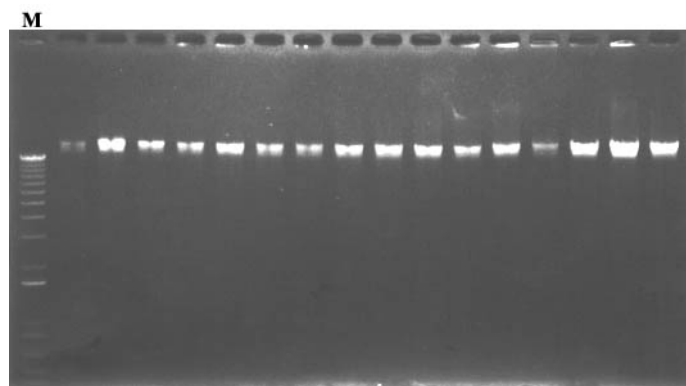
ยูคาลิปตัส	ความทนทานต่อ		
	ดินที่มีแคลเซียม	ดินชุดปากช่อง	ดินชุดตาคีที่มีแคลเซียม
CT35	อ่อนแอ	ทนทาน	ทนทานปานกลาง
CT76	ทนทาน	ทนทาน	ทนทาน
CT118	ทนทาน	ทนทาน	ทนทานปานกลาง
CT137	ทนทานปานกลาง	ทนทาน	ทนทานปานกลาง
CT168	อ่อนแอ	ทนทาน	อ่อนแอ
CT186	อ่อนแอ	ทนทาน	อ่อนแอ
CT189	ทนทานปานกลาง	ทนทาน	ทนทานปานกลาง
CT197	ทนทานปานกลาง	ทนทาน	ทนทานปานกลาง
CT221	ทนทานปานกลาง	ทนทาน	ทนทานปานกลาง
CT236	ทนทานปานกลาง	ทนทาน	ทนทาน
CT280	ทนทานปานกลาง	ทนทาน	ทนทานปานกลาง
CT300	อ่อนแอ	ทนทาน	อ่อนแอ
CT393	ทนทาน	ทนทาน	ทนทาน
CT387	อ่อนแอ	ทนทาน	ทนทานปานกลาง
CT395	ทนทาน	ทนทาน	ทนทาน
CT397	ทนทาน	ทนทาน	ทนทาน
SF1	อ่อนแอ	ทนทาน	ทนทานปานกลาง
SF4	ทนทานปานกลาง	ทนทาน	ทนทานปานกลาง
SF7	อ่อนแอ	ทนทาน	อ่อนแอ
SF8	ทนทาน	ทนทาน	ทนทาน
SF12	อ่อนแอ	ทนทาน	อ่อนแอ
SF13	ทนทานปานกลาง	ทนทาน	ทนทานปานกลาง
SF14	ทนทานปานกลาง	ทนทาน	ทนทาน

ตารางที่ 2 ความทนทานต่อดินชุดต่างๆ ของยูคาลิปตัส 23 สายพันธุ์

ในระหว่างการทดลองพบว่าตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ได้มานั้นเกิดการผิดพลาดบางตัวอย่าง และตัวอย่างที่ได้มานั้นไม่ได้มาพร้อมกัน ทำให้ไม่สามารถทดลองได้พร้อมกันทุกตัวอย่างในคราวเดียวกัน ผลการทดลองจึงอาจมีความแตกต่างกันบ้าง แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองก็มี CT76 เป็นตัวควบคุม

4.3 การสกัดดีเอ็นเอ

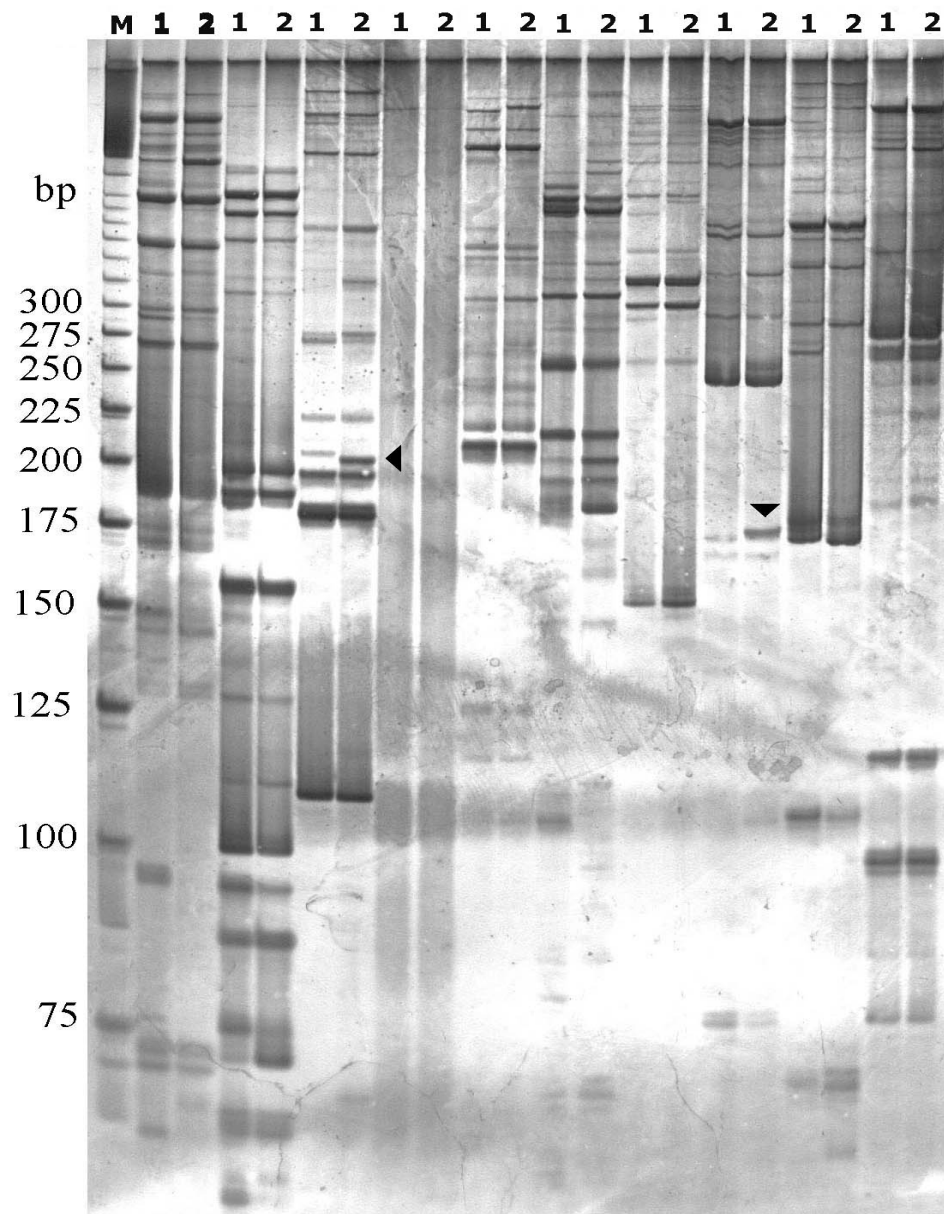
เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบยูคาลิปตัสด้วยบัฟเฟอร์ 2X CTAB และทำการตรวจคุณภาพดีเอ็นเอด้วย UV spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 260 nm, 280 nm และหาอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสง $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ พบว่ามีค่าระหว่าง 1.6-1.8 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ดีเอ็นเอมีคุณภาพที่ดี และทำการตรวจคุณภาพด้วยเทคนิค horizontal agarose gel electrophoresis เพื่อยืนยันผล (ดังรูป) ก็พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดีเหมาะสมที่จะนำไปทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไป



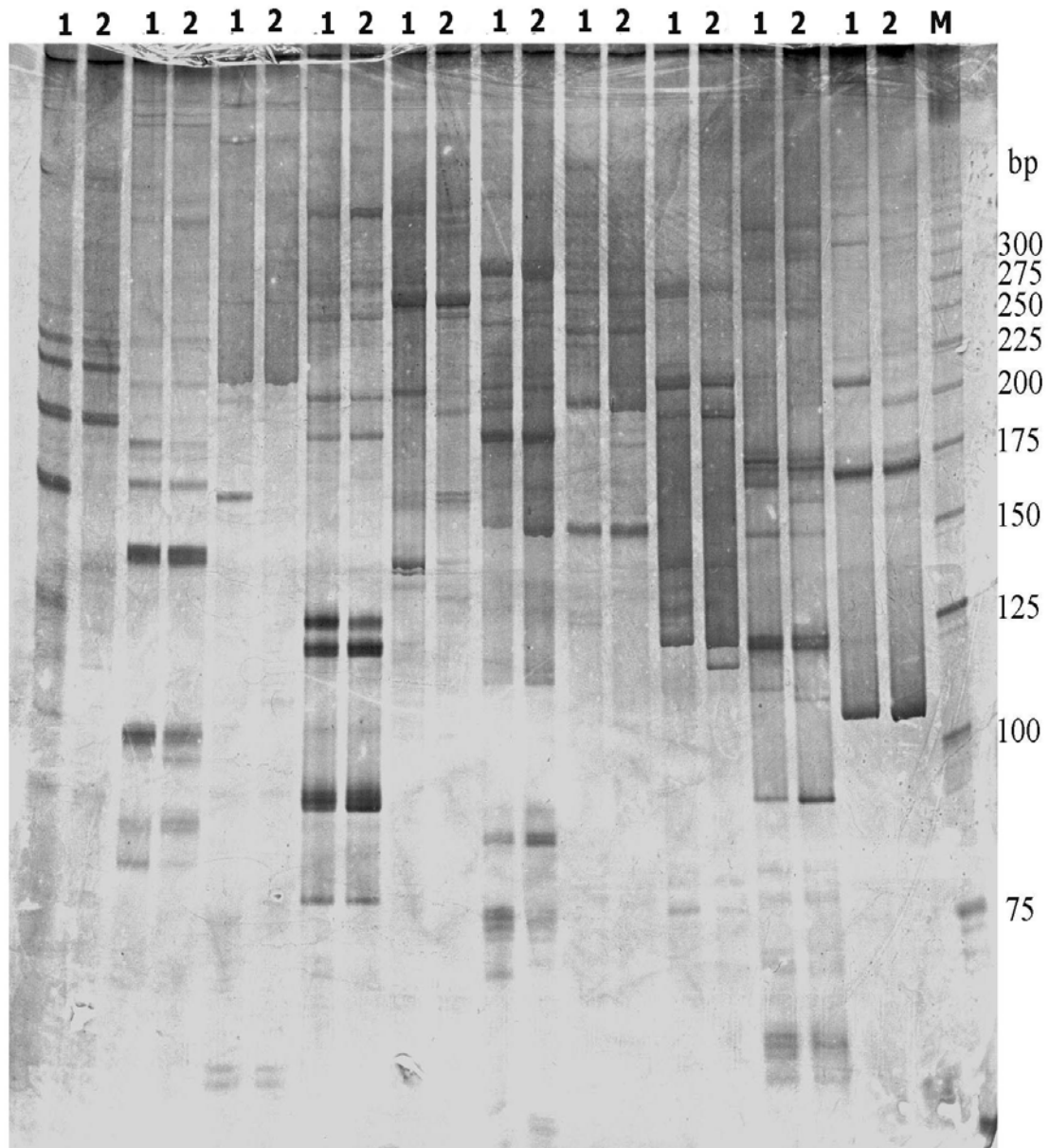
ภาพที่ 5 แอบริดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบยูคาลิปตัส (M = แอบริดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder)

4.4 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

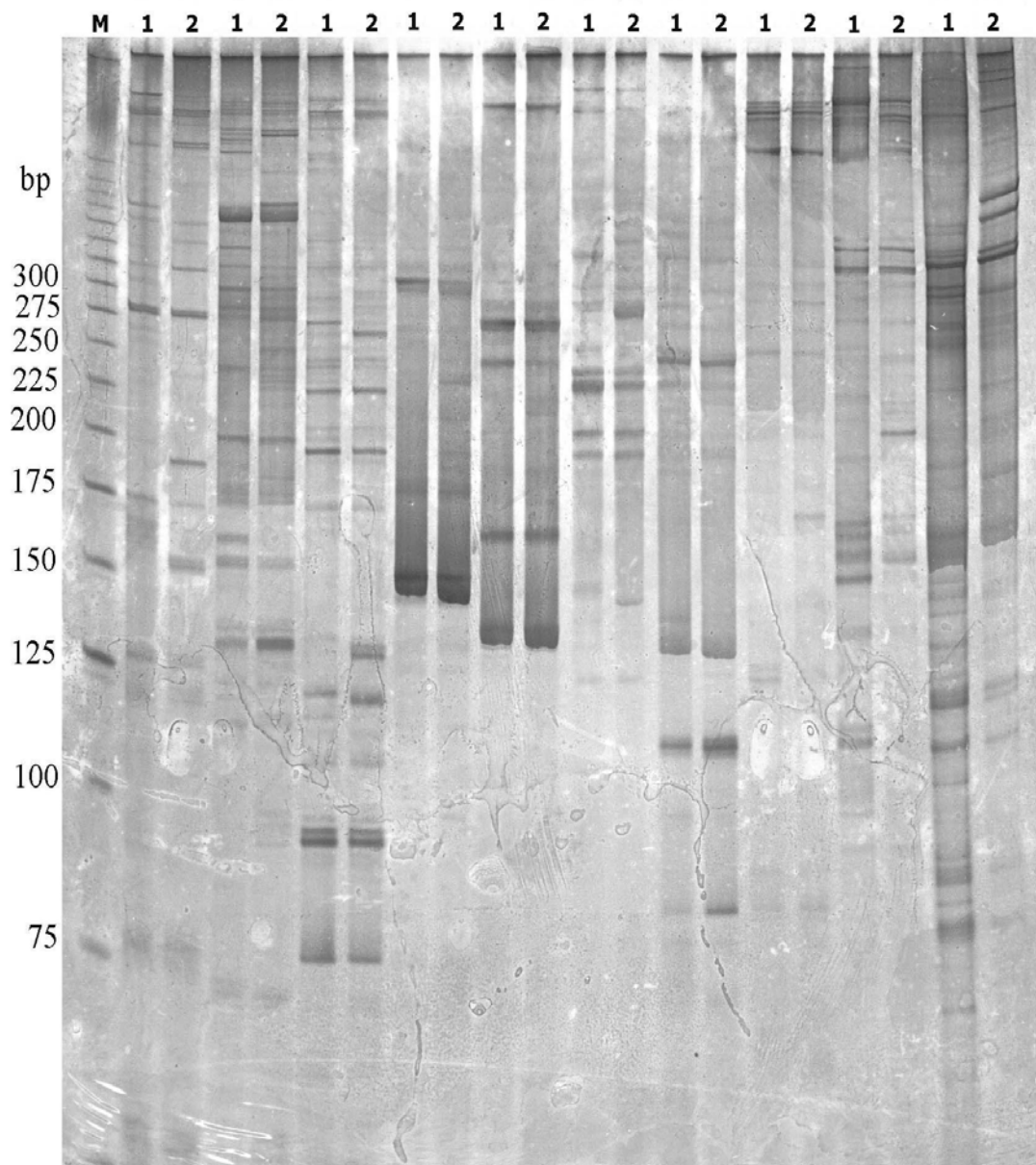
การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาสุกโซ่ชนิด SRAP ด้วยไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นมา 16 ชนิด และนำมาจับคู่เพิ่มปริมาณ 30 คู่ และแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค vertical denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า 300 โวลต์ และย้อมแอบริดีเอ็นเอด้วย silver nitrate โดยใช้ดีเอ็นเอจากต้นที่ทนทาน และอ่อนแอต่อสภาพดินที่มีแคลเซียม ผลการทดลองพบว่ามี 2 แอบริขนาด 200 คู่เบสและ 170 คู่เบสจากคู่ไพรเมอร์ C3/D3 และ C8/D8 ที่แตกต่างระหว่างพันธุ์ทนทานและอ่อนแอ ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ SRAP ดังภาพที่ 6 เมื่อทดสอบกับทุกตัวอย่างก็ไม่สามารถแยกได้ ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากไพรเมอร์มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่น้อยเกินไปเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอก็จะสามารถเพิ่มได้หลายชิ้นส่วน



ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ SRAP ในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทน และไม่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง โดยใช้ไพรเมอร์ C1-D1, C2-D2, C3-D3, C4-D4, C5-D5, C6-D6, C7-D7, C8-D8, C8-D1, C7-D2 ตามลำดับ (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder 1 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ไม่ทนต่อดินที่มีแคลเซียมสูง, 2 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ที่ทนต่อดินที่มีแคลเซียมสูง)



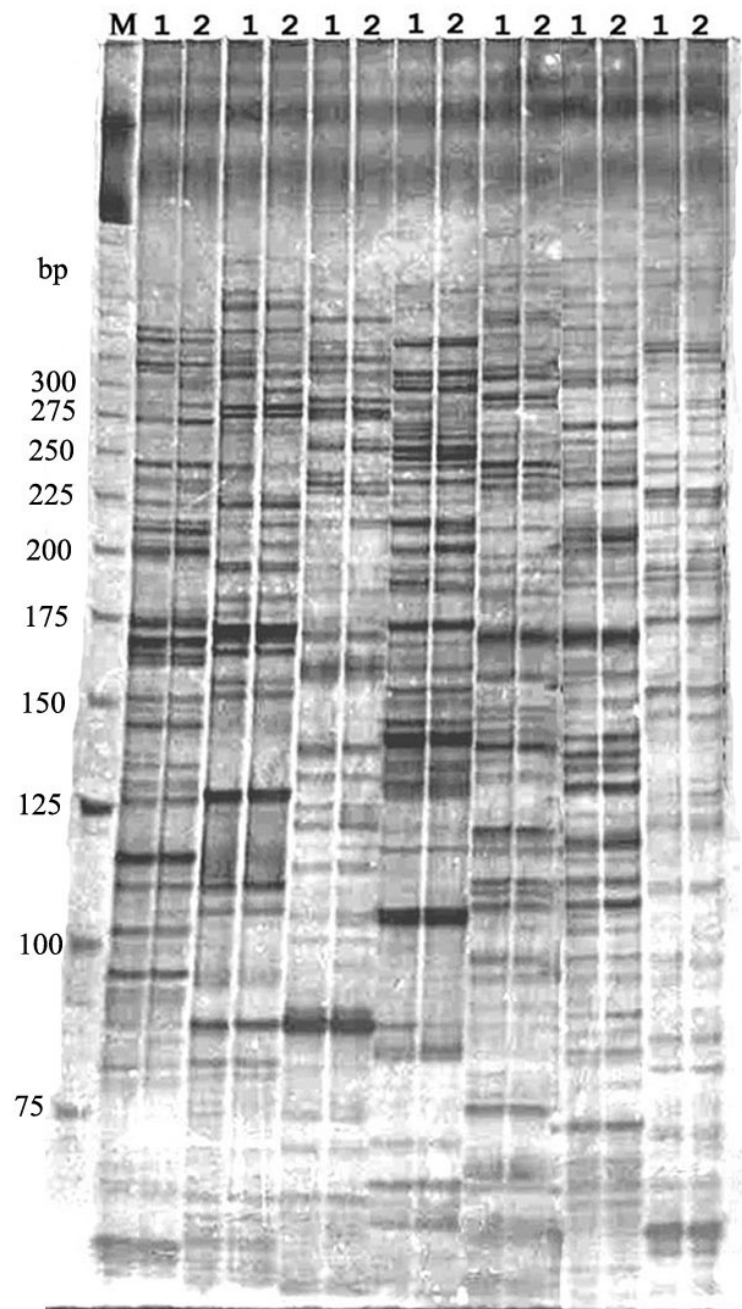
ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ SRAP ในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทน และไม่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง โดยใช้ไพรเมอร์ C6-D3, C5-D4, C3-D6, C2-D7, C1-D8, C2-D1, C3-D1, C1-D2, C2-D3, C5-D2 ตามลำดับ (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder 1 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ไม่ทนต่อดินที่มีแคลเซียมสูง, 2 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ที่ทนต่อดินที่มีแคลเซียมสูง)



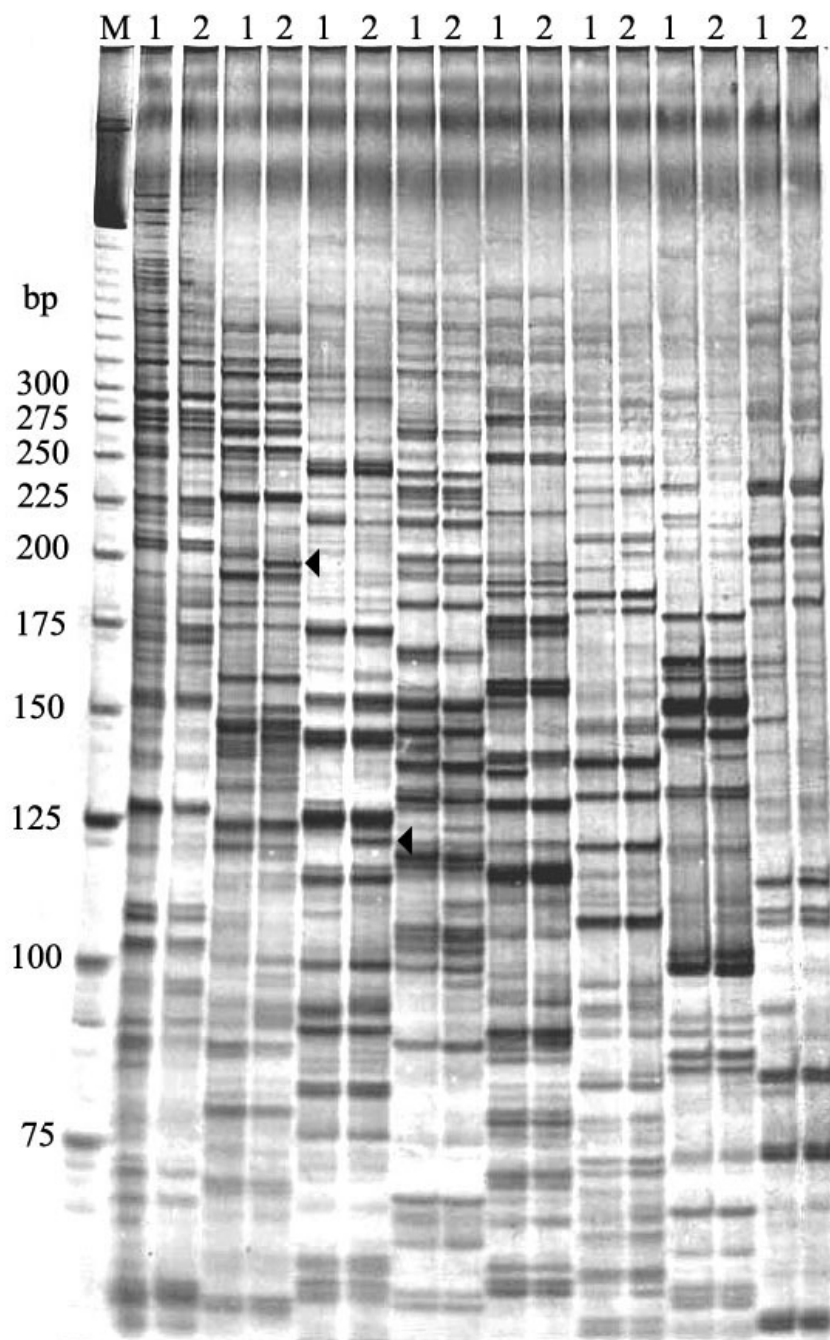
ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ SRAP ในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทน และไม่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ C4-D5, C3-D2, C1-D3, C6-D2, C5-D3, C7-D3, C6-D4, C7-D4, C1-D7, C2-D8 ตามลำดับ (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder 1 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ไม่ทนต่อดินที่มีแคลเซียม, 2 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ที่ทนต่อดินที่มีแคลเซียม)

4.5 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP

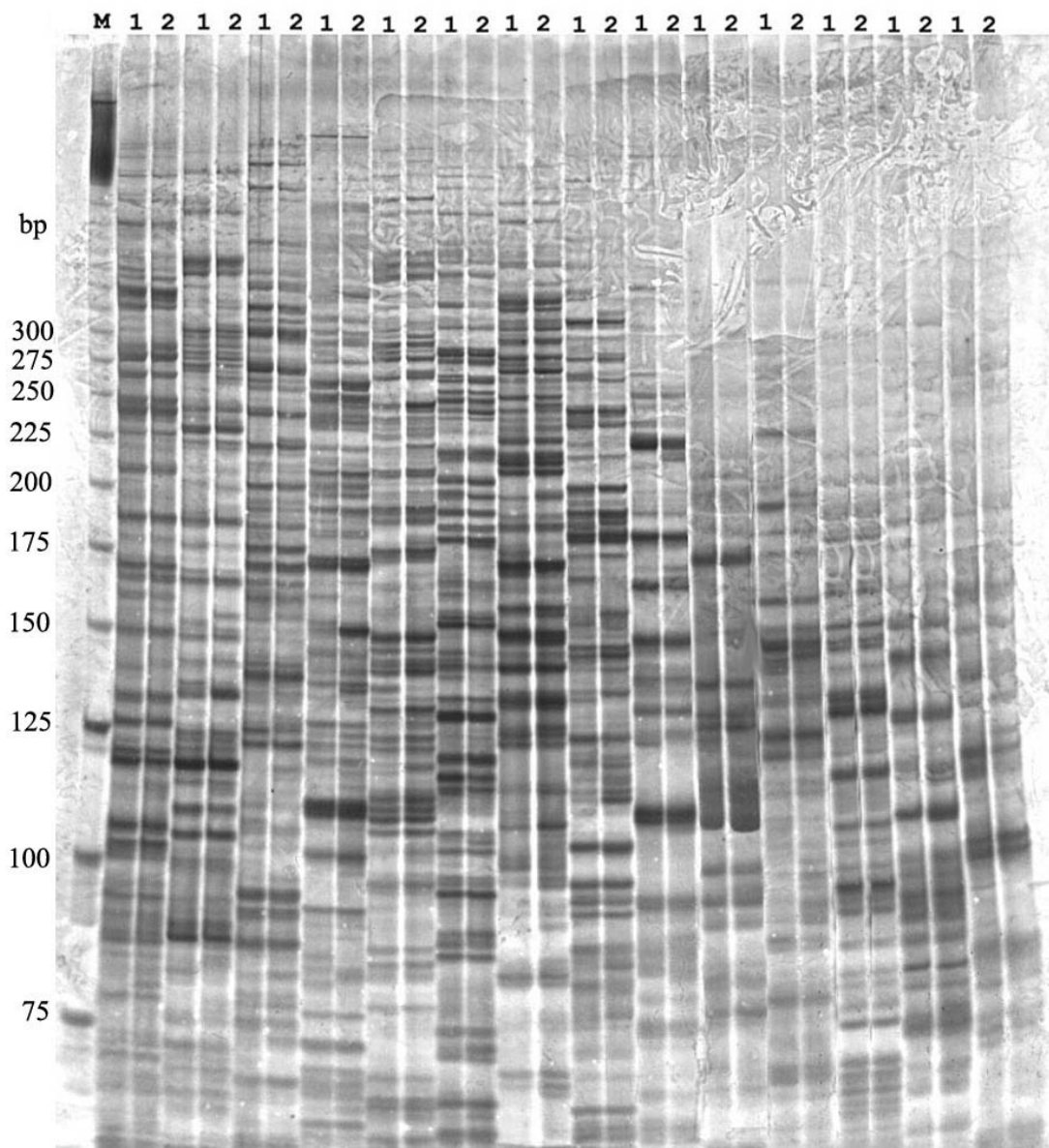
การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นมา 29 คู่ และแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค vertical denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า 300 โวลต์ และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย silver nitrate โดยใช้ดีเอ็นเอจากต้นที่ทนทานและอ่อนแอต่อสภาพดินที่มีแคลเซียม ผลการทดลองพบว่า มีไพรเมอร์ 2 คู่ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพันธุ์ที่ทนทานและอ่อนแอ เมื่อนำไพรเมอร์คู่ต่างๆ ดังกล่าวไปทำการตรวจสอบกับตัวอย่างทั้งหมดก็ไม่สามารถตรวจความแตกต่างได้ ซึ่งผลดังกล่าวอาจเป็นเช่นเดียวกับผลของ SRAP



ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาถูกโซ่ AFLP ในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทน และไม่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ M-CAC/E-AAC, M-CAG/E-AAC, M-CTA/E-AAC, M-CTC/E-AAC, M-CAT/E-AAG, M-CTT/E-AAG, M-CAA/E-AAG ตามลำดับ (1 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ไม่ทนต่อดินที่มีแคลเซียม, 2 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ที่ทนต่อดินที่มีแคลเซียม, M = แอบริเคชันมาตรฐาน 25 bp ladder)



ภาพที่ 10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาถูกโซ่ AFLP ในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทน และไม่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ M-CTA/E-ACA, M-CAA/E-ACC, M-CAA/E-ACG, M-CTC/E-ACG, M-CAT/E-AGC, M-CAC/E-AGG, M-CAT/E-AGG, M-CTC/E-AGG ตามลำดับ (1 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ไม่ทนต่อดินที่มีแคลเซียม, 2 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ที่ทนต่อดินที่มีแคลเซียม, M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp ladder)



ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ AFLP ในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทน และไม่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ M-CTG/E-AGG, M-CTT/E-AAC, M-CAT/E-AAC, M-CAA/E-AAC, M-CTC/E-AAG, M-CTA/E-AAG, M-CAC/E-AAG, M-CAG/E-AAG, M-CTC/E-ACT, M-CTA/E-ACG, M-CAC/E-ACT, M-CAA/E-ACG, M-CTC/E-ACG, M-CTG/E-AGC ตามลำดับ (1 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ไม่ทนต่อดินที่มีแคลเซียม, 2 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ที่ทนต่อดินที่มีแคลเซียม, M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp ladder)

4.6 ผลการวิเคราะห์ดินและการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากยีนที่จำเพาะ

ผลการวิเคราะห์ดินทั้ง 3 ชนิดมีค่าตามตาราง พบว่า ธาตุที่ควรจะมีผลต่อการอ่อนแอของยูคาลิปตัส เนื่องจากความแตกต่างของปริมาณธาตุอาหารของดินชุดปากช่องซึ่งเป็นดินที่ต้นยูคาลิปตัสเจริญเติบโตได้ปกติ ธาตุอาหารที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องได้แก่ Ca, Mg, SO_4^{2-} , Cl, Mn, Fe, Al แต่เนื่องจากพืชแสดงอาการ chlorosis ดังนั้น ธาตุที่ผู้วิจัยเลือกคือ Mn, Fe และ Zn แม้ว่าปริมาณ Zn นั้นไม่มีความแตกต่าง แต่ผู้วิจัยเลือกเพื่อต้องการตรวจสอบให้แน่ใจหรือใช้เป็นตัวควบคุม ดังนั้นยีนที่ทำการคัดเลือกมาได้แก่ *ZIP1*, *ZIP4*, *NRAMP1*, *IRT1* และ *Ys1*

ชุดดิน	pH	Total N %	ปริมาณ (ppm)											
			P	K	Ca	Mg	Na	SO ₄ ²⁻	Cl	Zn	Mn	Fe	Cu	Al
ดินหินปูน	8.3	0.08	1*	60	6,600*	600*	98.9	9.4*	492.4*	1.6	1.1*	1.3*	0.5	2.3*
ดินชุดปากช่อง	5.2	0.13	4	60	640	180	85.7	93.8	164.1	2.1	97.5	3.5	0.6	10.3
ดินชุดตาคี	8.0	0.15	18	100	7,800	280	94.8	12.5	246.1	2.2	3.8	1.8	0.5	2.0

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ดินทั้ง 3 ชนิด

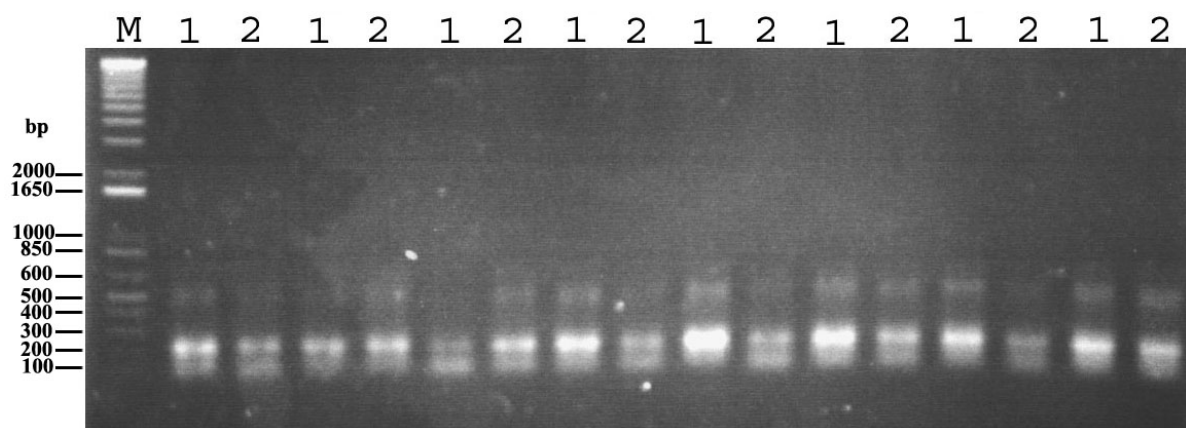
ZIP1

ZIP1 เป็นยีนที่ควบคุมการขนส่งสังกะสีจากรากไปยังยอดและลำต้นได้ทำการค้นหายีน ZIP1 ของพืชใบเลี้ยงคู่ จากฐานข้อมูลใน GenBank และคัดเลือกยีน ZIP1 ของ Arabidopsis ซึ่งมีความยาว 1,215 คู่เบส (ภาพที่12) หลังจากนั้นก็ทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอประมาณ 500 คู่เบสโดยใช้ข้อมูลการจับคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสเท่ากับ 55, 55.9, 57.8, 59.3, 61, 62.7, 68.9 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าผลที่ได้เกิดแถบดีเอ็นเอ 3 แถบได้แก่แถบดีเอ็นเอประมาณ 500, 200 และ 100 คู่เบสที่อุณหภูมิทุกอุณหภูมิและตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ทนทานและไม่ทนทานต่อดินเหนียว (ภาพที่13)

```
CAGTGTGAGTAATTTAGCAAGAACATAAATATCTTAAACTCATGTCTGAATGTGGATGTTTTTCGGCAA
CAACTATGTTGAGAATTTGTGTAGTATTGATAATATGTTTGCATATGTGTTGTGCCCTCGAGTGATTGTA
CAAGTCACGATGATCCTGTGTCTCAAGACGAAGCAGAGAAAAGCGACGAAGCTAAAGCTTGGTTTCGATAG
CTTTACTTCTTGTAGCCGGAGGAGTCCGGCGTGAGTCTACCGTTGATCGGGAAAAGGATTCCGGCGTTTAC
AACCGGAAAATGATATCTTCTTCATGGTGAAAGCTTTTGCTGCAGGAGTGATCCTCTGCACAGGTTTCG
TTCATATCTTACCAGACGCGTTTCGAGAGATTGAGCTCTCCATGTCTTGAGGACACTACAGCTGGGAAGT
TCCCGTTTGCTGGTTTTGTAGCGATGCTGTGCGCGATGGGGACTCTTATGATCGACACATTCGCGACAG
GGTATTACAAGAGGCAACATTTTAGCAATAACCATGGGAGCAAGCAAGTGAACGTAGTAGTAGATGAAG
AAGAGCATGCGGGTCATGTTTCACATTACACGCACGCTAGTCACGGACACACACATGGTTTCGACCGAGT
TGATCAGAAGACGTATAGTGTGCGAGGTGCTTGAGATTGGGATAGTTGTGCATTCGGTTATTATAGGGA
TATCACTTGAGCTTCACAGAGCATAGACACCATAAAGCCACTCATGGCTGCACTATCTTTCCATCAGT
TCTTTGAAGGTCTTGCCCTCGGTGGATGCATCTCCCTGGCGGATATGAAGTCGAAATCGACAGTGCTAA
TGGCGACATTTTTCTCGGTGACGGCGCCACTTGGGATAGGAATAGGGTTGGGGATGTCAAGTGGTTTAG
GCTACAGGAAAGAGAGCAAAGAGGCAATAATGGTGGAAGGAATGTTGAATGCTGCATCTGCTGGGATAC
TCATATACATGTCACTTGTTGATCTTCTTGCTACTGATTTTATGAATCCAAGATTGCAATCCAATCTCT
GGCTTCACCTTGCTGCTTATCTCTCTCTCGTCTAGGCGCAGGTTCCATGTCTCTCTCGCCATCTGGG
CCTGATTCTTGATCTGAACTAACAACAAACAAACAAACAAATGCCGCTCTTTTTTCTCAAATCTGTAATG
GTGTTTCTAATCTCAGAATCAATACTATTCTATCTTGAACAC
```

ภาพที่12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ZIP1 ของ *Arabidopsis thaliana* ที่ได้จากฐานข้อมูล

GenBank



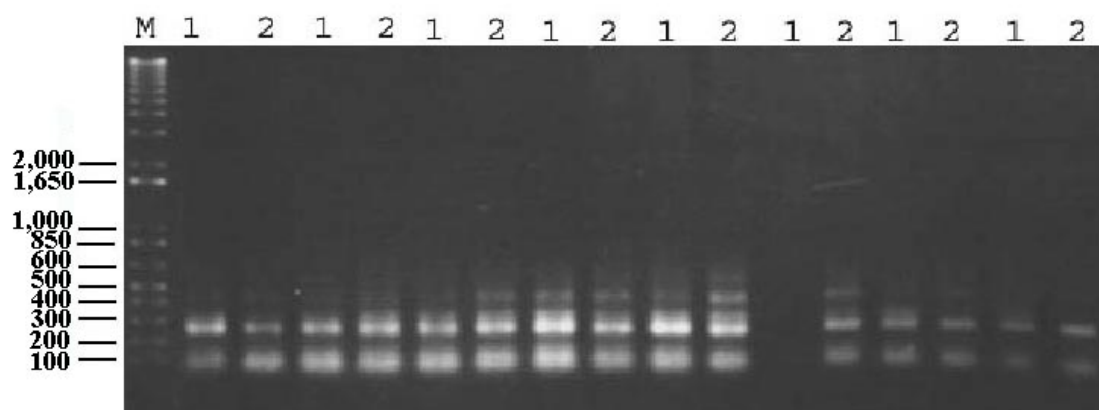
ภาพที่13 ผลจากปฏิกิริยาถูกละโพลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน ZIP1 โดยใช้ข้อมูลในการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต่างๆ กันได้แก่ 55, 55.9, 57.8, 59.3, 61.0, 62.7, 68.9 และ 70 องศาเซลเซียสตามลำดับ (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Plus ladder, 1 = ยูคาลิปตัสไม่ทนทานต่อดินเหนียว, 2 = ยูคาลิปตัสทนทานต่อดินเหนียว)

ZIP4

ZIP4 เป็นยีนที่ควบคุมการขนส่งสังกะสีโดยทั่วไป ผู้วิจัยได้ทำการค้นหายีน *ZIP4* ของพืชใบเลี้ยงคู่ จากฐานข้อมูลใน GenBank และคัดเลือดยีน *ZIP4* ของ *Arabidopsis* ซึ่งมีความยาว 1,361 คู่เบส (ภาพที่14) หลังจากนั้นก็ทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอประมาณ 500 คู่เบสโดยใช้อุณหภูมิการจับคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสเท่ากับ 55, 55.9, 57.8, 59.3, 61, 62.7, 68.9 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าผลที่ได้เกิดแถบดีเอ็นเอ 3 แถบได้แก่แถบดีเอ็นเอประมาณ 500, 280 และ 100 คู่เบสที่อุณหภูมิทุกอุณหภูมิและตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ทนทานและไม่ทนทานต่อดินเหนียวปน (ภาพที่15)

```
AGAAGAATAAACTCTTGTTCCTCCATGATCTTCGTCGATGTTCTTTGGAAATTGTTTCCTCTATACTCGTT
TGGATCAGGAAGAGACTCTCTCTCAGAGTCCATTTTGCAGATCATTTCCCGAGACAATGGCTTCTTCTAC
CACTAAAATCCTCTGTGATGCTGGCGAATCAGACCTCTGTAGAGACGATTCTGCTGCATTTCTCCTTAA
GTTTGTAGCCATTGCCTCCATTCTACTAGCTGGAGCTGCTGGTGTAGCCATACCTCTCATTGGCAGGAA
CCGCCGGTTTCTTCAAACCGAGGGGAAATCTCTTTGTAGCTGCTAAAGCCTTTGACAGCTGGTGTCACTACT
CGCCACCGGCTTTGTCCATATGCTTGCAGGTGGCACAGAAGCTCTGAGTAATCCGTGTTTACCGGATTT
TCCGTGGTCTAAGTTTCCCTTTCCCGGGTCTTTGCAATGGTTGCTGCTTTAGCTACTCTGCTTGTGTA
TTTCATGGGGACACAGTACTATGAGAGGAAGCAAGAGAGGAATCAGGCTGCTACTGAAGCCGCTGCTGG
TAGTGAAGAGATTGCTGTTGTTTCTGTGGTTGGGGAAAGAGTGACCGATAATAAAGTGTGTTGGTGAAGA
AGACGGTGGCGGGATTACATTTGTCGGCATTTCGTGCACATGCTGCTACCCATAGGCATAGTCACCTCTAA
TAGTCATGGTACATGTGATGGACATGCTCATGGACATTACACACGGACATATGCACGGGAATTCAGATGT
TGAAAATGGAGCTAGGCATGTTGTTGTTTCTCAGATATTGGAGCTCGGGATTGTGTCGCACTCAATCAT
CATCGGTTTATCCCTGGGGGTATCAGAGTCTCCATGCACGATCAGGCCTCTTATTGCAGCTCTGTCATT
TCACCAGTTCTTTGAAGGATTTGCGCTCGGAGGCTGCATCTCTCAGGCACAGTTCAGGAACAAATCAGC
GACCATAATGGCTTGCTTCTTTGCGCTAACACACCATTAGGGATCGGGATTGGAACCTGCAGTGGCCTC
ATCTTTCAACTCGCATAGCCCTGGAGCTTTGGTCACTGAGGGGATACTGGACTCGCTGTCAGCTGGAAT
ACTGGTGTACATGGCTCTGGTGGACCTCATCGCAGCTGATTTTCTGAGTAAGAGGATGAGTTGTAATTT
GAGGCTTCAAGTTGTGTCTTATGTAATGTTGTTCCCTTGAGCTGGACTTATGTCTGCTCTCGCCATTTG
GGCTTAGCTCTTAGATTACATATTATCTACTGTAGAATCAAATAATATACTGCTCTCGCAACTTCATAT
TTTTGCCTTGATTTCATATGAATATAATAGACAAGGGAGCCTATTAGAAAT
```

ภาพที่14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ZIP4* ของ *Arabidopsis thaliana* ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank



ภาพที่15 ผลจากปฏิกิริยาถูกละโซโพลีเมอร์สโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *ZIP4* โดยใช้อุณหภูมิในการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต่างๆ กันได้แก่ 55, 55.9, 57.8, 59.3, 61.0, 62.7, 68.9 และ 70 องศาเซลเซียสตามลำดับ (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Plus ladder, 1 = ยูคาลิปตัสไม่ทนทานต่อดินเหนียวปน, 2 = ยูคาลิปตัสทนทานต่อดินเหนียวปน)

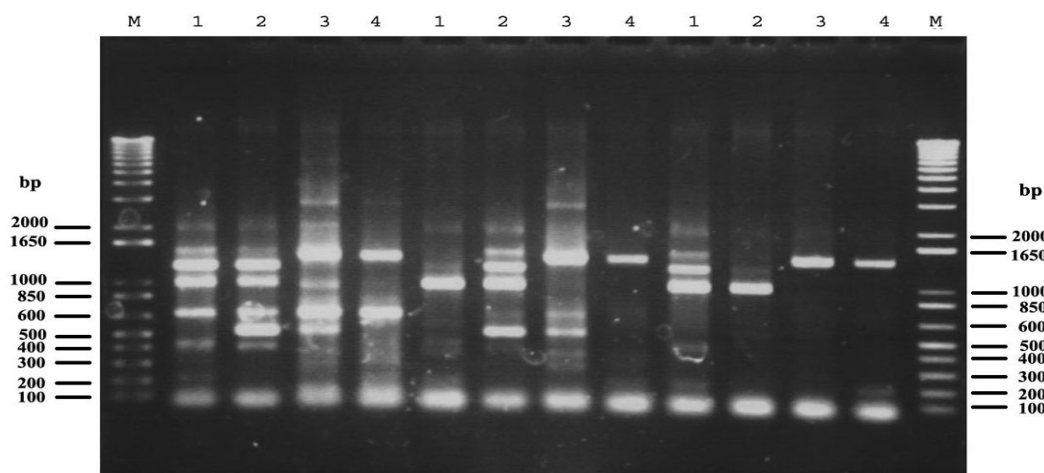
NRAMP1

NRAMP1 เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งเมงกานีสจากรากไปยังส่วนต่างๆ ของลำต้น ผู้วิจัยได้ทำการค้นหายีน *NRAMP1* ของพืชใบเลี้ยงคู่ จากฐานข้อมูลใน GenBank และคัดเลือกยีน *NRAMP1* ของ *Arabidopsis* ซึ่งมีความยาว 1,838 คู่เบส (ภาพที่16) หลังจากนั้นใช้ข้อมูลการจับคู่ของของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสเท่ากับ 53, 56 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 53 และ 56 องศาเซลเซียสนั้น ได้แถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบ จึงเพิ่มอุณหภูมิการจับคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป็น 59 องศาเซลเซียส พบว่าเกิดแถบเฉพาะที่ 1500 คู่เบสทั้งตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ทนทานและไม่ทนทานต่อดินเนือปนหรือดินที่มีแคลเซียม แต่จากการสังเกตพบว่ามีความผันแปรของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ annealing ต่างๆ ดังนั้นจากการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ข้อมูล annealing ที่ 59 องศาเซลเซียส ที่เกิดแถบดีเอ็นเอ 1 แถบทั้งในพันธุ์ที่ทนทานและไม่ทนทานต่อดินที่มีแคลเซียมในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส (ภาพที่17) เมื่อนำไปแยกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลโพลีอะครีลาไมด์ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต่างๆ แยกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่มียูคาลิปตัสพันธุ์ CT76 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนทานรวมอยู่ด้วยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 125 คู่เบส กลุ่มที่ 2 มีพันธุ์ SF7 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่ทนทานรวมอยู่ด้วยจะไม่มีแถบดีเอ็นเอที่พบในกลุ่มแรก แต่มีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า และกลุ่มที่3 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่มีแถบดีเอ็นเอทั้งสองแถบของกลุ่มที่1 และ 2 (ภาพที่18)

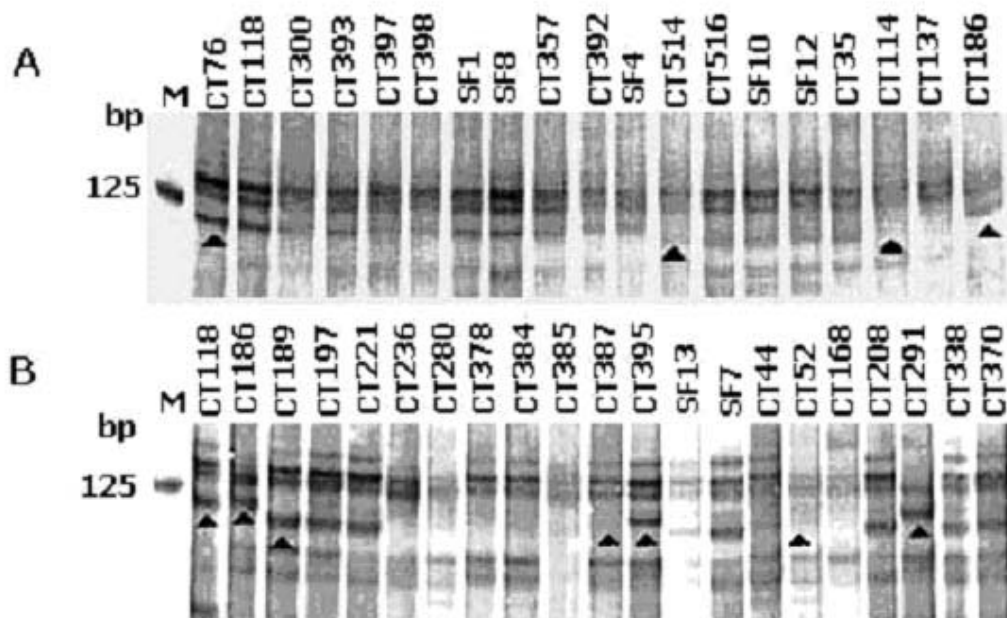
```
GTGGAGTTGTTGTATACTAAACAAGAAAGAGATTAGGAAGAGAGAGACGGCGATGGCGGCTACAGGATC
TGGACGGTCTCAATTCATTTCCAGTTCGCGCGGTAAACCGAAGCTTCTCCAATTCCTCCACTCATCGAGAA
CTCTGATTCTAATCAGATTATTGCTCTCTGAGAGAAGAGAGCTGGAAGAATTTCTTTGCTTACTTAGGCC
TGGTTTTCTTGTTTCAATCGCATATATTGATCCTGGAACTTTGAGACTGATCTGCAAGCTGGAGCACA
CTACAAGTATGAATTACTTTGGATCATATTGGTGGCCTCATGTGCGGCTTTGGTGATTCAATCTCTGGC
TGCTAATCTTGGTGTGTGCACAGGAAAAACATTTGGCTGAGCAATGTAGAGCCGAGTACTCCAAAGTTCC
AAACTTTATGTTATGGGTGCTTGCTGAAATTGCAGTAGTTGCTTGTGACATACCGGAAGTTATCGGAAC
AGCTTTTGCTCTGAACATGCTCTTTAGCATACCGGTGTGGATCGGTGTTCTTCTGACAGGCTTAAGTAC
GCTGATTCTTCTCGCACTTCAAAAATACGGGGTGAGAAAGCTGGAGTTCTTGATAGCGTTTCTTGTGTT
CACAATTGCAATATGCTTCTTTGTTGAGCTTCATTACTCAAAGCCAGACCCAGGAGAAGTCTTACATGG
TCTCTTTGTTTCTCAACTTAAAGGAAATGGTGCAACTGGTCTCGCAATCTCTTTGCTCGGAGCCATGGT
TATGCCGCATAATCTCTTCTCCACTCGGCCCTTGGTCTCTCGAGGAAAATCCCTCGTTCGCTTCTGG
TATCAAGGAAGCTTGCAAGTTTTACTTGATAGAAAGTGGATTGGCTCTAATGGTGGCCTTTCTCATAAAA
CGTCTCTGTAATATCAGTAAGCGGGGCTGTTTGTAATGCCCCCAACTTAAGCCCTGAAGATCGAGCTAA
TTGTGAGGATTTGGACTTAAACAAGGCTTCGTTTCTGCTACGGAACGTTGTGGGAAAATGGAGCTCAAA
GCTATTTGCAATCGCGCTTCTTGCTTCTGGTCAGAGCTCGACGATAACCGGAACCTTATGCTGGACAATA
TGTAATGCAGGGCTTTCTTGATCTCAGACTCGAGCCATGGCTCAGAACTTACTAACAAGATGTTTAGC
TATAATCCCAGTCTAATTGTTGCTCTCATCGGTGGTTCAGCTGGAGCTGGAAAGTTAATCATCATTTGC
CTCGATGATCTTATCCTTTGAGCTCCCGTTTGCGTTGGTTCCTCTCTCAAATTCACAAGTTGCAAAAC
CAAGATGGGTTACATGTCAACCCAATGGCGATTACAGCTTTGACTTGGGTCATTGGTGGTTTAAATCAT
GGGAATAAACATATACTATCTAGTAAGCAGTTTCATCAAACTGCTTATCCACAGTCATATGAAGCTTAT
CCTCGTCTGTTCTGTGGAATTTCTGGGTTTCGAGGCATTGCTCTCTATTTAGCCGCCATAGCTTACCT
TGTCTTCCGAAAAACAGAGTAGCCACTTCTCTTCTTATTTCAAGAGACTCACAAAATGTGGAGACACT
TCCAAGACAGGACATTGTCAACATGCAGTTACCATGTAGAGTATCTACCTCCGATGTTGACTGAGTCAT
CATTAAGCTTAGGATTCCAATAAAATAGATCTAAACCAAGTTCATAAAAACCTTTTCGATAGTGACTA
GAATAAAGGTTATATGAATCGGTTTGCGTCTTTCTTTAACCAGATCTTCGTAGGAAACAAACTTCTAA
TAACACATGGCATAATAAAATCATTTGCTTCCATTATCATATCAT
```

ภาพที่16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NRAMP1* ของ *Arabidopsis thaliana* ที่ได้จากฐานข้อมูล

GenBank



ภาพที่ 17 ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *NRAMP1* โดยใช้ อุณหภูมิการจับคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต่างๆ กัน ได้แก่ 53, 56 และ 59 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดย การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส (M = แลคตีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Plus ladder, 1 = ยูคาลิปตัส ไม่ทนทานต่อดินหินปูนสายพันธุ์ A, 2 = ยูคาลิปตัสไม่ทนทานต่อดินหินปูนสายพันธุ์ B, 3 = ยูคาลิปตัส ทนทานต่อดินหินปูนสายพันธุ์ CT118, 3= ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทนทานต่อดินหินปูนสายพันธุ์ CT76)



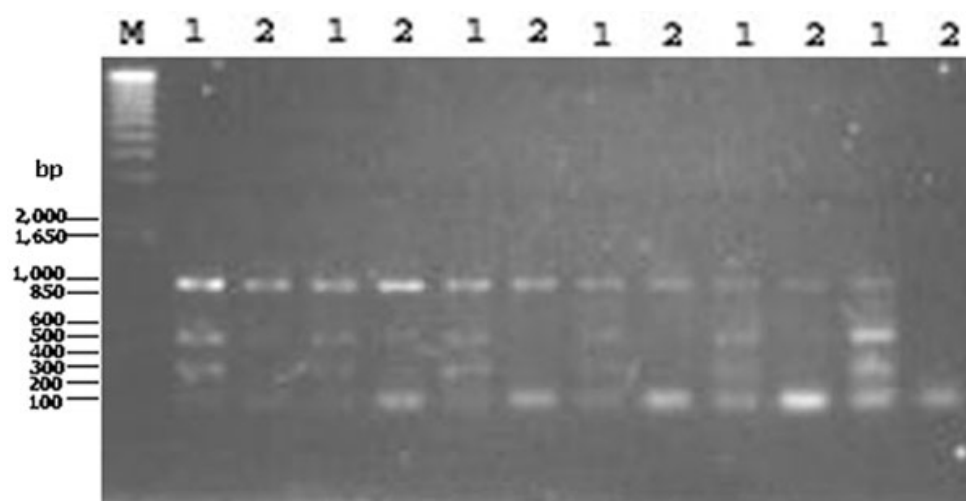
ภาพที่ 18 ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *NRAMP1* โดยใช้ อุณหภูมิการจับคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอที่ 59 องศาเซลเซียส โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน เจลโพลีอะคริลามัด

IRT1

IRT1 เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนขนส่งสังกะสี เหล็ก ทองแดง และแมงกานีสตัวหนึ่งจากรากพืชไปยังลำต้น ในพืชใบเลี้ยงคู่เช่น *Arabidopsis* ยีน *IRT1* จะควบคุมการสร้างโปรตีนที่นำเอา Fe(II) จากรากไปสู่ต้น โดยจะทำงานต่อจากยีน *FRO2* ซึ่งจะสร้างเอนไซม์เปลี่ยน Fe(III) ที่อยู่บริเวณรอบรากและจับกับแอมโมเนียมในรูป chelate เป็น Fe(II) ผู้วิจัยได้ทำการค้นหาลำดับยีน *IRT1* ของพืชใบเลี้ยงคู่จากฐานข้อมูลใน GenBank และคัดเลือกยีน *IRT1* ของ *Arabidopsis* ซึ่งมีความยาว 734 คู่เบส (ภาพที่19) หลังจากนั้นก็ทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอ โดยใช้ข้อมูลหามุมการจับคู่ของของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของยูคลิปตัสเท่ากับ 51, 53, 54, 55.2, 57 และ 58 องศาเซลเซียส ผลที่ได้เกิดแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ ได้แก่แถบดีเอ็นเอประมาณ 950, 500, 300 และ 100 คู่เบส พบว่าเกิดความแตกต่างในความเข้มของแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ที่ทนทานและอ่อนแอ แต่จำนวนแถบนั้นเท่ากัน นั่นคือไม่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่ทนทานและไม่ทนทานของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนี้

```
ACACAAACATTAAACAATCTAAACACACAACAATCCAAAAGAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAATGGCTTC
AAATTCAGCACTTCTCATGAAAACAATCTTCCTCGTACTCATTTTTGTCTCTTTTGCAATCTCTCCAGC
AACTTCAACTGCGCCGGAAGAATGTGGAAGCGAGTCAGCGAACCCGTGCGTCAACAAAGCTAAAGCTTT
GCCTCTCAAAGTCATAGCAATCTTCGTAATCCTCATTGCAAGCATGATTGGTGTGGAGCTCCTCTCTTT
TAGCCGTAACGTTTCGTTCCCTCCAACCGAGACGGAACATCTTCACTATCATTAAGTGTTTCGCCCTCCGG
GATCATCCTTGGAACCGGTTTTATGCACGTTTTTACCTGATTCTTTGAAATGTTGTTCATCTATATGTCT
TGAAGAGAACCCGTGGCATAAATTTCTTTCTCCGGATTTCTCGCTATGTTATCGGGTCTAATCACTCT
AGCCATTGACTCCATGGCCACGAGCCTATACACCAGCAAGAACGCAGTTGGTATCATGCCCCATGGTCA
TGGTCATGGTCACGGCCCCGCAAATGATGTTACCTTACCAATAAAAGAGATGATTTCGTCAAATGCACA
GCTCTTGCGATACCGAGTCATTGCCATGGTTCGTACGCACATATATACATACCGAATATCATTGTATTT
TAAATGACATATTACCGAATACATAGGTATATCTAACTTTCTAC
```

ภาพที่19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *IRT1* ของ *Arabidopsis thaliana* ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank



ภาพที่20 ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *IRT1* โดยใช้ข้อมูล ในการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต่างๆ กันได้แก่ 51, 53, 54, 55.2, 57 และ 58 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Plus ladder, 1 = ยูคลิปตัสไม่ทนทานต่อดินหินปูน, 2 = ยูคลิปตัสทนทานต่อดินหินปูน)

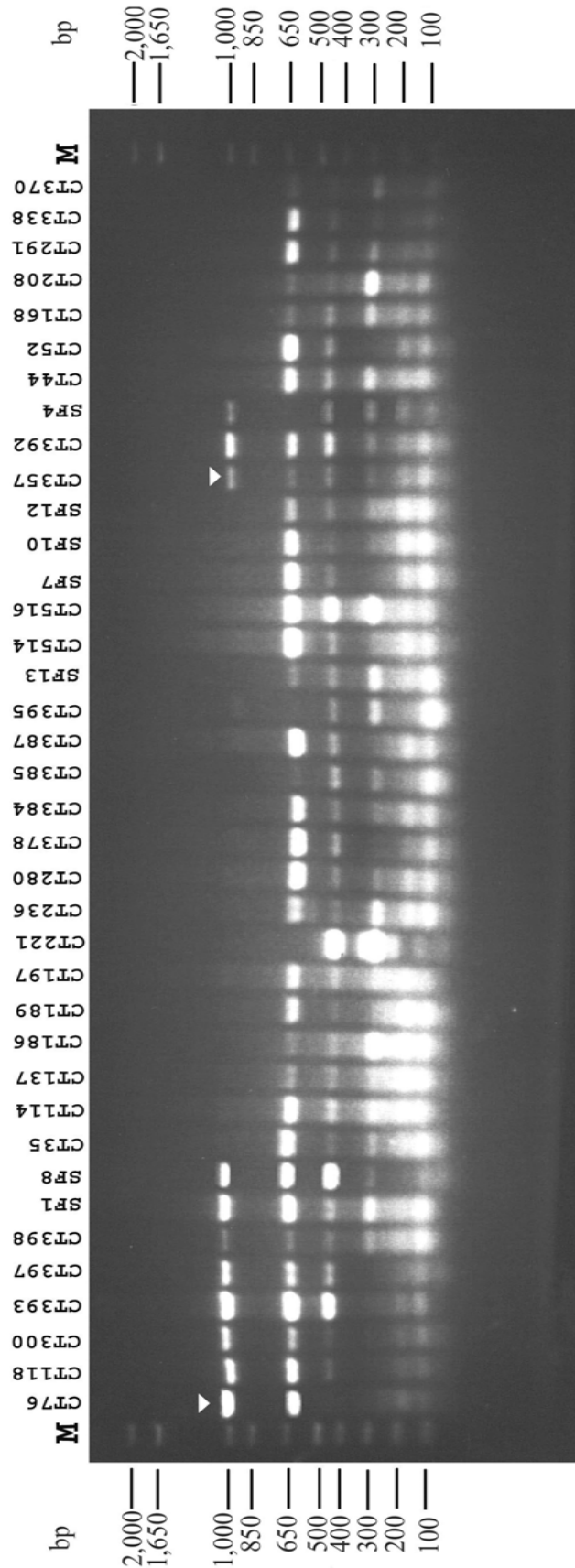
YsI

YsI เป็นยีนที่พบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่นธัญพืชต่างๆ ซึ่งจะสร้างสาร siderophore เพื่อไปจับกับ Fe(III) เป็นโครงสร้างเชิงซ้อน Fe(III)-siderophore complex และ *YsI* จะควบคุมการสร้างโปรตีนที่อยู่ที่เมมเบรนของรากพืช ทำหน้าที่นำโครงสร้างเชิงซ้อนดังกล่าวเข้าสู่รากพืชเพื่อลำเลียงสู่ลำต้นพืชต่อไป ดังนั้นจึงทำการค้นหาลำดับของยีน *YsI* จากฐานข้อมูล GenBank พบว่ายีน *YsI* ของข้าวโพดมีความยาว 2,461 คู่เบส (ภาพที่21) หลังจากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 7 แถบ ขนาด 1,000, 590, 450, 300, 180 และ 100 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอที่สนใจคือ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบส ซึ่งพบในกลุ่มยูคาลิปตัสที่มีพันธุ์ CT76 ซึ่งทนทานต่อดินที่มีแคลเซียม จากแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส ผู้วิจัยได้ทำการตัดแถบดีเอ็นเอแถบนี้ออกจากเจลอะกาโรส แล้วนำไปใส่ในพลาสมิด pGEM-T และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบสนี้ ขึ้นตอนต่างๆ ดังกล่าวเรียกว่าการโคลน (cloning) หลังจากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) และนำไปเปรียบเทียบกับลำดับของยีน *YsI* อีกครั้งหนึ่ง (alignment) ก็พบว่ายังคงเป็นลำดับส่วนหนึ่งของยีน *YsI* หลังจากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ สังเคราะห์ไพรเมอร์ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสพันธุ์ที่ทนทานและไม่ทนทาน ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่อุณหภูมิการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสต่างๆ กัน ผลที่ได้พบว่าได้แถบดีเอ็นเอประมาณ 650 คู่เบส ตามต้องการแต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่ทนทานและอ่อนแอ (ภาพที่23) ดังนั้นจึงทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่อีกครั้งหนึ่ง และสังเคราะห์ไพรเมอร์อีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นก็พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 550 คู่เบสตามต้องการ แต่ก็ไม่พบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่ทนทานและไม่ทนทาน (ภาพที่24)

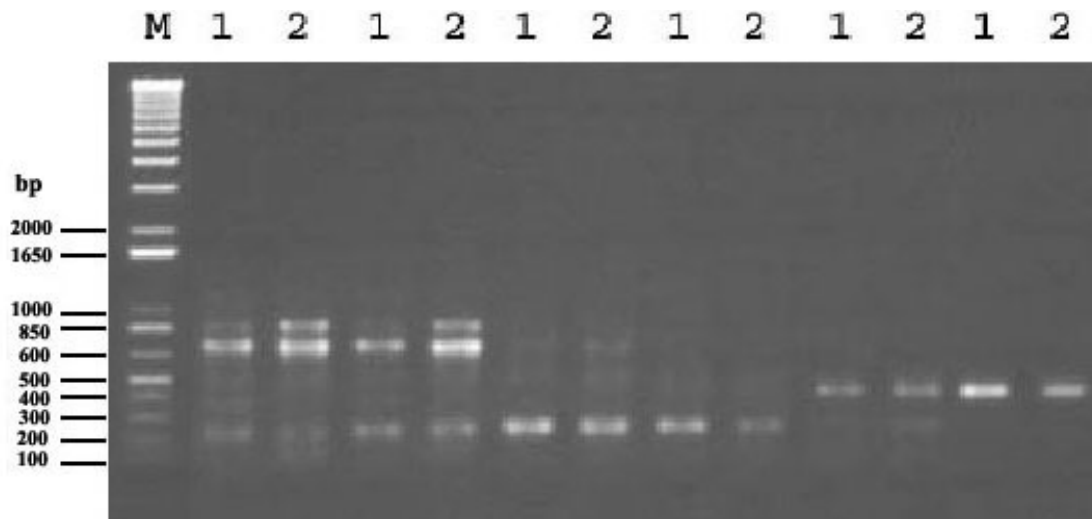
```
CTTAAGGGTTTGGACTAATGATTGTAATTGAGATTCTTAGATAACGAGTTCGTTGTTCTAAGTGAGATG
GCATGTGTAGTTGACATTTGAAGGATTTCTCTATATAAAATCCCGGCTACTATTAACATCTCAACCTCAC
CATCTTCTCTTGATCGAGGCAGGGATCAAGCGACCGATACCCGCCATGGACCTTGCACGGAGAGGCGGT
GCCGCAGGCGCGGACGACGAGGGGGAGATCGAGAGGCACGAGCCGGCGCCCGAGGACATGGAGTCCGAC
CCCGCAGCGGCGCGGAGAAGGAGCTGGAGCTGGAGCGGGTGACGTCTGCGGGGAGCAGGTGACTCTG
CGCGGCGTGGTGGCGGCGCTGCTGATCGGCTTCATGTACAGCGTGATCGTGATGAAGATCGCGCTCACC
ACGGGGCTGGTGGCCACGCTGAACGTCTCCGCGGCGCTGATGGCGTTCCTGGCGCTCCGCGGGTGGACG
CGCGTGCTGGAGCGCCTCGGCGTGGCGCACCGCCCCCTTCACGCGCCAGGAGAACTGCGTTCATCGAGACC
TGCGCCGTCGCGTGCTACACCATCGCGTTCGGCGGTGGGTTCGGCTCCACGCTGCTGGGCTGGACAAG
AAGACGTACGAGCTGGCCGGGGCCTCGCCGGCCAACGTTCCGGGCAGCTACAAGGACCCCTGGGTTCGGC
TGGATGGCCGGATTTCGTCGCGGCGATCAGCTTCGCCGGCCTCCTAAGCCTGATCCCCCTCAGAAAGGTT
CTGGTCATTGACTACAAGCTAACTTACCCAAGCGGGACTGCGACCGCTGTTCTCATAAACGGGTTCAC
ACCAAGCAAGGAGACAAGAACGCAAGGATGCAAGTCCGAGGGTTCCTCAAGTACTTTGGGCTCAGCTTC
GTGTGGAGCTTTTTCAGTGTTCTACACGGCGGTGAAGTTTGCGGCTTTGTTTCAAGTTTCCGTACGTTT
GGTCTGAAGGCTTTCGAAGCAGACGTTCTTCTTTGATTTTAGCCTCACGTACGTTGGTGCAGGATGATC
TGTTTCGCACCTCGTGAACATCTCCACCCTCCTTGGTGCCATCCTGTATGGGGGATACTGTGGCCACTC
ATCAGCAAGCAGAAAGGGGAGTGGTACCCTGCGAACATACCTGAGAGTAGCATGAAAAGCTTATACGGT
TACAAGGCCTTCTCTGCATAGCTCTGATCATGGGAGACGGTACATACCACTTCTTTAAAGTCTTCGGT
GTCATGTTAAGAGTCTGCATCAACGGCTGAGCCGCAAACGTGCTACCAACAGAGTGGCAAACGGTGGGA
GACGAAATGGCCGCGCTTGACGACCTACAGCGTGACGAGATCTTCAGCGACGGGTCTTTCCCCGCTGG
GCAGCTTACGCCGGGTACGCGGCGCTGACCGTCTGTCAGCGGTCATCATCCCGCACATGTTCCGGCAG
GTCAAGTGGTACTACGTGATCGTGGCCTACGTCTCGCCCTCTCCTCGGCTTCGCCAACTCCTACGGC
ACGGGGCTCACCGACATCAACATGGCCTACAACACGCAAGATCGCGCTCTTCATCTTCGCGGCTGG
GCCGGCAGGGACAACGGCGTCATCGCGGGCTCGCCGGCGGCACCTGGTGAAGCAGCTGGTGTATGGCG
TCCGCGGACCTGATGCACGACTTCAAGACGGGCCACCTGACCATGACGTGCGCCAGGTCCCTGCTCGTG
GCGCAGTTCATCGGGACGGCCATGGGCTGCGTCTGCGGCCCTCACGTTCTGCTCTTCTACAACGCG
TTTCGACATCGGGAACCCACCGGGTACTGGAAGGCGCCGTACGGCCTCATCTACCGCAACATGGCGATC
CTCGGCGTGGAGGGCTTCTCCGTGCTGCCAGGCACTGCCTCGCGCTCTCCGTGGGTTCCTTCGCCCTTC
GCCTTCGTCTTCAGCGTGGCCGGGACGTCTGCGCGGAAGTACGCCAGGTTCGTGCCCCTGCCCATG
```

GCCATGGCCGTGCCGTTCTCGTGGGCGGGAGCTTCGCGATCGATATGTGCGTCGGGAGCCTGGCCGTC
 TTTGTCTGGGAGAAGGTGAACAGGAAGGAGGCCGTGTTTCATGGTGCCTGCGGTTGCGTCCGGTTTGATC
 TGTGGAGACGGCATATGGACCTTCCCGTCTTCCATTCTCGCTCTGGCCAAGATCAAGCCACCGATTTGC
 ATGAAGTTCACTCCTGGAAGCTAGAAAACAGTATGGACAGTTCACGGAAATGGAGAATGCGAGATACACT
 GAAGGCATCAACTGTGGTTGGTTGAAGCCATATGTCCCCTGTATTATCCTTGTTGTGCATGTGTGGGTT
 CTCCAAGGGCTACAGCACTCGAGATTTTTTATAGAGTTTATATGTTTTGTTGTCATGTTGGGTTCAACC
 TATGTTTATGTTTTGGGTGGAAAAAAGATTACAACGTACATTTTAAACAGAAATTAATGCTCATTTT
 GGTTGTGTAT

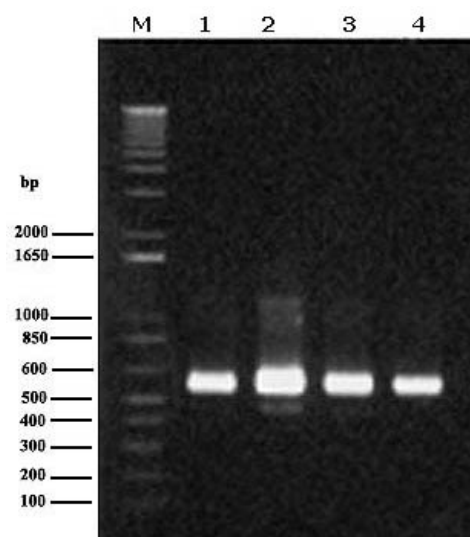
ภาพที่ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Ys1* ของ *Zea mays* ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank



ภาพที่ 22 ผลจากปฏิกิริยาสุทไซโฟลิมเมอร์สโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *Ys1*



ภาพที่23 ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสของจีนดีเอ็นเอ ขนาด 1,000 คู่เบสและใช้อุณหภูมิในการจับกันระหว่างดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ต่างๆ กันได้แก่ 55, 56.3, 59.2, 61.4, 63.9 และ 66.7 องศาเซลเซียสตามลำดับ (M = แลบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Plus ladder, 1 = ยูคาลิปตัสไม่ทนทานต่อดินหินปูน, 2 = ยูคาลิปตัสทนทานต่อดินหินปูน)



ภาพที่24 ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสของจีนดีเอ็นเอ ขนาด 1,000 คู่เบสเป็นครั้งที่สอง (M = แลบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Plus ladder, 1 = ยูคาลิปตัสไม่ทนทานต่อดินหินปูนสายพันธุ์ A, 2 = ยูคาลิปตัสไม่ทนทานต่อดินหินปูนสายพันธุ์ B, 3 = ยูคาลิปตัสทนทานต่อดินหินปูนสายพันธุ์ SF8, 4 = ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ทนทานต่อดินหินปูนสายพันธุ์ CT76)

4.7 วิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบความทนทานของยูคาลิปตัสในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีการนี้เป็นวิธีการวิธีหนึ่งของการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้ ดังนั้นจากการเริ่มต้นหาพันธุ์ที่ทนทานจากที่ไม่ทราบว่าเป็นพันธุ์ใดเป็นพันธุ์ที่ทนทานต่อแคลเซียมสูง เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถตรวจสอบสถานะความเครียดของพืชโดยสามารถสังเกตได้จากการที่ยอดและใบของพืชมีสีแดงหรือสร้างสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ขึ้นมา สารนี้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดความเครียดตัวหนึ่งซึ่งพบในยูคาลิปตัสทั้ง 3 ตัวอย่าง ได้แก่ วน2, P7 และ CT76 แต่ในระดับที่แตกต่างกัน โดยพันธุ์ที่ทนทานมากจะมีแอนโทไซยานินน้อยคือ CT76 และพันธุ์ที่ทนทานน้อยก็จะมีแอนโทไซยานินมากคือ วน2 เพื่อความแน่ชัดของผลการทดลองผู้วิจัยจึงตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ascorbate peroxidase

เอนไซม์ ascorbate peroxidase เป็นเอนไซม์ที่โมเลกุลจะทำงานได้จะต้องสร้างโครงสร้างเชิงซ้อนกับอนุมูลเหล็ก เมื่อปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้มีสูงก็แสดงว่าเอนไซม์นี้ถูกสร้างขึ้นมากจำนวนมา นั่นคือมีอนุภาคของเหล็กซึ่งสามารถนำมาใช้สร้างเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพได้ จากผลการทดลองนี้เอนไซม์ ascorbate peroxidase จึงเป็นเอนไซม์หนึ่งซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบความทนทานต่อดินที่มีแคลเซียมสูงได้

การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP และ AFLP

จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP และ AFLP แล้วพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสที่ทนทานและไม่ทนทานต่อดินที่มีแคลเซียมสูง และเมื่อนำมาตรวจสอบในแต่ละพันธุ์แล้วไม่พบความแตกต่างนั้นสาเหตุอาจเกิดจาก

1. ดีเอ็นเอที่ตรวจสอบกับไพรเมอร์ต่างๆ ในครั้งแรกนั้นใช้ดีเอ็นเอรวมจากพันธุ์ต่างๆ ที่ปลูกทดสอบซึ่งผลการทดสอบจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มทนทาน กลุ่มทนทานปานกลาง และกลุ่มไม่ทนทานหรืออ่อนแอโดยดีเอ็นเอของกลุ่มที่ทนทานนั้นประกอบด้วยดีเอ็นเอจากต้นในกลุ่มทนทานและทนทานปานกลาง ดีเอ็นเอในกลุ่มที่ทนทานปานกลางอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดพลาด เหตุผลที่ผู้วิจัยนำเอาดีเอ็นเอของพันธุ์ที่ทนทานปานกลางรวมกับพันธุ์ที่ทนทาน เนื่องจากพันธุ์ที่ทนทานในดินที่ปลูกทดสอบนั้นมีเพียง 4 พันธุ์เท่านั้น ถ้าหากจะใช้เพียง 4 พันธุ์เกรงว่าจะทำให้เกิดความผิดพลาดได้ง่าย เนื่องจากพันธุกรรมนั้นแคบเกินไป จะเป็นการตรวจสอบเพื่อบ่งชี้ชนิดหรือพันธุ์ของยูคาลิปตัสแทนการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ

2. ตัวอย่างพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากทางบริษัทนั้น พบว่ามีความแปรปรวนในบางรหัสของพันธุ์ เมื่อตรวจสอบจากการปลูก ไม่ว่าจะเป็นการเจริญหรือความทนทานต่อดินที่มีแคลเซียมสูง

3. ความคลาดเคลื่อนของเทคนิคการตรวจสอบด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ถึงแม้ว่าเทคนิค SRAP และ AFLP นั้นมีความจำเพาะสูง แต่ก็สามารถเกิดความผิดพลาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้

การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากยีนที่จำเพาะ

จากผลการตรวจสอบยีน *ZIP1*, *ZIP4* และ *IRT1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขนส่งสังกะสีไปยังส่วนต่างๆ ของต้นพืชจากรากพืช พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่ทนทานและพันธุ์ไม่ทนทานต่อดินที่มีแคลเซียมสูง จึงทำให้ผู้วิจัยคาดว่า สังกะสี (Zn) อาจจะมีผลน้อยหรือไม่ผลต่อความทนทานสภาพดินที่มีแคลเซียมสูง นอกจากนี้ ยีน *IRT1* ยังควบคุมการสร้างโปรตีนเพื่อจับหรือนำ Fe(II) จากภายนอกรากเข้าไปสู่ภายในรากพืช โปรตีน *IRT1* มีตำแหน่งอยู่ที่เซลล์เมมเบรนของราก ยีนนี้ทำหน้าที่ต่อจากยีน *FRO2* (*Feric oxidoreductase*) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน Fe (III)-chelate เป็น Fe(II) จากการทดสอบ ไม่พบความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของกลุ่มที่ทนทานและไม่ทนทาน จึงแสดงว่าจำนวน Fe(II) ที่โปรตีน *IRT1* จับได้ หรือการทำงานของยีน *IRT1* ในพันธุ์ที่ทนทานและไม่ทนทานนั้นไม่แตกต่างกัน หรือมีประสิทธิภาพจำกัด หรืออาจเกิดขึ้นเนื่องจากข้อจำกัดของประสิทธิภาพการทำงานของยีน *FRO2*

เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสจากยีน *NRAMP1* จากการตรวจสอบพบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอหลายแถบที่อุณหภูมิการเข้าจับของไพรเมอร์ จึงคาดว่าโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งแมงกานีสควรมีหลายชนิด และควบคุมด้วยยีนต่างๆ กัน จึงทำการเลือกดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไพรเมอร์ที่ทำการสังเคราะห์มา เมื่อตรวจสอบด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนเจลอะคริลามิด์พบความแตกต่าง พันธุ์ที่ทนทานพบดีเอ็นเอขนาด 125 คู่เบส และพันธุ์ที่ไม่ทนทานไม่พบแถบดีเอ็นเอนี้แต่มีแถบดีเอ็นเอที่ต่ำกว่าเล็กน้อย และยังมีบางพันธุ์ที่ไม่มีแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 ขนาด แสดงว่าพันธุ์ดังกล่าวมียีน *NRAMP1* ที่แตกต่างออกไป

สำหรับยีน *Ys1* ซึ่งปกติตรวจพบว่าแสดงออกในธัญพืชหรือพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ทำหน้าที่สร้างโปรตีน *Ys1* ที่นำเอาสารเชิงซ้อนที่อยู่ในรูป Fe (III)-siderophore เข้าสู่ภายในต้นพืชนั้น จากการตรวจสอบพบว่ามีในยูคาลิปตัสด้วย นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์ที่ทนทานและไม่ทนทาน เมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก *NRAMP1* และ *Ys1* พบว่ายูคาลิปตัสที่มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของ *Ys1* ทุกพันธุ์นั้น มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของ *NRAMP1* ด้วย แต่มียูคาลิปตัส 2 พันธุ์ที่ไม่พบ เครื่องหมายดีเอ็นเอของ *Ys1* แต่พบเครื่องหมายดีเอ็นเอของ *NRAMP1* แถบดีเอ็นเอเครื่องหมายของ *Ys1* นั้นมีความเข้มกว่าแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายของ *NRAMP1* จึงคาดว่า ยีน *Ys1* มีบทบาทที่สำคัญกว่ายีน *NRAMP1* ถ้าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบยูคาลิปตัสที่ทนต่อดินที่มีแคลเซียมสูง หรือดินที่มี pH สูงเนื่องจากแคลเซียม ผู้วิจัยขอแนะนำให้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ *Ys1* แต่อย่างไรก็ตาม *NRAMP1* ก็สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้แต่ต้องตรวจสอบด้วย polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งมีความยุ่งยากกว่าการตรวจสอบ *Ys1* ที่ใช้ agarose gel electrophoresis

4.8 สรุป

ผลของโครงการวิจัย การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อบ่งชี้ยูคาลิปตัสที่ทนต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมเพื่ออุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ พบว่า

1. การตรวจสอบความทนทานของยูคาลิปตัสต่อสภาพที่มีแคลเซียมสูงนั้นสามารถกระทำได้ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยูคาลิปตัส โดยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงในอาหารเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์
2. การทนทานของยูคาลิปตัสที่ทนทานต่อสภาพดินที่มีแคลเซียมสูงนั้นเกี่ยวข้องกับกับกลไกการกำจัด oxidative stress เอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ในการตรวจสอบคือ ascorbate peroxidase
3. ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความจำเพาะต่อการทนทานสภาพดินที่มีแคลเซียมสูงนั้นได้มาจากการตรวจสอบดีเอ็นเอของยีน *NRAMP1* และ *Ys1* ที่เกี่ยวข้องกับแมงกานีสและเหล็ก และยีน *Ys1* น่าจะมีบทบาทที่สูงกว่ายีน *NRAMP1*
4. ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้จาก *Ys1* มีขนาดประมาณ 1 กิโลเบส และ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้จาก *NRAMP1* มีขนาดประมาณ 125 คู่เบส
5. เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดเป็นเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายต่อการตรวจสอบ

หนังสืออ้างอิง

- ชวลิต อรุณพัฒน์พงศ์ และสวลี ลาขโรจน์. 2528.การศึกษาการใช้ไม้และการตลาดในอนาคต, น.258-282. ใน
- รายงานการสัมมนาไม้ยูคาลิปตัสคามาลูเลนซิส, 30 ตุลาคม-1 พฤศจิกายน 2527. กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.
- ทัศนีย์ รัตวานิชม อรรถพร อภิชาติบุตร และเพ็ญศรี นามประเสริฐ. 2525. การผลิตเชื้อซัลเฟตจากไม้ยูคาลิปตัสคามาลูเลนซิส. กองวิจัยผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ. 11 น.
- ขงยุทธ โอสดสภา. 2546. ธาตุอาหารพืช. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 424 น.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกล็ด. 2536. การวัดปริมาณและคุณภาพกรดนิวคลีอิก, น. 9.1-9.3. ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกล็ด และสรวง อุดมวรพันธ์ (ผู้รวบรวม). คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ, เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ และพันธุวิศวกรรม. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย โรงพิมพ์สารานุกรมสุขมูลฐานอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา, นครปฐม.
- สุชาติ ไทยเพ็ชร. 2528. คุณสมบัติของไม้ยูคาลิปตัสคามาลูเลนซิสและการใช้ประโยชน์, น. 222-224. ใน รายงานการสัมมนาไม้ยูคาลิปตัสคามาลูเลนซิส, 30 ตุลาคม-1 พฤศจิกายน 2527. กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2540. การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล, น. 57-82. ใน ชีระชัย รัตนันต์ , บรรณาธิการ. การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. ฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเทคนิค AFLP แบบปลอดรังสี. ภาควิชาพันธุศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 41 น.
- สมศักดิ์ อภิลิทธิวิช, สุนน มาสุรน, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เสาวนีย์ สุพุทธธาดา และ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539. การตรวจหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวในสกุล *Oryza* โดยเทคนิค RAPD. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 29 (4) : 454-461.
- อรุณ ชมชาญ และวินัย ปัญญาธัญญะ. 2528. ไม้ยูคาลิปตัสกับการผลิตถ่าน, น. 249-256. ใน รายงานการสัมมนาไม้ยูคาลิปตัสคามาลูเลนซิส, 30 ตุลาคม-1 พฤศจิกายน 2527. กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ
- Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agawal. 1992. Isolation of DNA from *Cheorospondias asillaris* leaves. Biointec. Bioindiv. Lett. 2: 19-24.
- Boland, D.J., M.I.H. Brooker, G.M. Chippendale, N. Hall, B.P.M. Hyland, R.D. Johnston, D.A. Kleining and J.D. Turner. 1997. Forest Tree of Australia. 4th ed. Nelson and CSIRO, Australia. 678 p.
- Chippendale, G.M. 1973. *Eucalyptus* of Western Australia gold field. Department of Primary Industrial, Forestry and Timber Bureau, Canberra. 218 p.
- Cramer, G.R. and R.L. Jones. 1990. Osmotic stress and abscisic acid reduce cytosolic calcium activities in roots of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ. 19: 1291-1298.
- Eldridge, K., J. Davidson, C. Hardwood and G. Van Wyk. 1997. *Eucalyptus doemstica* and breeding. Clarendon Press, Oxford, UK. 288p.

- Erlandson, A.G.I. and P.Jensen. 1989. Influence of low temperature on regulation of rubidium and calcium influx in roots of winter wheat. *Physiol. Plant.* 75: 114-120.
- FAO. 1979. *Eucalyptus* for Planting. FAO Forestry Series. 11. FAO, Rome. 677 p.
- FAO. 1980. Forestry for local development. FAO Forestry Paper No.7. Rome. 114 p.
- FAO. 1981. *Eucalyptus* for planting. FAO Forestry Series No.11. Rome. 667 p.
- Gong, M., A.H. van derLuit, M.R. Knight and A.J. Trewavas. 1998. Heat-shock-induced changes in intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiol.* 116: 429-437.
- Grattapaglia, D. and R. Sederoff. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo testcross : mapping strategy and RAPD markers. *Genet.* 137 : 1211 – 1137
- Grunwald, C. and R. Karschon. 1979. Mitotic chromosome counts of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. Aust. Forest Res. 9(2) : 149 – 150.
- Jeffreys, A.J., V. Wilson and S.L. Thein. 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA, *Nature* 314 : 67 – 73.
- Klein, J.D. and J.B. Ferguson. 1987. Effect of high temperature on calcium uptake by suspension-cultured pear fruit cells. *Plant Physiol.* 84: 153-156.
- Lin, D., M. Hubbes and L. Zsuffa. 1994. Differentiation of poplar and willow clone using RAPD fingerprints. *Tree Physiol.* 14 (10) : 1097 – 1105.
- Mckill, D.J., Z. Zhang, E.D. Redona and P.M. Colwit. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP marker in rice. *Genome* 39: 969-911.
- Pakniyat, H., W. Powell, E.Baird, L.L.Handley, D. Robinson, C.M. Serimgeour, E. Nevo, C.A. Hackett, P.D.S. CaLIGARI AND b.p. Forster. 1997. AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* Koch, C.) with reference to salt tolerance and associated ecogeography. *Genome* 40: 332-341.
- Pyror, L.D. and L.A.S. Johnson. 1971. A classification of the *Eucalyptus*.p. 5. Cited by K. Eldrige, J. Davidson, C. Hardwood and G. van Wyk. *Eucalyptus Domestication and Breeding*. Clarendon Press, Oxford. 288 p.
- Samuel, B.J.Jr. and E.L. Arlene. 1987. *Plant Systematics*. McGraw – Hill, Inc., Singapore. 512 p.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequence repeats as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.
- Vaneck, M.J., J.N. Rouppe van der voort, J. Draaistra, P. Vanzanvoort, E. Vanenckevort, B. Segers, J. Peleman, E. Jacobsen, J. Helder and J. Bakker. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol. Breeding* 1: 397-410.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Plt, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.

- Vos, P. and M. Kuiper. 1997. AFLP analysis, pp. 115-131. *In* G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshaf (eds.). DNA Markers : Protocols, Applications and Overview. Wiley-Liss, Inc, New York.
- Wang Y.H., C.E. Thomas and R.A. Dean. 1997. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 791-798.
- Weising , K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyere. 1995. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. CRC Press, USA. 322 p.
- Weising, K. and G. Kahl. 1997. Hybridization- based microsatellite fingerprinting of plant and fungi, pp. 27-54. *In* G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshaf (eds.). DNA Markers: Protocols, Application and Overviews. Wiley-liss, Inc., New York.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafaski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6351-6535.