

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### ผลการสืบค้นข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ในทุเรียน

เมื่อสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของทุเรียนจากฐานข้อมูล GenBank และจากฐานข้อมูลจีโนมทุเรียน เพื่อนำมาศึกษาารูปแบบการแสดงออกของยีน ITS ที่แตกต่างกันเป็นผลให้เกิดความหลากหลายของทุเรียนชนิดต่างๆ นั้น พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank Accession number AF479136.1 มีเป็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอทุเรียนที่สมบูรณ์เฉพาะเจาะจงต่อยีน ITS

### ผลการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3

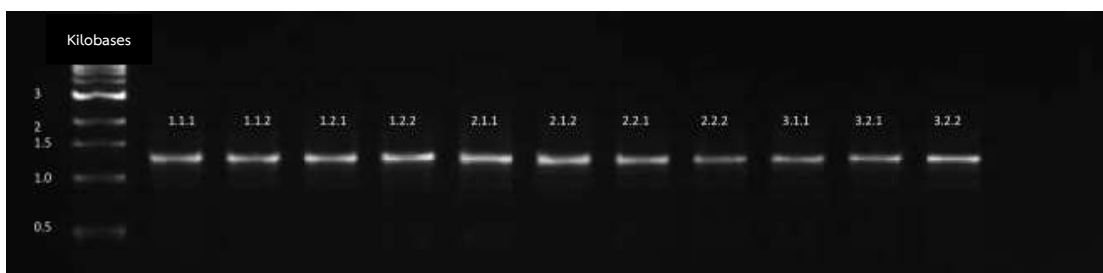
หลังจากสืบค้นข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3 version 0.4.0 จากเว็บไซต์ <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> ได้ผลผลิตที่มีขนาดประมาณ (Product size) 1,435 bp มีปริมาณรวมของเบส G และ C ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่า Tm (melting temperature) เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส ไพรเมอร์มีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมายเพียงตำแหน่งเดียวบนสายต้นแบบ ไม่มีลำดับเบสที่จับคู่กับลำดับเบสของตัวเอง หรือจับกับคู่ไพรเมอร์ของตัวเอง โดยมีรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ดังนี้

ITS Forward: 5'- TCGAAACCCCGCTCGACGGA – 3'

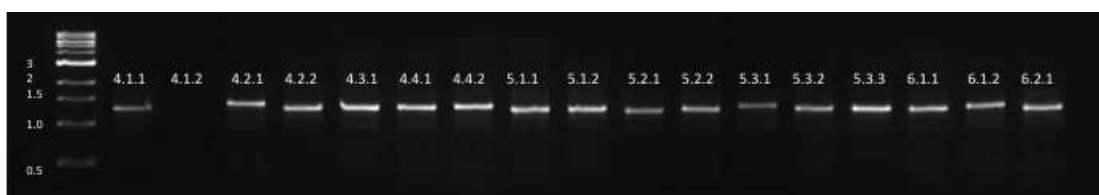
ITS Reverse: 5'- GACGCGAGCATCGATCGAGC – 3'

### ผลการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่สนใจ

การตรวจผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องฉาย UV (UV Transilluminator) และบันทึกภาพด้วยกล้อง polaroid camera จากการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ ITS ให้ผลค่อนข้างดี โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ตรงกับที่ได้ทำการออกแบบไว้ ประมาณ 1,435 bp ดังภาพที่ 4.1(ก) และ(ข) แต่มีรหัส 4.1.2 สายพันธุ์อีลิบที่ไม่ให้ผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.1 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ITS

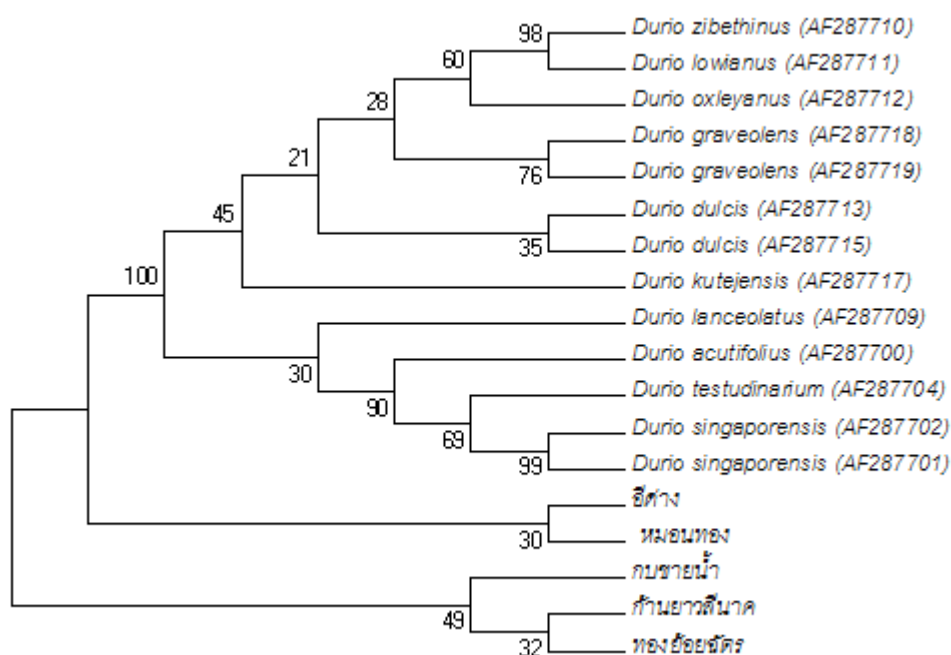
ก) รหัส 1.1.1 กบแม่เต่า รหัส 1.1.2 กบแม่เต่า รหัส 1.2.1 กบชายน้ำ รหัส 1.2.2 กบชายน้ำ รหัส 2.1.1 ย่ามะหวาด รหัส 2.1.2 ย่ามะหวาด รหัส 2.2.1 ชะนี รหัส 2.2.2 ชะนี รหัส 3.1.1 ก้านยาว รหัส 3.2.1 ก้านยาวสีนาค รหัส 3.2.2 ก้านยาวสีนาค

ข) รหัส 4.1.1 อีลือบ รหัส 4.1.2 อีลือบ รหัส 4.2.1 กระจดุม รหัส 4.2.2 กระจดุม รหัส 4.3.1 พวงมณี รหัส 4.4.1 ทองย้อยฉัตร รหัส 4.4.2 ทองย้อยฉัตร รหัส 5.1.1 กระจดุมทอง รหัส 5.1.2 กระจดุมทอง รหัส 5.2.1 อีหนัก รหัส 5.3.1 อีต่าง รหัส 5.3.2 อีต่าง รหัส 6.1.1 หมอนทอง รหัส 6.1.2 หมอนทอง รหัส 6.2.1 กำป็นเหลือง

#### ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

หลังจากการตรวจผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลผลิตในส่วนที่คาดว่าจะเป็ ITS ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่ได้จากการโปรแกรมการออกแบบไพรเมอร์ คือประมาณ 1,435 bp แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาลำดับของดีเอ็นเอทั้งสาย forward และสาย reverse นำลำดับเบสที่ได้มาทำ alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal X version 1.83 จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม Mega version 6

ผลของการวิเคราะห์หาลำดับเบสบริเวณ ITS ของทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี จำนวน 14 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ อีต่าง หมอนทอง กบชายน้ำ ก้านยาวสีนาค และก้านยาวที่ให้ลำดับเบส ซึ่งสามารถนำมาสร้าง phylogenetic tree โดยมีพันธุ์อีต่าง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมของจังหวัดปราจีนบุรี เป็น out group ดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 Phylogenetic tree ของทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี

จากผลของการทำ Phylogenetic tree บริเวณ ITS ของทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี พบว่า ทุเรียนนนทบุรี 4 พันธุ์ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับกลุ่มทุเรียนพันธุ์ *Durio zibethinus* (AF287710) *Durio lowianus* (AF287711) *Durio oxleyanus* (AF287712) *Durio graveolens* (AF287718) *Durio graveolens* (AF287719) *Durio dulcis* (AF287713) *Durio dulcis* (AF287715) *Durio kutejensis* (AF287717) *Durio lanceolatus* (AF287709) *Durio acutifolius* (AF287700) *Durio testudinarium* (AF287704) *Durio singaporensis* (AF287702) และ *Durio singaporensis* (AF287701) รวมถึงสายพันธุ์อื่นต่าง ซึ่งเป็น out group จึงไม่เกิดเป็นกลุ่ม

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในรูปแบบของ Phylogenetic tree กับลักษณะวิทยาของทุเรียน พบว่าทุเรียนพันธุ์ก้านยาวสีนาคมีความใกล้ชิดกับทุเรียนพันธุ์ทองย้อยฉัตร และพันธุ์กบขายน้ํา โดยมีลักษณะวิทยาของใบ ได้แก่ รูปร่างใบเป็นแบบ Oblong ปลายใบเป็นแบบ Acuminate ฐานใบเป็นแบบ Obtuse เช่นเดียวกัน ส่วนลักษณะวิทยาของผล พบว่าพันธุ์กบขายน้ํา และทองย้อยฉัตรมีทรงผลเป็นแบบ Ovate รอยต่อก้านผลเป็นแบบ Swollen รูปร่างหนามเป็นแบบ Pointed-convex เช่นเดียวกัน

ส่วนพันธุ์อื่นต่างมีความใกล้ชิดกับทุเรียนพันธุ์หมอนทอง โดยมีลักษณะวิทยาของใบ ได้แก่ รูปร่างใบเป็นแบบ Oblong ปลายใบเป็นแบบ Acuminate เช่นเดียวกัน รวมถึงมีความกว้างของใบ หมอนทอง และอื่นต่างเท่ากับ 5.11 และ 5.55 เซนติเมตร ความยาวของใบเท่ากับ 17.06 และ 16.45 เซนติเมตร และความยาวก้านใบมีค่าเท่ากับ 2.44 และ 2.34 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแต่ละค่ามีค่าใกล้เคียงกันจึงน่าจะมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม