บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การรวบรวมพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน 10 สายพันธุ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 3 สายพันธุ์ กรมวิชาการเกษตร 4 สายพันธุ์ ศูนย์ฝึกอบรมเยาวชนเกษตรวัดญาณสังวรารามวรมหาวิหาร อันเนื่องมาจากพระราชดำริ 1 สายพันธุ์ พันธุ์การค้า 7 สายพันธุ์ และพันธุ์จากต่างประเทศ 10 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 35 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวและแหล่งที่มา

แหล่งที่มา	สายพันธุ์
พันธุ์ในประเทศไทย	
ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน	1. HE067 TVRC 2. HE010 TVRC 3. HE025 TVRC 4. HE045 TVRC 5. HE047 TVRC 6. HE051 TVRC 7. HE052 TVRC 8. HE085 TVRC 9. HE106 TVRC 10. HE111 TVRC
มหาวิทยาลัยแม่โจ้	11. SR18-0044 แม่โจ้ 70 ปี 12. SR18-0046 อินทรีย์ 13. SR18-0047 มณีแม่โจ้
กรมวิชาการเกษตร	28. SR18-0058 PC 5706 29. SR18-0059 PC 5707 30. SR18-0060 PC 5709 34. SR18-0061 พิจิตร 1
ศูนย์ฝึกอบรมเยาวชนเกษตรวัดญาณสังวรารามวรมหาวิหาร อันเนื่องมาจากพระราชดำริ	35. SR18-0077 ธราธิป
พันธุ์การค้า	14. SR18-0056 กระเจี๊ยบเขียว 9062 Dynamic 15. SR18-0055 กระเจี๊ยบเขียว เบล

แหล่งที่มา	สายพันธุ์
	25. SR18-0071 กระเจี๊ยบเขียวเจียไต๋ 26. SR18-0072 กระเจี๊ยบเขียวฝักแดงสามเอ 27. SR18-0073 ภูเขาทอง 32. SR18-0075 Queen Star 33. SR18-0076 ฮิชาโอะ
พันธุ์จากต่างประเทศ	
ประเทศสหรัฐอเมริกา	16. SR18-0062 Philippine lady finger 17. SR18-0063 Emerald 18. SR18-0064 Alabama red 19. SR18-0065 Fife creek cowhorn 20. SR18-0066 Hill country heirloom red 21. SR18-0067 Star of David 22. SR18-0068 Stubby
ประเทศญี่ปุ่น	23. SR18-0069 Japan #1
ประเทศบังคลาเทศ	24. HE101 บังคลาเทศ
ประเทศจีน	31. SR18-0074 China 1

3.1 การศึกษาลักษณะประจำสายพันธุ์ทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตรของกระเจี๊ยบเขียว

3.1.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ มีหน่วยทดลองคือ แปลงปลูกกระเจี๊ยบเขียวขนาด 1X5 เมตร จำนวนต้นกระเจี๊ยบเขียว 10 ต้นต่อแปลง

3.1.2 ขั้นตอนการทดลอง

การปลูกทดสอบกระเจี๊ยบเขียว ณ แปลงทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design) จำนวน 3 ซ้ำ มีหน่วยทดลองคือ แปลงปลูกกระเจี๊ยบเขียวขนาด 1X5 เมตร จำนวนต้นกระเจี๊ยบเขียว 10 ต้นต่อแปลง โดยมีการเพาะกล้าด้วยพีทมอสในถาดเพาะขนาด 72 หลุมต่อถาด และการเตรียมดินโดยการไถดินในพื้นที่เปิดใหม่ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ จึงไถพรวนและยกแปลงทดลองขนาด 1X5 เมตร จากนั้นทำการย้ายกล้ากระเจี๊ยบเขียวที่เตรียมไว้ 1 ต้นต่อหลุม ปลูกเป็นแถวคู่ ระยะห่างระหว่างต้น 75 เซนติเมตร และระยะห่างระหว่างแถว 100 เซนติเมตร ใส่ปุ๋ยคอกอัตรา 2,000 กิโลกรัม/ไร่ ปุ๋ยเคมีสูตร 15–15–15 อัตรา 100 กิโลกรัม/ไร่ และรดน้ำทุกวัน วันละ 2 ครั้ง เช้า – เย็น เมื่อต้นกระเจี๊ยบเขียวโตเต็มที่และให้ผลผลิตจะเก็บผลหลังจากดอกบาน 5 วัน โดยทยอยเก็บเกี่ยวเป็นระยะเวลา 3 เดือน

3.1.3 การบันทึกข้อมูลลักษณะประจำสายพันธุ์ทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตร

3.1.3.1 ลักษณะประจำสายพันธุ์ทางสัณฐานวิทยา 5 ลักษณะ คือ 1) ลักษณะการเจริญเติบโตของต้น ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น สีลำต้น อายุออกดอกแรก และความสูงต้น (วันแรกที่ออกดอก) 2) ลักษณะใบ ได้แก่ สีใบ และรูปร่างใบ 3) ลักษณะดอก ได้แก่ สีดอก และจำนวนกลีบดอก 4) ลักษณะผล ได้แก่ ความกว้างผล ความยาวผล ความหนาเนื้อ ความยาวก้าน น้ำหนักสดผล จำนวนเหลี่ยม สีผล และผิวผล และ 5) ลักษณะเมล็ดสายพันธุ์ ได้แก่ สีเมล็ด ผิวเมล็ด รูปร่างเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด

3.1.3.2 การบันทึกข้อมูลลักษณะทางการเกษตร ได้แก่

1) จำนวนผลต่อต้น นับจำนวนผลต่อต้นที่สมบูรณ์แข็งแรงในแต่ละสายพันธุ์ แล้วหาค่าเฉลี่ยต่อซ้ำต่อสายพันธุ์

2) น้ำหนักผลต่อต้น ชั่งน้ำหนักผลต่อต้นที่สมบูรณ์แข็งแรงในแต่ละสายพันธุ์ แล้วหาค่าเฉลี่ยต่อซ้ำต่อสายพันธุ์

3) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (TSS) โดยสุ่ม 1 ผล ต่อต้นต่อซ้ำ นำมาบดแล้วคั้นน้ำจากนั้นนำน้ำคั้นวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (TSS) ด้วยเครื่อง Hand refractometer ยี่ห้อ ATAGO

4) ปริมาณสารพอลิแซกคาไรด์ โดยการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดสารเมือกของกระเจี๊ยบเขียว (นำเมล็ดออก) ล้างให้สะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งกระเจี๊ยบเขียวต่อน้ำที่อัตราส่วน 1:1 นำใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียด นาน 1 นาที จากนั้นบีบและกรองแยกสารเมือกด้วยผ้าขาวบาง นำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยแรงหมุนเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนที่เป็นตะกอนเข้าอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักตะกอนแห้ง

5) ปริมาณแอนโทไซยานิน โดยนำตัวอย่างผลกระเจี๊ยบเขียวบดให้ละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างที่บดแล้ว ชั่งน้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Ethanol-0.1%TFA (Trifluoroacetic acid) ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายลงในขวดรูปชมพู่ปรับปริมาตรสารละลาย 25 มิลลิลิตร โดยใช้สารสกัด จากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วย Nylon membrane filter 0.45 ไมครอน 1 ครั้ง แบ่งสารละลายออกเป็น 2 ส่วน นำไป วัดโดยวิธี HPLC และวิธี Spectrophotometric (AOAC International, 2006)

3.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ลักษณะประจำสายพันธุ์ทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตร โดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด และค่าต่ำสุด และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของลักษณะทางการเกษตร ตามแผนการทดลองแบบ RCBD ด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s new multiple - range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.2 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระเจี๊ยบเขียวต่างสายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

3.2.1 ขั้นตอนการทดลอง

3.2.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืช เก็บตัวอย่างใบอ่อนของกระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 3 ใบต่อต้น จากศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อนใส่ในซองที่บรรจุซิลิก้าเจลเพื่อดูดความชื้นออกจากตัวอย่าง และเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดลองต่อไป นำใบอ่อนที่ดูดความชื้นแล้วมาบดโดยใช้ไนโตรเจนเหลวเพื่อให้เซลล์แตกและทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีการของชุดสำเร็จรูป เนื่องจากใบพืชในวงศ์ Malvaceae มีเมือกจำนวนมากซึ่งการสกัดด้วยวิธี CTAB ทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพไม่ดี (Haq, Khan and Azmat, 2013) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ถ่ายภาพผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่องถ่ายภาพสารพันธุกรรม

3.2.1.2 การตรวจสอบไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างกระเจี๊ยบเขียวที่สกัดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 2 ไมโครลิตร 10× PCR buffer 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM) 0.8 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase 0.1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด Inter Sequence Repeat (ISSR) จำนวน 28 ไพรเมอร์ ได้แก่ $(AG)_8G$, $(GA)_8C$, $(CA)_8A$, $(CA)_8G$, $(TC)_8C$, $(AC)_8T$, $(TG)_8C$, $(TG)_8G$, $(AG)_8CT$, $(AG)_8CC$, $(GA)_8CT$, $(GA)_8CC$, $(GA)_8TG$, $(CA)_8AT$, $(CA)_8AC$, $(CA)_8AG$, $(AC)_8CT$, $(AC)_8CG$, $ACTA(GA)_6G$, $GCAT(CT)_6C$, $ACTA(CA)_6C$, $ACTT(GT)_7$ และ $ACTT(GT)_6G$ (Yuan et al., 2014, 2015) $(GA)_7GYT$, $(GA)_7YA$, $(ATG)_5$, $(AG)_6G$ และ $(GTG)_5$ (Ahiakpa et al., 2017) ทำปฏิกิริยารอบแรก 94 องศาเซลเซียส 5 นาที รอบที่ 2 – 30 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และรอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TAE (Tris-Acetate) ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที และย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 10 ppm คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมต่อไป ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ชนิด Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) จำนวน 28 ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5” ⟶ 3”)	จำนวนนิวคลีโอไทด์ (mer)	Tm (°C)
1	AGAGAGAGAGAGAGAGG	17	52.4
2	GAGAGAGAGAGAGAGAC	17	52.4
3	CACACACACACACACAA	17	50.0
4	CACACACACACACACAG	17	52.4
5	TCTCTCTCTCTCTCTCC	17	52.4
6	ACACACACACACACACT	17	50.0
7	TGTGTGTGTGTGTGTGC	17	52.4
8	TGTGTGTGTGTGTGTGG	17	52.4
9	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	18	53.9
10	AGAGAGAGAGAGAGAGCC	18	56.1
11	GAGAGAGAGAGAGAGACT	18	53.9
12	GAGAGAGAGAGAGAGACC	18	56.1
13	GAGAGAGAGAGAGAGATG	18	53.9
14	CACACACACACACACAAT	18	51.6
15	CACACACACACACACAAC	18	53.9
16	CACACACACACACACAAG	18	53.9
17	ACACACACACACACACCT	18	53.9
18	ACACACACACACACACCG	18	56.1
19	ACTAGAGAGAGAGAGAG	17	50.0
20	GCATCTCTCTCTCTCTC	17	52.4
21	ACTACACACACACACAC	17	50.0
22	ACTTGTGTGTGTGTGTGT	18	51.6
23	ACTTGTGTGTGTGTGTG	17	50.0
24	GAGAGAGAGAGAGAGYT	17	50.0
25	GAGAGAGAGAGAGAYA	16	45.6
26	ATGATGATGATGATG	15	37.9
27	AGAGAGAGAGAGG	13	40.0
28	GTGGTGGTGGTGGTG	15	51.6

3.2.1.3 การสกัดดีเอ็นเอ สกัดจีโนมดีเอ็นเอจากส่วนใบอ่อนของกระเจี๊ยบด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) ชั่งน้ำหนักใบอ่อนตัวอย่างละ 0.1-0.3 กรัม เติมไนโตรเจนเหลวและบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย CTAB buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 0.2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) β-mercaptoethanol) โดยเติม 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) PVP ผสมกับ CTAB buffer ด้วย นำไปหมุนเหวี่ยงให้สารละลายเข้ากัน เติม *RNase* A (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นวางให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติม Chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอดขึ้นลงเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วประมาณ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวใสส่วนข้างบนใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนด้วย isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตร 600 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ตกตะกอนทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนทิ้ง เติมสารละลาย Wash buffer (70 เปอร์เซ็นต์ ethanol) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที และดูดของเหลวใสส่วนบน ทิ้งจากนั้นตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ TBE buffer จากนั้นนำมาวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

การประยุกต์วิธีสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ NucleoSpin® Genomic DNA from plant (Macherey-Nagel, เยอรมัน) นำสารละลายดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียวมาละลายใน TE buffer ให้มีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร เติมบัฟเฟอร์ PC ปริมาตร 450 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ดูดสารละลายดีเอ็นเอทั้งหมดใส่ในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วย PW1 wash buffer 400 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ล้างด้วย PW2 wash buffer 700 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที และล้างด้วย PW2 wash buffer 200 ไมโครลิตรอีกครั้ง หมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 2 นาที เปลี่ยนคอลัมน์ใส่หลอดใหม่ ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ Elution buffer 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 g นาน 1 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง นำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1.2 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer จากนั้นนำมาวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.1.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Tgradient Thermocycler, Biometra, เยอรมัน) โดยใช้เอนไซม์ *i*-Taq™ plus DNA

Polymerase (Intron Biotecnology, ประเทศเกาหลี) นำดีเอ็นเอต้นแบบมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) จำนวน 28 คู่ไพรเมอร์ โดยผสม PCR reaction mix (น้ำ 8.95 ไมโครลิตร 10X PCR บัฟเฟอร์ 1.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.75 ไมโครลิตร, *i*-Taq DNA Polymerase 0.3 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ ISSR Sense Antisense อย่างละ 0.75 ไมโครลิตร และ DNA Template 2 ไมโครลิตร) ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ทำพีซีอาร์ครั้งแรกโดยใช้โปรแกรมที่ 1 Pre-denaturing ที่ความร้อน 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที โปรแกรมที่ 3 annealing ที่ 40-56 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที (ขึ้นอยู่กับ Tm ของไพรเมอร์) โปรแกรมที่ 4 extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ซ้ำโปรแกรมที่ 2-4 จำนวน 34 รอบ โปรแกรมที่ 5 final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ นำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder marker (sibEnzyme®, สหรัฐอเมริกา) ในบางไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมปกติได้ มีการประยุกต์ทำพีซีอาร์โดยใช้โปรแกรม step up (โปรแกรมที่ 1 Pre-denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 Denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที โปรแกรมที่ 3 Annealing ที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และโปรแกรมที่ 4 Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 75 วินาที จำนวน 10 รอบ โปรแกรมที่ 5 Denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที โปรแกรมที่ 6 Annealing ที่ 51 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที โปรแกรมที่ 7 Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 75 วินาที จำนวน 30 รอบ และโปรแกรมที่ 8 Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที) นำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder marker (SibEnzyme®, สหรัฐอเมริกา)

3.2.2 การบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจสอบความสัมพันธ์ของกระเจี๊ยบเขียวทั้ง 35 สายพันธุ์ ด้วยการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์ ISSR โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 0 โดยหาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้าย (similarity coefficient) เปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของแถบดีเอ็นเอ และคำนวณค่าดัชนีความเหมือนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc

3.3 การจำแนกและจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกระเจี๊ยบเขียว

3.3.1 ขั้นตอนการทดลอง

นำข้อมูลจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระเจี๊ยบเขียวต่างสายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ โดยเลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA เพื่อการจำแนกและการจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกระเจี๊ยบเขียว

3.3.2 การบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจสอบความสัมพันธ์ของกระเจี๊ยบเขียวทั้ง 35 สายพันธุ์ ด้วยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.02i ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) (Rohlf, 2002)