การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการระบุสายพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ในประเทศไทย

Application of Microsatellite Markers for Identification of Wine Grape Varieties in Thailand

อลงกรณ์ ศรีพลแท่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการระบุสายพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ในประเทศไทย

อลงกรณ์ ศรีพลแท่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการระบุสายพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ในประเทศไทย Application of Microsatellite Markers for Identification of Wine Grape Varieties in Thailand
ชื่อ – นามสกุล	นายอลงกรณ์ ศรีพลแท่น
สาขาวิชา	เทคโนโลยีการผลิตพืช
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญ เจริญชัย, Ph. D.
ปีการศึกษา	2557

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วัลลภ พรหมทอง, Ph. D.)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญ เจริญชัย, Ph. D.)

..... กรรมการ
(อาจารย์หทัยรัตน์ อุไรรงค์, Ph. D.)

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิงรุ้งสวรรค์ วรรณสุทธิ์, พบ.ม.)
วันที่ 14 เดือน กันยายน พ.ศ. 2558

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการระบุสายพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ในประเทศไทย
ชื่อ – นามสกุล นายอลงกรณ์ ศรีพลแท่น
สาขาวิชา เทคโนโลยีการผลิตพืช
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญ เจริญชัย, Ph. D.
ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้นำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ มาใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมขององุ่นทำไวน์ จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ microsatellite primer 18 คู่ พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 133 แถบ ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 3 ถึง 12 แถบ เฉลี่ยให้ความแตกต่างของอัลลีล 7.4 แบบต่อไพรเมอร์ ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมด 522 ข้อมูล เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ค่าดัชนีความเหมือน พบว่า สามารถแบ่งพันธุ์องุ่นทำไวน์ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยระยะห่างทางพันธุกรรมของทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากกว่า 0.9

ผลการศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมขององุ่นทำไวน์ที่ปลูกในประเทศไทยกับต่างประเทศ พบว่า องุ่นที่นิยมนำมาทำไวน์ทั้ง 5 พันธุ์ คือพันธุ์ Shiraz, Cabernet Sauvignon, Chenin Blanc, Colombard และ Tempranillo มีพันธุกรรมที่เหมือนกันทั้งพันธุ์ที่ปลูกในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้ microsatellite primer 18 คู่ นี้

จากการศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมขององุ่นในไวน์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล พบว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำไวน์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปและการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ไม่มีความแตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ความหลากหลายและความใกล้ชิดทางพันธุกรรมขององุ่นจากไวน์ 9 ตัวอย่าง โดยใช้ microsatellite primer 18 คู่ พบว่า สามารถตรวจสอบและจำแนกพันธุ์องุ่นที่นำมาใช้ทำไวน์ได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงสามารถนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพไวน์ได้

คำสำคัญ: ไวน์ องุ่น ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

Thesis Title	Application of Microsatellite Markers for Identification of Wine Grape Varieties in Thailand
Name – Surname	Mr. Alongkorn Sripholtaen
Program	Crop Production Technology
Thesis Advisor	Assistant Professor Charoen Charoenchai, Ph. D.
Academic Year	2014

ABSTRACT

This study examined microsatellite markers to determine genetic polymorphism in wine grape varieties. DNA fingerprinting of leaf samples from 29 grape varieties using 18 primer pairs gave 133 polymorphic alleles ranging in sizes between 3-12 bands. The average polymorphic allele size was 7.4 bands per primer. A total of 522 genetic data were obtained. Twenty nine samples of wine grape varieties were clustered into two major groups using UPGMA method based on genetic similarity matrix with genetic difference of more than 0.9.

The resulting genetic diversity data of wine grape varieties grown in Thailand were compared with those reported overseas. Five wine grape cultivars typically grown for winemaking in Thailand, namely Shiraz, Cabernet Sauvignon, Chenin Blanc, Colombard and Tempranillo showed identical genetic fingerprints as those reported in the literature by the 18 primer pairs used in this work.

There were no differences in the results from genomic DNA extraction from wine by DNA extraction kit and DNA extraction method by CTAB. The genetic diversity of grape varieties from 9 wine samples using 18 primer pairs could identify grape cultivars and could be used in quality control of wine.

Keywords: wine, grape, DNA fingerprint, microsatellite marker

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณา และความอนุเคราะห์ของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจริญ เจริญชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะในการดำเนินงานวิจัย รวมถึงตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการเขียนวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัลลภ พรหมทอง ประธานกรรมการสอบ และ ดร.หทัยรัตน์ อุไรรงค์ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ไร่องุ่นหัวหินฮิลส์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ไร่องุ่นพีบี วัลเล่ย์ เขาใหญ่ไวน์เนอรี่ จังหวัดนครราชสีมา บริษัท สยามไวเนอรี่ จำกัด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และบริษัท กราน-มอนเต้ จำกัด ที่ได้อนุเคราะห์ตัวอย่างในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือในทุกด้านเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาในการทำงาน และเป็นกำลังใจสำหรับการทำวิทยานิพนธ์ที่ดีเสมอมา

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคน ที่เป็นกำลังใจในการเรียน การทำงานอย่างดีเสมอมา และให้แนวทางที่ดีในการดำรงชีวิต จนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จการศึกษา

อลงกรณ์ ศรีพลแท่น

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… (3)

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……... (4)

กิตติกรรมประกาศ…… (5)

สารบัญ……. (6)

สารบัญตาราง……... (8)

สารบัญภาพ…….. (9)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ…….. (10)

บทที่ 1 บทนำ…… 11

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา…… 11

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย……. 12

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้จากงานวิจัย……. 13

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…… 14

2.1 ข้อมูลทั่วไปขององุ่น…….. 14

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไปขององุ่น……... 14

2.3 ชนิดของพันธุ์องุ่น…….. 16

2.4 การปลูกองุ่นในประเทศไทย…….. 20

2.5 พันธุ์องุ่นที่ปลูกในประเทศไทย……. 20

2.6 พันธุ์องุ่นทำไวน์บางสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา……. 21

2.7 ไวน์…… 21

2.8 ขั้นตอนการผลิตไวน์…….. 23

2.9 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)……... 26

2.10 ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ…….. 26

2.11 ความสำคัญการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบสายพันธุ์องุ่น…….. 27

2.12 การตรวจสอบพันธุ์องุ่นโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ……. 30

2.13 การใช้เครื่องหมาย Microsatellite ในการตรวจสอบสายพันธุ์องุ่น…….. 31

2.14 การใช้เครื่องหมาย Microsatellite ในการตรวจสอบสายพันธุ์องุ่น
ในไวน์……. 33

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.15 การใช้เครื่องหมาย Microsatellite ในการตรวจสอบสายพันธุ์องุ่นในคลอโรพลาส…… 34

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย…….. 36

3.1 อุปกรณ์…….. 36

3.2 วิธีการ…… 38

การทดลองที่ 1 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นทำไวน์ที่ปลูกในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค Microsatellite primer…….. 38

การทดลองที่ 2 ศึกษาเปรียบเทียบพันธุกรรมขององุ่นทำไวน์ที่นิยมปลูกในประเทศไทยกับต่างประเทศ…… 46

การทดลองที่ 3 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุพันธุ์องุ่นในน้ำไวน์…… 47

การทดลองที่ 4 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นที่ระบุในฉลากไวน์..... 50

3.3 สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย…… 51

บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์……... 52

4.1 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นทำไวน์ที่ปลูกในประเทศไทย……. 52

4.2 ศึกษาพันธุกรรมขององุ่นทำไวน์ที่ปลูกในประเทศไทยกับต่างประเทศ…… 65

4.3 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุพันธุ์องุ่นในน้ำไวน์…….. 71

4.4 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นที่ระบุในฉลากไวน์……. 72

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ…… 78

5.1 สรุปผลการทดลอง…… 78

5.2 ข้อเสนอแนะ……. 80

บรรณานุกรม…… 81

ภาคผนวก……. 89

ภาคผนวก ก วิธีเตรียมสารเคมี……. 90

ประวัติผู้เขียน…… 92

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 รายชื่อพันธุ์องุ่นทำไวน์ที่ใช้ในการทดลองและสถานที่เก็บรวบรวม..... 39

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นและปริมาณสารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง เพื่อคัดเลือก Microsatellite primer……... 45

ตารางที่ 3.3 ขั้นตอนการตั้งโปรแกรมทำปฏิกิริยา PCR ด้วย Microsatellite primer…….. 45

ตารางที่ 3.4 แสดงตัวอย่างไวน์พันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ ชนิดของไวน์ และปีที่ผลิตไวน์ที่ใช้ในการศึกษาทดลอง……..... 50

ตารางที่ 4.1 แสดงชื่อลำดับเบสจาก Microsatellite primer ที่ใช้คัดเลือกสำหรับการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอองุ่นทำไวน์ จำนวน 35 คู่ รวมทั้งชนิดของลำดับเบสขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์แต่ละคู่…….. 53

ตารางที่ 4.2 แสดงขนาดและจำนวน alleles ของพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ที่ปลูกในประเทศไทย จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ Microsatellite primer จำนวน18 คู่……... 56

ตารางที่ 4.3 จำนวนแถบดีเอ็นเอ (alleles) ที่พบในพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 18 คู่…… 58

ตารางที่ 4.4 ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของพันธุ์องุ่น 29 ตัวอย่างพันธุ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 18 คู่ ทำการประเมินโดยวิธี UPGMA…….. 61

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นทำไวน์จากฐานข้อมูลต่างประเทศกับของไทยโดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 6 คู่ เพื่อระบุความเหมือนหรือความแตกต่างกันทางพันธุกรรม…… 66

ตารางที่ 4.6 สรุปขนาดของแถบดีเอ็นเอ (alleles) ที่ตรวจพบในน้ำไวน์ จากแหล่งผลิตต่าง ๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง โดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 6 คู่……... 77

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการผลิตไวน์ขาวจากองุ่น…….. 24

ภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการผลิตไวน์แดงจากองุ่……. 25

ภาพที่ 3.1 แสดงจีโนมิกดีเอ็นเอของตัวอย่างพันธุ์องุ่น 5 พันธุ์ที่สกัดได้ (แถวที่ 2-6) และ **(1)** Molecular weight maker (1kb Gene Ruler) (2) พันธุ์ Shiraz (3) พันธุ์ Cabernet Sauvignon (4) พันธุ์ Chenin Blanc (5) พันธุ์ Colombard (6) พันธุ์ Tempranillo…… 42

ภาพที่ 4.1 การจัดกลุ่ม (Dendrogarm) และแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์องุ่นทำไวน์จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ที่ได้จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ Microsatellite Primer จำนวน 18 คู่…….. 62

ภาพที่ 4.2 แสดงผลการตรวจพันธุ์องุ่นในน้ำไวน์ โดยใช้ Microsatellite primer VVS2 (A) ไวน์ที่ทำจากพันธุ์ Shiraz ยี่ห้อ Taras (B) พันธุ์ Cabernet Sauvignon ยี่ห้อ Hardy (C) พันธุ์ Shiraz กับ Cabernet Sauvignon ยี่ห้อ Hardy (D) DNA size standard (ROX 500).... 73

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

SO_2	=	Sulfur Dioxide
KMS	=	Potassium Metabisulphite
cp genome	=	Chloroplast Genome
mt genome	=	Mitochondria Genome
RNA	=	Ribonucleic Acid
RNase	=	Ribonuclease
DNA	=	Deoxy Ribonucleic Acid
cDNA	=	Complementary DNA
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism
RAPD	=	Random Amplified Polymorphic DNA
AFLP	=	Amplified Fragment Length Polymorphism
SSR	=	Simple Sequence Repeat; Microsatellites
OD	=	Optical Density
CTAB	=	Hexadecyltrimetyl ammonium bromide

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

องุ่นเป็นไม้ผลชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก สามารถปรับตัวได้ดีทั้งในเขตหนาว เขตกึ่งร้อน และเขตร้อน สำหรับประเทศไทยองุ่นที่ปลูกส่วนใหญ่เพื่อบริโภคผลสด และองุ่นทำไวน์ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยสามารถปลูกองุ่นได้ดี มีการเจริญเติบโตดี และมีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูง โดยมีพื้นที่ปลูกกระจายอยู่เกือบทั่วทุกภาคของประเทศไทย สำหรับพื้นที่ที่มีการปลูกองุ่นทางภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และอุตรดิตถ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา เลย และบุรีรัมย์ ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และสระบุรี ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดราชบุรี และกาญจนบุรี ส่วนทางภาคตะวันออกและภาคใต้ก็มีพื้นที่ปลูกองุ่นเช่นกัน ซึ่งได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ระนอง และประจวบคีรีขันธ์ โดยพื้นที่ปลูกองุ่นทั่วประเทศมีมากถึง 28,742 ไร่ และกำลังมีการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2546 และ 2548) องุ่นมีมากมายหลายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันออกไป นอกจากมีรสชาติดีสำหรับบริโภคผลสดแล้ว นอกนี้ยังสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆได้มากมาย เช่น ลูกเกด น้ำองุ่น ทำแยม องุ่นบรรจุกระป๋อง และทำเหล้าองุ่น โดยเฉพาะไวน์ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทหนึ่งที่นิยมบริโภคกันทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย (สุรศักดิ์, 2547) จากสถิติ พบว่า ประเทศไทยสั่งนำเข้าเครื่องดื่มประเภทไวน์องุ่น (wine) ในปี พ.ศ. 2548 มูลค่า 459 ล้านบาท และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทุกปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) ทำให้นักลงทุนชาวไทยและต่างประเทศมีความสนใจเข้ามาลงทุนผลิตไวน์องุ่นในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้น (สุรศักดิ์, 2531) ปัจจุบันมีแนวโน้มว่าโรงงานอุตสาหกรรมใหม่ๆ ที่ดำเนินธุรกิจเกี่ยวกับการแปรรูปผลิตผล และการทำไวน์องุ่นมีเพิ่มมากขึ้น เพื่อรองรับผลผลิตองุ่นที่จะเพิ่มมากขึ้นในอนาคตได้

สาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่งที่ประเทศไทยต้องนำเข้าผลผลิตองุ่นจากต่างประเทศ นั้นก็เนื่องมาจากองุ่นที่ปลูกในเชิงการค้าของไทยนั้นยังไม่ค่อยมีความหลากหลายในเรื่องของพันธุ์ ดังนั้นจึงหลายหน่วยงานพยายามหาพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีคุณภาพดี สามารถเจริญเติบโตได้ดีให้ผลผลผลิตสูง และทนทานต่อโรคแมลง เข้ามาทดลองปลูก จนกระทั่งปัจจุบันได้พันธุ์องุ่นที่มีคุณภาพและศักยภาพดีพอที่จะใช้ปลูกเป็นการค้าได้หลายพันธุ์ด้วยกัน เช่นพันธุ์ Marroo Seedless และ Perlette เป็นต้น

ประเทศไทยได้เริ่มมีการค้นคว้าเกี่ยวกับเรื่ององุ่นอย่างจริงจังในปีพุทธศักราช 2499 (กลุ่มเกษตรสัญจร, 2542) จนถึงปัจจุบันมีการนำองุ่นพันธุ์ใหม่ๆ เข้ามาปลูกมากมายหลายพันธุ์ ประกอบกับภาคเอกชนที่มีการนำเข้าพันธุ์องุ่นมาจากต่างประเทศเช่นกัน โดยเฉพาะพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ของภาคเอกชน จนบางครั้งไม่ทราบว่าพันธุ์ใดมาจากแหล่งใด และที่สำคัญบางพันธุ์ก็มีการตั้งชื่อขึ้นมาใหม่ และบางพันธุ์มีชื่อเดียวกัน จึงทำให้เกิดความสับสนในเรื่องของชื่อพันธุ์องุ่น ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดข้อสงสัยว่าพันธุ์องุ่นภายในประเทศกับพันธุ์ต่างประเทศ ซึ่งภาคเอกชนใช้ทำไวน์ในประเทศไทย ซึ่งพบว่ามีหลายพันธุ์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความคล้ายคลึงกันมาก ว่ามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมหรือไม่ สำหรับวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบพันธุ์พืชนั้นที่ทำได้ง่ายที่สุดก็คือการตรวจสอบลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) เช่น สี ขนาด รูปร่าง และรูปทรงของใบ ช่อดอก ช่อผล และผล เป็นต้น แต่บางสายพันธุ์ก็มีความคล้ายคลึงกันมาก ไม่อาจใช้วิธีนี้ระบุสายพันธุ์และจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ (รัฐพล, 2551)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตต่างๆ สำหรับเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบัน เช่น เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดความยาวดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes) และ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ประยุกต์มาจากเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และ เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) อีกเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบันคือ Microsatellite หรือ Simple Sequence Repeats (SSRs) จัดเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการข่มร่วม และสามารถใช้จำแนกแตกต่างระหว่างเฮเทอโรไซโกต (Hexterozygous) และ ฮอโมไซโกต (Homozygote) ได้ดี ให้ผลแน่นอนและแม่นยำสูง ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เทคนิค Microsatellite ในการตรวจสอบพันธุ์องุ่นที่ปลูกในประเทศไทย และวิธีตรวจสอบพันธุ์องุ่นเพื่อใช้ควบคุมคุณภาพของการผลิตไวน์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นที่ปลูกในประเทศไทย เพื่อการจำแนกพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

1.2.2 เพื่อสืบค้นข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นทำไวน์ที่สำคัญ ซึ่งปลูกในต่างประเทศเปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นพันธุ์ที่มีชื่อเดียวกันที่ปลูกในประเทศไทย

1.2.3 พัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นในน้ำไวน์ เพื่อยืนยันสายพันธุ์องุ่นที่ใช้ผลิตไวน์ เปรียบเทียบกับที่ระบุในฉลาก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้จากงานวิจัย

1.3.1 ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์องุ่นทำไวน์ที่ปลูกในประเทศไทยสำหรับใช้เป็นข้อมูลในการตรวจสอบความตรงตามพันธุ์และใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

1.3.2 ได้ Biomarker ในการจำแนกพันธุ์องุ่นทำไวน์ในประเทศไทย

1.3.3 สามารถตรวจระบุสายพันธุ์องุ่นทำไวน์ เพื่อการควบคุมคุณภาพของการผลิตไวน์ในอุตสาหกรรมไวน์ในประเทศไทย

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปขององุ่น

องุ่นมีชื่อสามัญว่า Grape จัดอยู่ในวงศ์ *Vitacea* สกุล *Vitis* ชื่อพฤกษศาสตร์ *Vitis vinifera* L. ซึ่งมีอยู่ประมาณ 11 สกุล รวม 600 ชนิด *Vitis* ทั่วโลกมีอยู่ประมาณ 10,000 สายพันธุ์ (Chadha and Shikhamany, 1999) แต่ชนิดที่มีปลูกกันมากที่สุดในโลกอยู่ในกลุ่ม *Vitis vinifera* ซึ่งมีมากว่า 7,000 สายพันธุ์ (Cuisset *et al*., 1995) องุ่นเป็นไม้เลื้อยประเภทไม้ยืนต้นเกิดในแถบอากาศอบอุ่น สามารถเจริญได้ดีในเขตอากาศกึ่งร้อนถึงร้อน องุ่นมีถิ่นกำเนิดแถบอยู่แถบ Asia minor และ Caspian sea basin (ปวิณ, 2504; นันทกร, 2546) สามารถเจริญเติบโตได้ดีตั้งแต่เส้นละติจูดที่ 20° ถึง 51° เหนือ และ 20° ถึง 40° ใต้ อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 10-20 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นภูมิอากาศแบบคอเคซัส (Caucasus) เป็นถิ่นกำเนิดองุ่นที่ใช้ทำไวน์ชนิด *Vitis vinifera* (นันทกร, 2546) โดยส่วนใหญ่แล้วนิยมปลูกองุ่นสายพันธุ์ยุโรปประมาณ 90 % ทั่วโลก เพราะส่วนใหญ่มีคุณภาพดี และมีหลายชนิดให้เลือก เพื่อความเหมาะสมในการใช้รับประทานสด หรือใช้ผลิตไวน์ (ประดิษฐ์, 2543) สำหรับพื้นที่ปลูกองุ่นของประเทศไทยจะมีอยู่หนาแน่นในแถบตอนกลางของประเทศ ซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยต่อปี 1,300-1,450 มิลลิเมตร ความชื้นสัมพัทธ์ 60-90 เปอร์เซ็นต์ (สุรศักดิ์, 2540) พันธุ์องุ่นที่ปลูกเป็นการค้าในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็น พันธุ์ที่ใช้รับประทานผลสด ที่นิยมปลูกมาก คือพันธุ์ White Malaga และ พันธุ์ Cardinal (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548) นอกจากองุ่น 2 พันธุ์ที่ได้กล่าวมาแล้วยังมีพันธุ์อื่นๆ ที่นิยมปลูก ได้แก่พันธุ์ Beauty Seedless, Carolina Black Rose, Early Muscat, Flame Seedless, Kyoho, Loose Perlette และ Ruby Seedless เป็นต้น ซึ่งใช้รับประทานผลสด และนอกจากนี้ยังมีพันธุ์ที่ใช้ทำไวน์แดงที่นิยมปลูก คือ พันธุ์ Shiraz ส่วนอีกพันธุ์ที่ใช้ทำไวน์ขาว คือพันธุ์ Chenin Blanc (สุรศักดิ์ และจรัล, 2548; Nilnond, 2001)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไปขององุ่น

ปวิณ (2504); นันทกร (2546); รัฐพล (2549) ได้อธิบายลักษณะทั่วๆ ไปขององุ่นโดยแบ่งออกเป็นส่วนต่างๆ ดังนี้

ราก (Root) ระบบรากองุ่นส่วนใหญ่เป็นรากแขนง (lateral root) ทั้งนี้เนื่องจากนิยมขยายพันธุ์โดยวิธีการตอนหรือปักชำต้นตอ จากนั้นจึงนำตาหรือกิ่งพันธุ์ดีมาติดบนต้นตอ รากส่วนใหญ่จะแผ่ออกทางด้านข้าง รากขององุ่นจะหยั่งลึกลงไปในดิน แต่ในกรณีที่โครงสร้างดินดีอาจหยั่งลึกได้มากกว่านั้น

ลำต้น (Trunk) องุ่นเป็นพืชเถาเลื้อยจะพยุงโดยใช้มือเกาะ (tendril) จับต้นไม้หรือสิ่งต่างๆ ที่อยู่ข้างๆ ลำต้นขององุ่นถ้าปล่อยให้เจริญเติบโตตามธรรมชาติจะสามารถเจริญได้ยาวมาก เพราะฉะนั้นจึงต้องมีการตัดแต่งกิ่งเพื่อให้เกิดกิ่งสาขาและกิ่งแขนง ดังนั้นลำต้นองุ่นจึงหมายถึง ส่วนที่อยู่เหนือระดับพื้นดินขึ้นไปจนถึงบริเวณที่แยกเป็นกิ่งสาขา

กิ่งแขนง หรือ กิ่งสาขา (Branch) กิ่งขององุ่นสามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ แขน (arm) เป็นกิ่งที่แยกออกจากลำต้น ส่วนที่สองคือ ตอกิ่ง (spur) และ กิ่งแก่ (cane) เป็นกิ่งที่แยกออกจากกิ่งแขน ทำหน้าที่ออกดอกและออกผล ส่วนใหญ่จะมีสีน้ำตาลและเปลือกจะแตก และส่วนที่สามคือ กิ่งอ่อน (shoot) จะมีลักษณะเป็นสีเขียวหรือน้ำตาลอ่อน ๆ เปลือกเรียบไม่ค่อยมีรอยแตก ในระยะนี้ควรตัดแต่งกิ่งให้เหลือตาไว้เพียง 3-4 ตา

ใบ (Leaf) ใบองุ่นมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) เป็นส่วนที่ติดกับยอดอ่อนโดยมีก้านใบอยู่ระหว่างกลางลักษณะแบนคล้ายฝ่ามือ แต่ละใบจะมีเส้นใบ จำนวน 5 เส้น แยกออกจากก้านใบ ขอบใบมีลักษณะเป็นหยักคล้ายฟันเลื่อย (secration) มีรูปร่างแตกต่างกัน ผิวใบมีลักษณะต่างๆ คือ เรียบ (smooth) ขรุขระ (rogose) ลักษณะเว้า (pineched closed concave) ลักษณะโค้งนูน (rolled over or conver) ขึ้นอยู่กับพันธุ์องุ่น

มือเกาะ (Tendril) เป็นส่วนที่แยกออกมาจากข้อตรงข้ามกับใบ เป็นช่อที่ไม่พัฒนาเป็นดอก ทำหน้าที่คล้ายมือ เพื่อจับลำต้นหรือเถาเกาะกับวัสดุ เพื่อให้เถาองุ่นเลื้อยไปได้ อาจมี 2 แฉก หรือ 3 แฉก ได้เส้นกลมเรียวเล็กและเหนียว จะอยู่บริเวณตอนปลายของกิ่งบางชนิดจะอยู่ตรง และมีสีต่างๆ กันขึ้นอยู่กับพันธุ์องุ่น

ตา (Bud) เป็นส่วนที่อยู่โคนใบที่พร้อมจะแตกออกมาเป็นยอดอ่อนเรียกว่าตาข้าง (lateral or axillary) ตาที่อยู่ส่วนยอดอ่อนเรียกว่าตายอด (terminal bud) ตาข้างเป็นตารวม (compound bud) ประกอยด้วยตาเอก จะมีลักษณะขนานใหญ่อยู่ตรงกลาง และตารอง (secondary bud) 2 ตา มีขนาดเล็กทำหน้าที่เป็นตาสำรอง และจะเจริญเติบโตเป็นกิ่งเมื่อตาเอกถูกทำลาย หรืออาจเกิดควบคู่กันไปกับตาเอก

ช่อดอกและดอกย่อย (Inflorescence and Floret) ช่อดอกจะเกิดจากกิ่งใหม่ที่เพิ่งแตกออกมา ลักษณะของดอกจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ กิ่งหนึ่ง จะมีช่อดอกได้ 1-3 ช่อ ดอกของอุ่นแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ ดอกเพศผู้ (staminate flower) ดอกสมบูรณ์เพศ (hermaphrodite flower) และดอกเพศเมีย (pistilate flower) ตำแหน่งของช่อดอก ที่เกิดนั้นจะอยู่ตรงข้ามกับใบเช่นเดียวกับมือเกาะ รูปร่างของช่อดอกก็จะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ส่วนมากมักเป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) และส่วนใหญ่มีการผสมเกสรภายในดอกเดียวกัน (self-fruitful)

ผล (Fruit) ลักษณะผลอุ่นเป็นแบบ berry มีรูปร่างตั้งแต่กลมถึงยาว การเจริญเติบโตของผลนั้นเป็นแบบ double sigmoid curve โดยในระยะแรกนั้นจะเจริญเติบโตเร็วมากจนถึงผลใกล้เปลี่ยนสี ซึ่งในระยะนี้ผลจะมีสีเขียวเหมือนกันหมดทุกพันธุ์ อาจแตกต่างกันที่ความแก่อ่อนของสี เมื่อเข้าสู่ระยะที่สองนั้นเปลือกของผลจะเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง ชมพู แดง ม่วง ดำ หรือสีอื่นๆ เปลือกผลของอุ่นในแต่ละพันธุ์จะมีความหนาและเหนียวแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์อุ่น

เมล็ด (Seed) โดยทั่วๆ ไปเมล็ดของอุ่น จะมีรูปร่างแบบ pyriform หรือรูปผลแพร์ บริเวณตรงกลางทางด้านหน้า (ventral หรือ front site) ของเมล็ดจะมีลักษณะนูนเป็นสันขึ้นมา ส่วนด้านหลัง (dorsal หรือ back site) ของเมล็ดมีลักษณะบวมขึ้นมาเป็นขอบรอบเมล็ด ถัดเข้ามาจะมีลักษณะเป็นร่อง 2 ร่องที่อยู่ทางด้านซ้ายและขวาขนาบส่วนตรงกลางซึ่งมีลักษณะนูนเป็นวงกลม ความลึกของร่องทั้งสองนี้จะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับพันธุ์อุ่น

พวงอุ่น (Clusters) คือกลุ่มของช่อผลที่ยึดอยู่กับกิ่งโดยที่ก้านช่อ (peduncle) ได้พัฒนาไปเป็นแกนกลางของพวงอุ่นเรียกว่า ราคีส (rachis) ซึ่งเป็นส่วนของช่อขั้วบนจนถึงปลายสุดของก้านผล (pedicel) ช่อมีลักษณะแตกต่างกัน เช่น ช่วงบนกว้างคล้ายไหล (shoulder) หรือลักษณะก้านช่อดอกแตกออกเป็น 2 ก้าน เรียกว่า ปี (wing) ขึ้นอยู่กับความยาวของก้านช่อย่อยๆ ในพวงอุ่น และปริมาณผลต่อพวงอุ่น ซึ่งทำให้เกิดเป็นลักษณะแน่นมากหรือหลวมๆ

2.3 ชนิดของพันธุ์อุ่น

พันธุ์อุ่นสามารถแบ่งตามแหล่งกำเนิดออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ อุ่นสายพันธุ์ยุโรป (European species) และ สายพันธุ์พื้นเมืองอเมริกา (Native America species) นอกจากนี้ยังแบ่งพันธุ์อุ่นออกเป็น อุ่นพันธุ์ทำไวน์ อุ่นพันธุ์รับประทานสด อุ่นพันธุ์ใช้เป็นต้นตอ และ อุ่นลูกผสม ดังต่อไปนี้

2.3.1 องุ่นสายพันธุ์ยุโรป (European species)

องุ่นสายพันธุ์ยุโรป (European species) เกือบทั้งหมดเป็นชนิด *Vitis vinifera* ที่ปลูกทั่วๆ ไป เพื่อการรับประทานผลสด ทำไวน์ ลูกเกด และ น้ำผลไม้ ส่วนใหญ่เป็นองุ่นชนิดนี้ ทั่วโลกมีองุ่นชนิดนี้ประมาณ 5,000 สายพันธุ์ ตัวอย่างเช่น พันธุ์ Thompson Seedless, Muscat of Alexandria, Italia, White Malaga และ Cardinal

2.3.2 สายพันธุ์พื้นเมืองอเมริกา (Native America species)

องุ่นสายพันธุ์พื้นเมืองอเมริกา (Native America species) เป็นองุ่นชนิด *Vitis vinifera* จะปลูกทั่วไปในอเมริกา นอกจากนี้ยังมีพันธุ์พื้นเมืองประมาณ 30 สกุล ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมองุ่นของอเมริกาและยุโรปเช่นกัน เพราะทนต่อศัตรูพืช และสิ่งแวดล้อมต่างๆ จึงถูกนำไปทำการผสมกับ *V. vinifera* ให้ได้ลักษณะพันธุ์ที่ดี และบางพันธุ์มีลักษณะที่ดีเพื่อใช้ทำต้นตอ นอกจากนี้องุ่นพันธุ์พื้นเมืองอเมริกายังแบ่งออกเป็น

(1) *Vitis larusca* (fox grape) ได้แก่ พันธุ์ Concord, Niagara และ Isabella

(2) *Vitis riparia* (river bank grape) ได้แก่ พันธุ์ Beta, Clinton, Bacco Noir, Marechal Foch, C3309, 5BB และ SO4

(3) *Vitis aestivaris* (sumer, pigeon or winter grape) ได้แก่ พันธุ์ Norton และ Cynthiana

(4) *Vitis rupestis* (mountain grape) ได้แก่ พันธุ์ St.George, 99R, 140Ru และ AXR1

(5) *Vitis lincecumii* (fox grape) ได้แก่ พันธุ์ Bailey, Beacon, Ellen Scott และ Mrague Rite

(6) *Vitis champini* ได้แก่ พันธุ์ Champanel, Lomanto และ Nitodul

สำหรับพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอ (Rootstocks) ได้แก่ *Vitis berandieri*, *V. cordifordieri*, *V. doaniana*, *V. longii*, *V. cinerea*, *V. monicola*, *V.riparia* และ *V. rupestis*

นอกจากนี้ยังมีอีก 2 สกุล ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองของอเมริกาที่มีลักษณะพิเศษแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ คือ *V.rotundiforia* และ *V. munsoniana* มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์แตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ ลักษณะผลไม่รวมกันเป็นกลุ่มติดกัน (bunch-grape) ใน 1 ช่อ จะติดผลช่อเดียวช่อละประมาณ 6-24 ผล และผลจะไม่แก่พร้อมกัน ทั้ง 2 พันธุ์ไม่สามารถผสมกับองุ่นชนิด bunch-grape และการทาบกิ่งองุ่นอื่นๆ ก็ยากมาก มีความทนทานต่อโรคในแถบภาคใต้ของอเมริกา พันธุ์นี้รู้จักกันดี ได้แก่

(7) *Vitis rotundiforia* (muscadine) ได้แก่ พันธุ์ Scuppernong, Magnolia, Carlos

(8) *Vitis munsoniana* (brid, everbearing grape) ไม่มีชื่อพันธุ์แต่จัดอยู่ในกลุ่ม Muscadine Grape

ส่วนองุ่นพันธุ์มัสคาดีน (Muscadine Grape) จัดเป็นองุ่นที่มีลักษณะพิเศษดังกล่าวข้างต้นแล้ว นอกจาก 2 สกุล แล้วยังมีอีกชนิดหนึ่ง คือ *Vitis popenoei* แต่การผลิตเป็นการค้าส่วนใหญ่ใช้ชนิด *V. rotundifolia* องุ่นพันธุ์มัสคาดีน จะมีลักษณะกลิ่นหอมเป็นพิเศษ จึงนิยมใช้ในอุสาหกรรมเหล้าไวน์ น้ำผลไม้ แยม ในอเมริกาไวน์ขาวหลายชนิดจะมีชื่อว่า มัสคาดีน หรือ สคุปเปอร์นองแชมเปญ และบรั่นดีก็ผลิตจากองุ่นชนิดนี้ (นันทกร, 2546) นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งพันธุ์องุ่นออกเป็น 4 กลุ่ม

2.3.3 องุ่นสำหรับผลิตไวน์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

(1) องุ่นสำหรับทำไวน์แดง ได้แก่ Shiraz หรือ Syrah, Merlot, Cabernet Sauvignon, Greenache Noir, Rubired, Zinfandel, Cabernet Franc, Pinot Noir, Merichal Foch, Barbera, Cinsaut และ Tempranillo

(2) องุ่นสำหรับทำไวน์ขาว ได้แก่ พันธุ์ Chardonnay, Chenin Blanc, Sauvignon Blance, Semilon, Macabeu Blanc และ Riesling

2.3.4 องุ่นสำหรับรับประทานสด สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ

(1) องุ่นสำหรับประทานสดชนิดไม่มีเมล็ดผลสีเขียวหรือเหลือง ได้แก่ พันธุ์ Perlette, Loose Perlette, Delight, Emeral Seedless, Thomuscat, Dawn Seedless และ Centennial Seedless

(2) องุ่นสำหรับประทานสดชนิดไม่มีเมล็ดผลสีแดง แดงอมม่วง หรือดำ ได้แก่ พันธุ์ Beauty Seedlees, Marroo Seedless, Flame Seedlees, Ruby Seedlees และ Fantasy Seedless

(3) องุ่นสำหรับประทานผลชนิดมีเมล็ด ผลสีเขียวหรือเหลือง ได้แก่ พันธุ์ White Malaga, Italia, Muscat of Alexandria และ Early Muscat

(4) องุ่นสำหรับประทานสดชนิดมีเมล็ดผลสีแดง แดงอมม่วง หรือดำ ได้แก่ พันธุ์ Black Ribier, Rachinee Dum, Black Rose, Black Queen, Exotic, Kyoho, Muscat Hamberg และ Carolinal เป็นต้น (นันทกร, 2546; รัฐพล, 2551)

2.3.5 องุ่นสำหรับเป็นต้นตอ (Rootstocks)

ในสหรัฐอเมริกาจะใช้พันธุ์พื้นเมืองของอเมริกา และลูกผสมใหม่ๆ เพื่อให้มีความต้านทานต่อโรคแมลง ทนต่อสภาพดิน ทนต่อความแห้งแล้ง และสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่องุ่นพันธุ์ดีมักจะไม่สามารถขึ้นได้พันธุ์ดังกล่าวได้แก่ พันธุ์ Ruggeri ทนทานต่อสภาพดิน กรด ด่าง เกลือ และแห้งแล้งดี พันธุ์ Ramsey ทนต่อไส้เดือนฝอยและดินเกลือ และยังมีพันธุ์อื่นๆ อีกมากหมาย เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ดี สามารถแบ่งตามพันธุ์ได้ดังนี้

พันธุ์ Couderc1613 มีลักษณะเด่น คือ สามารถปรับตัวกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้ดี ต้านทานต่อไส้เดือน ทนต่อสภาพน้ำขัง แต่ไม่ทนต่อสภาพแห้งแล้ง ไม่ชอบดินที่มีหินปูนสูง แต่ทนต่อสภาพดินเกลือได้ดี

พันธุ์ Ruggery ลักษณะเด่น คือ มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งและมีหินปูนสูง ต้านทานต่อแมลงกินราก (phylloxera) และไส้เดือนฝอยได้ดีมาก

พันธุ์ Ramsey มีลักษณะเด่น คือ เจริญได้ดีในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ เช่น ดินทรายหรือดินร่วนปนทรายต้านทานต่อไส้เดือนฝอย สำหรับพันธุ์องุ่นที่ติดตากับต้นตอพันธุ์ Ramsey สามารถเจริญเติบโตได้ดีมาก

พันธุ์ Kober 5 BB หรือ 5 BB มีลักษณะเด่น คือ สามารถทนทานต่อความแห้แล้งได้ดีต้าน ทานไส้เดือนฝอยและแมลงกินราก (phylloxera) อ่อนแอต่อโรครากเน่า เกิดจากเชื้อราไฟท๊อปทอร่า (Phytophthora)

พันธุ์ 101-14 มีลักษณะเด่น คือ มีความต้านทานต่อแมลงกินราก (phylloxera) และต้านทานต่อไส้เดือนฝอยปานกลาง ยังสามารควบคุมการเจริญเติบโตของพันธุ์ที่นำมาติดตา ไม่ให้เจริญเติบโตมากเกินไป

พันธุ์ Harmony มีลักษณะเด่น คือ สามารถเจริญเติบโตได้ดี แข็งแรง ทนทานต่อไส้เดือนฝอย แต่มีความทนทานต่อแมลงกินรากน้อย ชอบดินทรายหรือดินร่วนปนทราย และทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี

พันธุ์ Ritcher มีลักษณะเด่น คือ สามารถทนต่อสภาพแห้งแล้ง เจริญเติบโตได้ดีในสภาพพื้นที่ลาดชันในสภาพดินที่อุดมสมบูรณ์ และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพันธุ์ที่นำมาติดตาได้ดีมาก ทำให้มีการเจริญเติบโตทางลำต้นมากไปติดผลน้อย ต้านทานต่อแมลงกินราก แต่อ่อนแอต่อไส้เดือนฝอย

พันธุ์ Fercal มีลักษณะเด่น คือ สามารถทนต่อสภาพดินด่างที่มีแคลเซียมสูง ทนต่อสภาพแห้งแล้ง และต้านทานต่อแมลงกินรากได้ดีพอสมควร

พันธุ์ Paulsen มีลักษณะเด่น คือ ทนทานต่อสภาพแห้งแล้งดีมาก เจริญเติบโตได้ดีในสภาพดินที่มีหินปูนสูง ทนทานต่อแมลงกินรากสูง แต่อ่อนแอต่อไส้เดือนฝอยบางชนิด

พันธุ์ SO4 มีลักษณะเด่น คือ ไม่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมแห้งแล้ง มีการเจริญเติบได้ดีปานกลาง ทนต่อแมลงกินรากและไส้เดือนฝอยได้ดี เจริญเติบโตในดินด่างที่มีหินปูนได้ดี ชอบสภาพดินที่มีความชื้นสูง

2.3.6 องุ่นลูกผสม

เนื่องจากองุ่นจะมีลักษณะแตกต่างกันเป็นจำนวนมากทั้งด้าน กลิ่น รส ผลผลิต ความต้านทานโรค ความต้านทานศัตรูพืช และการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม องุ่นแต่ละพันธุ์อาจจะมีลักษณะที่แตกต่างกันไป เพื่อให้ได้ลักษณะพันธุ์ตามที่ต้องการดังกล่าว ส่วนใหญ่แล้วลูกผสมจะเป็นการผสมระหว่างองุ่นยุโรป (*V. vinifera*) กับองุ่นพื้นเมืองอเมริกา เพราะองุ่นยุโรปส่วนใหญ่จะมีคุณภาพดี แต่ไม่มีความต้านทานโรคและสภาพแวดล้อม เช่น องุ่นอเมริกา ในญี่ปุ่นมีการผสมพันธุ์ให้ได้พันธุ์ใหม่ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของญี่ปุ่น และได้ผลผลิตที่ดีมีคุณภาพ เช่น พันธุ์เกียวโฮ (Kyoho) เป็นลูกผสมระหว่าง Ishihara Wase x Cabernet Sauvignon หรือ พันธุ์ Kai Noir เป็นลูกผสมระหว่าง Black Queen x Cabernet Sauvignon (นันทกร, 2546) พันธุ์ Rotgipfler เป็นลูกผสมระหว่าง Traminer x Veltliner Roter เป็นต้น (Sefc *et al*., 1998)

2.4 การปลูกองุ่นในประเทศไทย

ในประเทศไทยจากการรายงานของกรมวิชาการเกษตร เชื่อว่ามีการนำเข้ามาปลูกในสมัยรัชกาลที่ 5 และพบว่าเริ่มมีการปลูกองุ่นในสมัยรัชการที่ 7 แต่ยังไม่แพร่หลาย จนกระทั้งประมาณปี พ.ศ. 2493 หลวงสมานวนกิจ ได้นำเอาองุ่นจากแคลิฟอร์เนียมาปลูกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประมาณปี 2506 อาจารย์ปวิณ ปุณณศรี และคณะได้นำเอาองุ่นสายพันธุ์ยุโรป ได้แก่ พันธุ์ Carolinal, Muscat Hamberg, Early Muscat และ Emeral ให้ผลดีเป็นที่พอใจมาก จึงนำไปขยายผลทดลองในแปลงของเกษตรกร เพื่อผลิตองุ่นในทางการค้าออกไป ในระยะแรกทำการปลูกที่จังหวัดราชบุรี นครปฐม และสมุทรสาคร ปัจจุบันได้มีการขยายพื้นที่ปลูกองุ่นเพิ่มมากขึ้นทั่วประเทศ และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ นอกจากนี้ยังมีบริษัทเอกชนและชาวสวนขนานใหญ่ให้มีความสนใจปลูกองุ่นทำไวน์ จึงได้มีการนำพันธุ์ที่ผลิตไวน์ขาวไวน์แดง และพันธุ์รับประทานผลสด เข้ามาปลูกเพิ่มมากขึ้น

2.5 พันธุ์องุ่นที่ปลูกในประเทศไทย

ปัจจุบันพันธุ์องุ่นที่ปลูกในประเทศไทยมีหลากหลายสายพันธุ์ ที่เกษตรกรให้ความสนใจการปลูกองุ่นจึงได้นำพันธุ์องุ่นพันธุ์ต่างๆ เข้ามาปลูก สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักๆ คืออุ่นสำหรับรับประทานสดและองุ่นสำหรับผลิตไวน์ ดังกล่าวมาข้างต้นแล้ว สำหรับในประเทศไทยต้นตออุ่นที่นิยมกันมากที่สุด คือ ลูกผสมระหว่างพันธุ์ Solonish x Othello 1613 เรียกอีกชื่อหนึ่งว่าพันธุ์ Couderc1613C ลักษณะเด่นของพันธุ์นี้ คือ สามารถปรับตัวและเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อม สภาพพื้นที่ของประเทศไทยได้ดี

2.6 พันธุ์องุ่นทำไวน์บางสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา

พันธุ์ Shiraz หรือ Syrah เป็นองุ่นทำไวน์แดง มีต้นกำเนิดจากจากแคว้น Cotes-du-Rhone ประเทศฝรั่งเศส ให้ผลผลิตที่มีคุณภาพ มีสีเปลือกเข้ม ผลมีลักษณะกลมเล็กถึงปานกลางสีดำ ช่อยาวปานกลาง และการเจริญเติบโตของลำต้นได้ดีมาก มีการตัดแต่งกิ่งแบบ spur prune คือ ให้มีตากิ่งละ 2-3 ตา

พันธุ์ Carbernet Sauvignon เป็นองุ่นทำไวน์แดง มีต้นกำเนิดจากแคว้น Bordeux ประเทศฝรั่งเศส มีสีแดงไม่ค่อยเข้มนัก ยอดและใบมีขนาดเล็ก โดยทั่วไปการเจริญเติบโตไม่ดีนัก ผลมีลักษณะกลมขนาดเล็กสีดำ ช่อผลเล็ก มีกลิ่นหอมคล้ายพริกสด การสุกแก่ของผลช้ากว่าพันธุ์อื่นๆ มีการตัดแต่งกิ่งแบบ spur prune คือ ให้มีตากิ่งละ 2-3 ตา

พันธุ์ Tempranillo เป็นองุ่นทำไวน์แดง มีต้นกำเนิดจากจากแคว้น Rioja ประเทศสเปน ผลมีลักษณะขนาดเล็กสีแดงเข้ม ช่อใหญ่ มีกลิ่นคล้ายกลิ่นน้ำผึ้ง แต่ให้จำนวนช่อต่อต้นค่อนข้างต่ำ อ่อนแอต่อโรค คือจะเกิดโรคก่อนพันธุ์อื่นๆ ถ้าสภาพอากาศเหมาะสมกับการเกิดโรค เช่น มีฝนตกหรือความชื้นสูงๆ องุ่นพันธุ์ที่ปลูกสำหรับผลิตไวน์แดง

พันธุ์ Chenin Blanc เป็นองุ่นทำไวน์ขาว มีต้นกำเนิดจากแคว้น Loire ประเทศฝรั่งเศส ให้ผลผลิตสูง ไม่ค่อยเกิดโรครบกวน มีช่อต่อกิ่ง 2-3 ช่อ ผลมีลักษะกลมขนาดเล็กสีเขียวให้ช่อผลปานกลาง และการเจริญเติบโตของลำต้นได้ดีมาก มีการตัดแต่งกิ่งแบบ spur prune คือ ให้มีตากิ่งละ 2-3 ตา

พันธุ์ Colombard เป็นองุ่นทำไวน์ขาว ต้นกำเนิดจากแคว้น Charentes และ Gascony ประเทศฝรั่งเศส ผลมีลักษณะกลมขนาดเล็กสีเขียวให้ช่อขนาดใหญ่ ลักษณะทั่วไปการเจริญเติบโตดี มีจำนวนใบมากให้ผลผลิตดี ให้ผลผลิตสูงใกล้เคียงพันธุ์ Chenin Blanc (นันทกร, 2546; รัฐพล, 2551)

2.7 ไวน์

ไวน์ เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทหนึ่ง ซึ่งผลิตจากการหมักน้ำองุ่นด้วยเชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่ามีความเหมาะสมต่อการผลิตไวน์ มีการควบคุมการหมักและควบคุมการผลิตเป็นอย่างดี ไวน์ที่ผลิตจากผลไม้ชนิดอื่นๆ เรียกว่าไวน์ผลไม้ หรือ Fruit wines ต้องระบุชื่อผลไม้ไว้บนฉลาก เช่น ไวน์สับประรด ไวน์ลิ้นจี่ ไวน์มะเม่า ไวน์มะเกี๋ยง เป็นต้น ไวน์นอกจากจะผลิตจากองุ่น

และผลไม้แล้ว ยังผลิตจากวัตถุชนิดอื่นๆ เช่น ใบไม้ ดอกไม้ พืชผักสมุนไพร เครื่องเทศ ข้าว น้ำตาลสด น้ำผลไม้เข้มข้น น้ำผึ้ง เป็นต้น ไวน์ที่ไม่ผ่านการกระบวนการกลั่นจะมีปริมาณแอลกอฮอล์ 8-14 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ปัจจุบันพบว่าองุ่นที่ผลิตไวน์ขาวพันธุ์ Chenin Blanc และองุ่นแดงพันธุ์ Shiraz เพียง 2 พันธุ์ ที่เหมาะสมในการผลิตไวน์เพื่อการค้าในประเทศไทย (ประดิษฐ์, 2543) สำหรับไวน์ที่ผลิตในประเทศไทย ยังไม่เป็นที่นิยมของผู้บริโภคอย่างแพร่หลายมากนัก เนื่องจากยังอยู่ในระยะเริ่มต้นการผลิต ยังต้องมีการปรับปรุงคุณภาพ กลิ่นรส และปริมาณการผลิตให้เพียงพอต่อการจำหน่ายทั่วไป คุณภาพของไวน์องุ่น ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ คุณภาพของน้ำองุ่น ซึ่งมีคุณภาพแตกต่างกันไป ขึ้นกับสภาพแวดล้อมของไร่องุ่น ดินฟ้าอากาศ ปริมาณน้ำฝน ความสูงของพื้นที่ปลูก และสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการหมัก ที่มีส่วนสำคัญกับคุณภาพของไวน์ที่ผลิตได้ (Amerine *et al*., 1980) ในการผลิตไวน์ต้องเลือกใช้พันธุ์องุ่นให้เหมาะสมกับพื้นที่ เพราะว่าคุณภาพของไวน์ขึ้นอยู่กับคุณภาพขององุ่นโดยตรง เพื่อให้ได้องุ่นที่มีคุณภาพเหมาะสมต่อการผลิตไวน์เพิ่มขึ้น

2.7.1 ประเภทของไวน์ อาจแบ่งประเภทหรือชนิดของไวน์หลายแบบ โดยอาศัยลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

การจำแนกไวน์ตามปริมาณของแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ แบ่งเป็น 2 พวก

(1) ไวน์ธรรมดา (natural wine) มีแอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 9 - 14 ทำจากการหมักน้ำตาลที่มีในองุ่นจนสมบูรณ์

(2) ไวน์อย่างแรง (dessert หรือ appetizer wine) มีแอลกอฮอล์สูงถึงร้อยละ 14 - 21 โดยการเติมแอลกอฮอล์กลั่นลงไป

การจำแนกไวน์ตามลักษณะสี แบ่งได้เป็น

(3) ไวน์แดง ทำจากองุ่นแดง หรือสีม่วงจนถึงม่วงดำ

(4) ไวน์ขาว ทำจากองุ่นขาว หรือองุ่นสีเหลืองทอง สีของไวน์ อาจมีสีเหลืองจนถึงเหลืองทอง บางทีอาจมีสีน้ำตาล

(5) ไวน์สีชมพูทำจากการใช้องุ่นแดงที่สกัดจากเปลือกเพียงบางส่วน เมื่อไวน์สีชมพูแล้วจึงแยกเปลือกออกจากที่หมัก

การจำแนกไวน์ตามปริมาณความหวาน แบ่งได้เป็น

(6) ไวน์ไม่หวาน (dry wine) เป็นไวน์ที่ไม่มีความหวานเลย มีปริมาณน้ำตาลในไวน์น้อยกว่าร้อยละ 0 - 2

(7) ไวน์หวาน (sweet wine) เป็นไวน์ที่อาจมีน้ำตาลประมาณร้อยละ 14 จึงมีรสหวาน

การจำแนกไวน์ตามโอกาสอื่น ทั่วๆ ไป แบ่งได้ดังนี้

(8) ไวน์สำหรับกระตุ้นน้ำย่อย ใช้ดื่มก่อนรับประทานอาหาร เพื่อเรียกน้ำย่อย มักจะเป็นไวน์ที่มีรสหวาน และมีแอลกอฮอล์สูง

(9) ไวน์สำหรับดื่มขณะรับประทานอาหาร (table wine) นิยมใช้ไวน์ที่ไม่มีรสหวาน โดยทั่วไปมีแอลกอฮอล์ ร้อยละ 9 – 14

(10) ไวน์ดื่มหลังอาหาร ได้แก่ พอท (port), ครีมเชอรี่ (cream sherry), โทเค (tokay), มาละกา (malaga) เป็นต้น

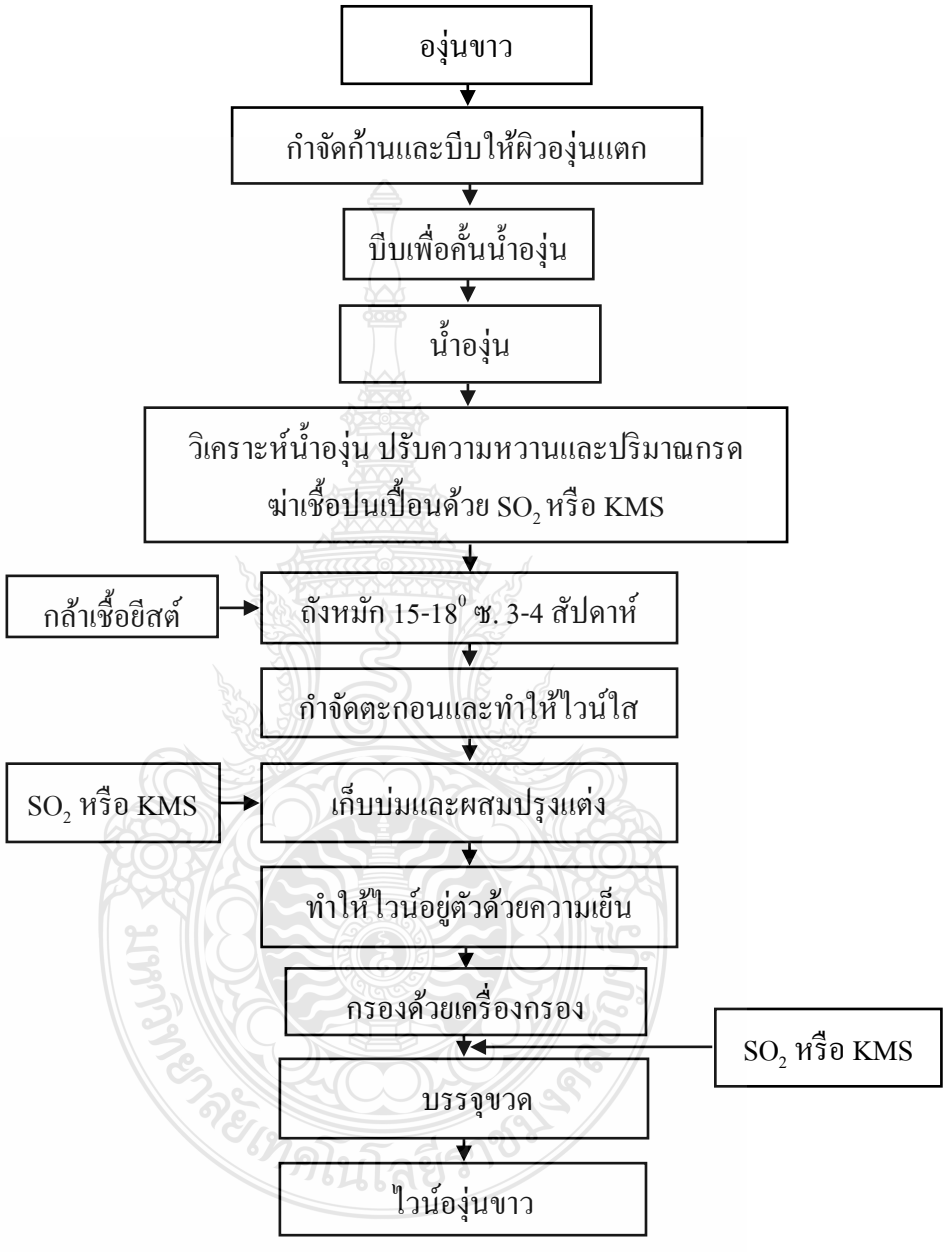
นอกจากนี้ยังมีชนิดไวน์ที่ได้รับการปรุงแต่งให้มีลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น รส เปลี่ยนไปจากเดิม ได้แก่ ไวน์ชนิดที่มีแก๊สอัดอยู่ เรียกว่า sparkling wine เช่น แชมเปญ (champagne) และไวน์ชนิดเติมเครื่องสมุนไพร เช่น เวอร์มุธ (vermouth) (สืบศักดิ์, 2534)

2.8 ขั้นตอนการผลิตไวน์

การทำไวน์ทั้งไวน์แดงและไวน์ขาว ต่างมีการพัฒนาที่แตกต่างกันไป เพื่อปรับปรุงคุณภาพของไวน์ เช่น พัฒนาลักษณะของสีไวน์แดงด้วยการให้มีการหมักองุ่นแดงพร้อมทั้งเปลือก (skin contact) หรือไวน์ขาวใช้การแช่เนื้อองุ่นเขียวในน้ำองุ่นก่อนหมัก (pomace contact) เพื่อเพิ่มสารให้กลิ่นรสในไวน์ให้เข้มข้น กระบวนการผลิตไวน์ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ วัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบ ขั้นตอนการหมักและขั้นตอนการพัฒนาผลิตภัณฑ์หลังการหมัก ซึ่งแต่ละขั้นตอนจะมีผลต่อคุณภาพของไวน์ที่ผลิตได้ (ลูกจันทร์, 2551)

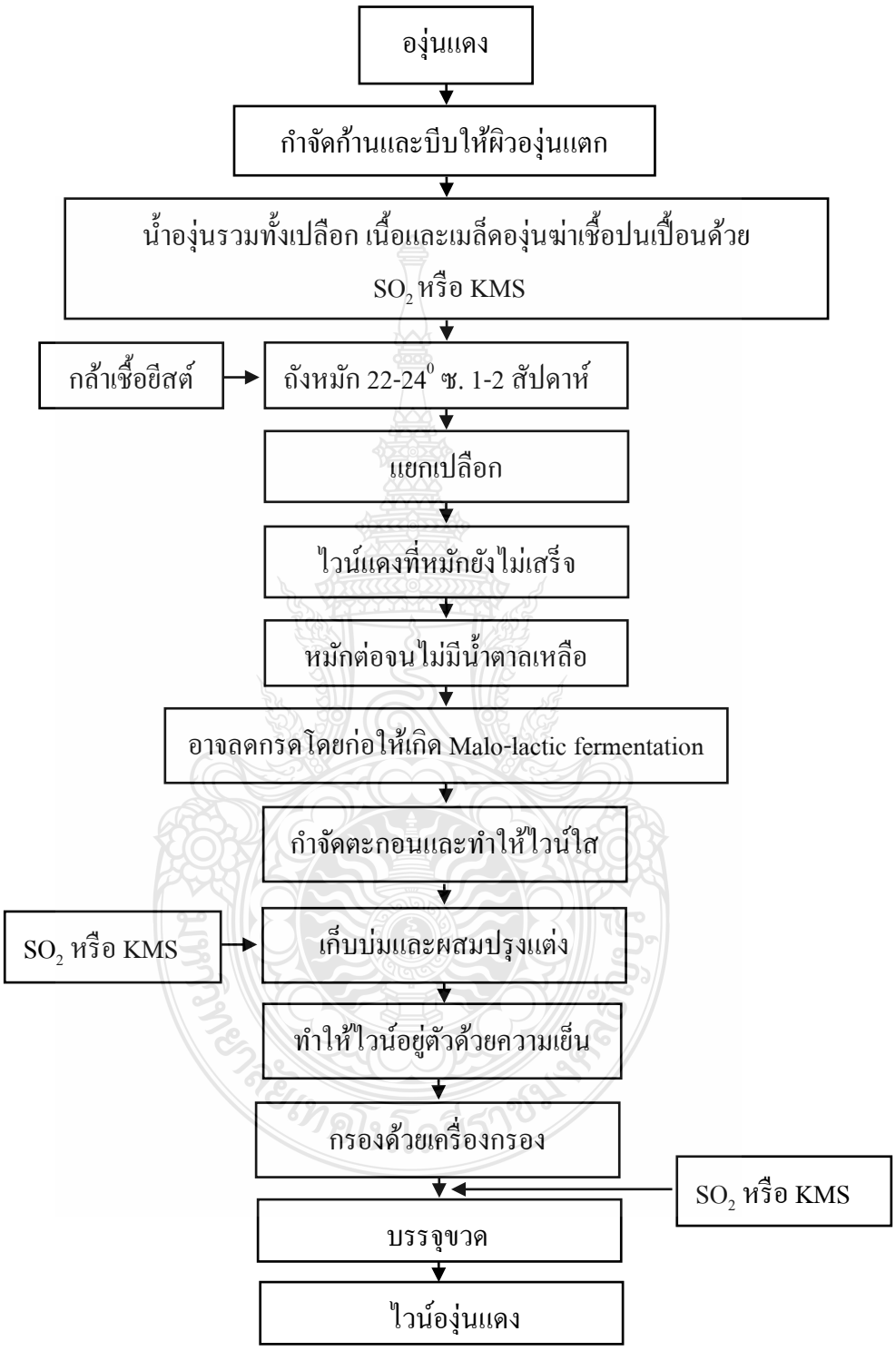
ขั้นตอนการผลิตไวน์ขาวจากองุ่นและการผลิตไวน์แดงจากองุ่น ได้แสดงในภาพที่ 2.1 และภาพที่ 2.2 มีดังต่อไปนี้

ขั้นตอนการผลิตไวน์ขาวจากองุ่น



ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการผลิตไวน์ขาวจากองุ่น (ประดิษฐ์, 2543)

ขั้นตอนการผลิตไวน์แดงจากองุ่น



ภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการผลิตไวน์แดงจากองุ่น (ประดิษฐ์, 2543)

2.9 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ โดยอาจมีดีเอ็นเออยู่ที่ตำแหน่ง หนึ่งๆ บนโครโมโซม ที่อยู่ภายในนิวเคลียร์จีโนม (nuclear genome) คลอโรพลาสต์จีโนม (chloroplast genome; cp genome) และ ไมโตคอนเดรียจีโนม (mitochondria genome; mt genome) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ (หทัยรัตน์ และณัฐหทัย, 2548) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอหรือเกิดโพลีมอร์ฟีซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน

วิธีตรวจสอบโพลีมอร์ฟีซึมของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) ทำได้โดยการหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือ ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ วิธีการตรวจสอบอาจทำได้โดยใช้วิธีไฮบริไดเซชันหรือวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) เป็นหลัก (ปรารถนา, 2550)

2.10 ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมาย คือ สิ่งที่ใช้บอกความแตกต่างระหว่างสิ่ง 2 สิ่ง ซึ่งสามารถนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตได้เช่นกัน สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลเป็นสิ่งที่บอกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) เป็นที่มาของเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ที่เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เครื่องหมายชีวเคมี (biochemical marker) และเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker หรือ DNA marker) ดังนั้นเครื่องหมายทางพันธุกรรม จึงมี 3 ประเภท ตามระดับการแสดงออก

2.10.1 ระดับทางสัณฐานวิทยา (morphological marker)

เป็นเครื่องหมายที่สามารถมองเห็นได้ทันที ซึ่งก็คือลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะสีตา หรือสีผมในมนุษย์ ลักษณะสีกลีบดอกของกุหลาบ หรือดอกกล้วยไม้เป็นต้น ซึ่งลักษณะสัณฐานวิทยามีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์พืช หากเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ผลผลิตสูง หรือต้านทานต่อโรคและแมลง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกได้ ข้อได้เปรียบของเครื่องหมายชนิดนี้คือ ไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการใดมาตรวจสอบเพราะสามารถมองเห็นได้ด้วยตา แต่ก็มีข้อจำกัดมากเช่นกัน เนื่องจากมีอยู่จำนวนจำกัด และที่สำคัญ

คือ การแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยามักได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง เช่น ความสูงต้น ผลผลิต หรือสีดอก ซึ่งได้รับผลกระทบโดยตรงจากความอุดมสมบูรณ์ของดินหรือปุ๋ย รวมทั้งลักษณะบางลักษณะมีการแสดงออกที่บางระยะการเจริญเติบโตเท่านั้น เช่น ลักษณะสีดอกมีการแสดงออกที่ระยะต้นพืชมีดอกเท่านั้น

2.10.2 ระดับชีวเคมี (biochemical marker)

เป็นเครื่องหมายที่สร้างขึ้นจากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ วิธีการศึกษาเอนไซม์ ค่อนข้างง่าย และจัดว่าไม่แพง แต่เครื่องหมายชนิดนี้ มีข้อจำกัดที่การแสดงออกของเอนไซม์ได้รับผลกระทบโดยตรงจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง และระยะการเจริญเติบโตของพืช เช่นเดียวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความจำเพาะเจาะจงต่ำ คือ ถ้ายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไปเล็กน้อย อาจมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดกรดอะมิโน หรือไม่มีก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเพียงเล็กน้อยนี้ไม่สามารถตรวจสอบได้

2.10.3 ระดับโมเลกุล (molecular marker)

เป็นเครื่องหมายที่สร้างมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอจึงถูกเรียกว่า DNA marker ด้วย เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อได้เปรียบตรงที่มีจำนวนมากมายมหาศาล เนื่องจากขนาดจีโนมของพืชมีประมาณ 10^8-10^9 นิวคลีโอไทด์ ในบางจีโนมพืชพบว่ามีการเกิด single nucleotide mutation ทุก 1 กิโลเบส สภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืชไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายชนิดนี้

จุดเด่นของเครื่องหมายโมเลกุลนี้ จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์มากมายในการศึกษาจีโนม และในวงการเกษตร ได้แก่ การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตและการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต การสร้างโพรบ (probe) เพื่อใช้ตรวจสอบโรค หรือตรวจหาสิ่งที่ต้องการ การสร้างแผนที่โครโมโซม การหาตำแหน่งยีนที่ต้องการบนโครโมโซมและการแยกสกัดยีนโดยอาศัยแผนที่ และการใช้เครื่องหมายเพื่อช่วยคัดเลือกลักษณะที่สำคัญ และลักษณะที่มีความยุ่งยากในการคัดเลือก (อรรัตน์, 2548)

2.11 ความสำคัญการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบสายพันธุ์องุ่น

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เป็นการนำเอาคำภาษาอังกฤษ คือคำว่า DNA และ fingerprint มาประกอบกัน คำว่า DNA นั้นเป็นคำย่อของ Deoxy ribonucleic acid ซึ่งเป็นสายพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เป็นตัวกำหนดลักษณะต่างๆ ส่วนคำว่า fingerprint หมายถึง ลายพิมพ์ เมื่อนำทั้งสองคำมา

รวมกันจึงเป็น DNA fingerprint ซึ่งมีความหมายว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดที่มีลักษณะจำเพาะการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ถูกพัฒนาขึ้นและใช้เป็นครั้งแรกโดย Alec Jeffreys ในปี ค.ศ. 1985 เป็นวิธีการที่ใช้บ่งชี้บอกลักษณะจำเฉพาะของแต่ละสิ่งมีชีวิตด้วยดีเอ็นเอ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแต่ละสิ่งมีชีวิตมีโอกาสซ้ำกันมีน้อยมากๆ เท่ากับ 1 ใน 9,340 นอกจากนี้ดีเอ็นเอยังทำหน้าที่เก็บรหัสข้อมูลของพ่อแม่และถ่ายทอดสู่รุ่นลูก ดังนั้นลูกจึงมีลักษณะของพ่อและแม่อยู่ในเซลล์ทุกเซลล์

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืช (DNA fingerprint) คือ รูปแบบของแถบชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นและเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตามโครงสร้างของดีเอ็นเอในพืช ยกเว้นจากพืชโคลนเดียวกัน สายพันธุ์บริสุทธิ์ หรือลูกผสมเดียวกัน ซึ่งลายพิมพ์ DNA ดังกล่าวในพืชแต่ละต้นจะสามารถตรวจสอบซ้ำและให้ผลที่เหมือนกันตลอด ดังนั้นข้อดีของการตรวจลายพิมพ์ DNA คือ สามารถตรวจสอบหาลายพิมพ์ DNA ที่เป็นเอกลักษณ์ของพืชแต่ละต้นได้ สามารถทำซ้ำๆ กัน และได้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง (หทัยรัตน์ และณัฐหทัย, 2548) ในปัจจุบันที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายมีหลายเทคนิค ได้แก่

2.11.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

RFLP เป็นขั้นตอนที่เริ่มจากการตัด จีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดจะถูกเรียงตามขนาดความยาว โดยชิ้นเล็กสุดหรือสั้นสุดจะเคลื่อนไปไกลสุดจากจุดเริ่มต้น จากนั้นย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนล่อนเมมเบรน แล้วนำดีเอ็นเอติดตามที่เรียกว่าดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) ที่เป็นจีโนมิกดีเอ็นเอ หรือ complementary DNA (cDNA) ที่ติดฉลากด้วยสารรังสี (radioisotope) ไปจับ (hybridized) กับดีเอ็นเอคู่สม จากนั้นใช้ฟิล์มเอ็กซ์เรย์ทาบกับแผ่นเมมเบรนเพื่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่มีรังสีบนแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์เทคนิคนี้เรียก autoradiography รูปแบบของจีโนไทป์หรือแถบดีเอ็นเอเป็นแบบข่มสมบูรณ์ที่ปรากฏ หรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีไทด์ (nucleotide) บริเวณจุดจดจำที่เอ็นไซม์ตัดทำให้พืชแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกัน เทคนิค RFLP เป็นเทคนิคแรกที่ได้รับความนิยมสูงในอดีต แต่เนื่องจากขั้นตอนมีความสลับซับซ้อนและเสียเวลามาก ทำให้ความนิยมค่อยๆ ลดลง ซึ่งปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ขึ้นมา มีความสะดวกรวดเร็วและให้ผลดี จึงทำให้เทคนิค RFLP ไม่ได้รับความนิยมในเวลาต่อมา (อรรัตน์, 2548)

2.11.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นจำเพาะโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (polymerase chain reaction) นักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกันชื่อ Kary Mullis ได้คิดค้น PCR เมื่อปี พ.ศ. 2527 หลักการ PCR คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยเริ่มต้นจากดีเอ็นเอต้นแบบ

(template DNA) ในปริมาณเล็กน้อย เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายใหม่มากขึ้น ต้องอาศัยส่วนประกอบสำคัญ 3 ส่วนได้แก่ ไพร์เมอร์ (primers) เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆจับได้อย่างจำเพาะกับปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นคู่ไพร์เมอร์จะเป็นตัวกำหนดความยาวของสายดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณ เอนไซม์ DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการนำเบสต่างๆมาต่อกันทำให้สายดีเอ็นเอยาวขึ้น และ นิวคลีโอไทด์ มี 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ซึ่งใช้สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ นอกจากนี้ยังต้องมี เกลือ $MgCl_2$ และ บัฟเฟอร์ประกอบในปฏิกิริยาอีกด้วย (สุรีพร, 2546 และ รัฐพล, 2549) การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีการใช้ปฏิกิริยา PCR สำหรับวิธีที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้แก่

(1) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นการนำเอาดีเอ็นเอเริ่มต้นที่เป็นสายเดี่ยวขนาด 8-10 นิวคลีโอไทด์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม (random amplification) จากนั้นจึงแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ผ่านอะกาโรสเจล (agarose gel) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจะปรากฏเป็นแถบ ศึกษาตำแหน่งและจำนวนแถบเพื่อดูความแตกต่างในพืชแต่ละชนิดได้

(2) Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคที่รวมเอาเทคนิค RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ตามด้วยการเชื่อมต่อด้วย adapter ที่เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นไม่เกิน 20 เบส แล้วจึงเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยไพร์เมอร์จะจับเฉพาะเจาะจงกับ adapter นั้นๆ ถือเป็นการเลือกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณ จากนั้นจึงแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้พอลิอะคิลาไมด์เจล จะปรากฏชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป็นแถบ วิธีนี้สามารถใช้แยกความแตกต่างได้โดยพิจารณาจากขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (รัฐพล, 2551; สุรีพร, 2546)

(3) Simple Sequence Repeat; SSR หรือ Microsatellites เป็นเทคนิคการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ SSR ถูกสร้างโดยอาศัยคุณสมบัติหนึ่งของดีเอ็นเอเองที่มีการซ้ำของเบส (repetitive sequence) ชุดสั้นๆ เรียงต่อกัน (tandem repeat) กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (genome) ถ้าเป็นการซ้ำของเบสชุดละ 10-60 เบส เรียก minisatellites ถ้าเป็นการซ้ำของชุด 1-6 เบส เรียก microsatellites ตัวอย่างของชุดซ้ำ SSR เช่น CACACACACACACACACA หรือ $(CA)_9$, ACCTGA ACCTGA ACCTGA ACCTGA ACCTGA หรือ $(ACCTGA)_5$ เราสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอช่วงนี้ได้โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส ซึ่งต้องใช้ไพร์เมอร์ที่จับกับลำดับเบสขนานข้างของช่วงซ้ำๆ นี้พืชที่มีจำนวนชุดซ้ำต่างกัน เช่นมีซ้ำ 10 หรือ 20 ชุด หลังจากผ่าน PCR แล้ว จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน (สุชาดา , 2548) จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล ในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต และยังเป็น

Co-dominant marker หรือเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยก homozygous และ heterozygous ออกจากกันได้ตลอดจนสามารถทำซ้ำ (reproducibility) ได้ดีอีกด้วย

2.12 การตรวจสอบพันธุ์องุ่นโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ในปัจจุบันการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้จำแนกและระบุสายพันธุ์องุ่น มีการทำกันอย่างแพร่หลาย ทั้งทางด้านพันธุ์ขององุ่น และชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ อาทิเช่น ใช้เทคนิค RFLP จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการตรวจสอบองุ่นพันธุ์ Pinot Noir 19 และ Pinot Noir 1 ซึ่งมีลักษณะเหมือนกัน โดยการศึกษานี้ทำขึ้นเพื่อสนับสนุนผลการศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา ซึ่งเขาสันนิษฐานว่า องุ่นทั้งสองพันธุ์นี้น่าจะเป็นพันธุ์เดียวกันผล จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค RFLP ตรวจสอบ พบว่า ทั้งสองพันธุ์มีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (Bowers *et al*., 1993)

Barysheva *et al*. (1995) ได้ใช้เทคนิค RAPD และ RFLP ตรวจสอบสายพันธุ์องุ่นในประเทศตุรกี ซึ่งมีหลากหลายชนิดและสายพันธุ์ หรือชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กัน จากการศึกษาพบว่า เทคนิค RAPD สามารถจำแนกสายพันธุ์องุ่นที่อยู่ต่างชนิดและต่างสายพันธุ์กันได้หมดทุกพันธุ์ แต่ในขณะที่เทคนิค RFLP สามารถแยกความแตกต่างได้แค่ระดับชนิดเท่านั้น ส่วนในระดับสายพันธุ์นั้นจำแนกได้เฉพาะบางพันธุ์ โดยพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ใกล้เคียงกันมากอย่างเช่น พันธุ์ Muskat Gamburgskiy กับพันธุ์ Muskat Tairovskiy เทคนิคนี้ไม่สามารถใช้จำแนกได้ อย่างไรก็ดีถ้าเป็นการตรวจสอบพันธุ์พืชที่ไม่ละเอียดมากนัก เทคนิค RFLP ก็สามารถที่จะใช้ตรวจสอบได้ อย่างเช่นในรายงานของ Bowers and Meredith (1996) ได้ใช้เทคนิค RFLP ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และใช้ในการจัดกลุ่มขององุ่นพันธุ์ทำไวน์บางพันธุ์ในรัฐแคลิฟอร์เนียประเทศสหรัฐอเมริกา ในรายงานของ Wang *et al.* (1999) ได้นำเอาเทคนิค RAPD มาใช้ในการจัดกลุ่มขององุ่นสกุล *Vitis* จำนวน 42 พันธุ์ จาก 13 ชนิด ซึ่งได้มาจากศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อพันธุ์องุ่นของมหาวิทยาลัย Florida ในประเทศสหรัฐอเมริกา จากการศึกษาสามารถแบ่งองุ่นออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มของ North American, East Asian และ *V. vinifera* นอกจากนี้แล้วเทคนิค RFLP ยังมีความละเอียดพอที่จะใช้จำแนกพันธุ์องุ่นที่มาจากรัฐฟลอริดาได้ด้วย เทคนิค RAPD สามารถใช้ตรวจสอบพันธุ์องุ่นที่มีระดับทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน มากๆได้ อย่างเช่นในรายงานของ Moreno *et al*. (1995) ที่ใช้ในการจัดจำแนกความแตกต่างในระดับพันธุ์ หรือรายงานของ Ye *et al*. (1998) ซึ่งใช้จัดจำแนกความแตกต่างในระดับโคลน นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจสอบเพื่อยืนยันสายพันธุ์ ในกรณีที่พันธุ์ดังกล่าวมีชื่อเดียวกันและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน (Ulanovsky *et al*., 2002) เป็นต้น

สำหรับองุ่นนั้นเทคนิค AFLP ถูกนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างในทุกระดับ ตั้งแต่ในระดับวงศ์ สกุล และสายพันธุ์ จนถึงในระดับโคลนด้วย ในกรณีที่การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอื่นๆ ไม่สามารถที่จะใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ ซึ่งมีสาเหตุอันเนื่องมาจากพันธุ์เหล่านั้นมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก เช่น เป็นพันธุ์ที่เกิดจากพ่อแม่เดียวกัน หรือขยายพันธุ์จากชิ้นส่วนขยายพันธุ์ที่ไม่อาศัยเพศแล้วเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมขึ้น วิธีการตรวจสอบที่จะนำมาใช้จึงจำเป็นต้องมีความละเอียดมาก (Sefc *et al*., 2001) เทคนิคแรกที่มีรายงานว่าสามารถใช้แก้ปัญหานี้ในองุ่นได้สำเร็จ คือ เทคนิค AFLP โดย Cervera *et al*. (1998) ได้ทำการศึกษาพันธุ์ของอองุ่นในกลุ่ม *V. vinifera* ที่มาจากพ่อแม่เดียวกัน ที่มีการปลูกอยู่ในเขต Rioja ของประเทศสเปน โดยใช้เทคนิค AFLP ในการตรวจสอบเพื่อคัดเลือกพันธุ์ จากนั้นอีกไม่นาน Scott *et al*. (2000a) ได้ใช้เทคนิคนี้ในการจำแนกองุ่นที่เป็น somatic mutant ของพันธุ์ Flame Seedless (มีลักษณะที่แตกต่างไปจากพันธุ์เดิมตรงที่ตาจะแตกก่อน) ออกจากพันธุ์ดั้งเดิมได้เป็นผลสำเร็จ โดยใช้ไพรเมอร์ในการตรวจสอบทั้งหมด 64 คู่ สอดคล้องกับการศึกษาของ Narvaez *et al*. (2000) และ Zulini *et al*. (2003) ที่สามารถจำแนกโคลนขององุ่นพันธุ์ Carbernet Sauvignon จำนวน 48 โคลน และ Picolit จำนวน 39 โคลนออกจากกันโดยใช้เทคนิค AFLP จากผลงานเหล่านี้น่าจะยืนยันได้ว่าเทคนิค AFLP เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการใช้แยกความแตกต่างของพันธุ์พืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมากๆ ได้

2.13 การใช้เครื่องหมาย Microsatellite ในการตรวจสอบสายพันธุ์องุ่น

Microsatellites หรือ SSR คือ ลำดับเบสที่มีลักษณะเรียงต่อซ้ำๆ กัน อย่างต่อเนื่อง กระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม (Morgante and Olivieri, 1993; Paetkau *et al*., 1995) เครื่องหมาย Microsatellites ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกและระบุสายพันธุ์องุ่น เครื่องหมาย Microsatellite ได้ถูกพัฒนาขึ้นจากนักวิจัย 3 กลุ่ม คือ (Thomas and Scott, 1993; Bowers *et al*., 1996; Sefc *et al*., 1999) เนื่องจากมีการแลกเปลี่ยนพันธุ์องุ่นระหว่างแหล่งปลูกต่างๆ ทำให้ไม่ทราบแหล่งกำเนิดขององุ่นพันธุ์นั้นๆ (Paetkau *et al*., 1995) เช่น

Lamboy *et al*. (1998) ได้ศึกษาพันธุกรรมของพันธุ์องุ่นที่เก็บรวบรวมไว้ใน USDA-ARS Plant Genetic Resources Unit (PGRU) เมือง Geneva, N.Y., และ USDA-ARS National Germplasm Repository (NGR) จำนวน 3,600 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ SSR จำนวน 5 คู่ (VVS2, VVS4, VVMD6 และ VVMD7) (Botta *et al*., 1995; Bowers *et al*, 1996; Thomas and Scott, 1993; Thomas *et al*., 1993,1994) สามารถให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 550 แถบ โดยแต่ละไพรเมอร์หรือแต่ละตำแหน่งพบอัลลีล (alleles) ที่มีความ

แตกต่างกันตั้งแต่ 16 ถึง 38 อัลลีล ค่า heterozygosity อยู่ระหว่าง 0.464 ถึง 0.818 มีค่าความหลากหลายอยู่ระหว่าง 0.875 ถึง 0.955 และในแต่ละไพรเมอร์สามารถแยกความแตกต่าง (Discrimination Power) ระหว่าง 0.947 ถึง 0.987 พบว่า ถ้าใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ ร่วมกัน สามารถในการจำแนกพันธุ์ได้เท่ากับ 1.00 ซึ่งหมายความว่ามีโอกาสเพียง 2 ใน 100,000,000 ที่พันธุ์องุ่นทั้ง 2 พันธุ์ ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเกี่ยวข้องกัน จะไม่สามารถจำแนกได้โดยใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ นี้ได้

Sefc *et al*. (1999) ได้ทำการศึกษาและค้นหาลำดับเบส microsatellite ขององุ่น เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ขององุ่นต่างสกุล โดยทำการคัดเลือกลำดับเบส $(GA)_n$ ที่ซ้ำกันหลายๆ ครั้งจากห้องสมุดจีโนมิก (genomic library) ขององุ่น (*Vitis riparia*) พบว่า มีไพรเมอร์ 18 คู่ ที่สามารถระบุความแตกต่างขององุ่นต่างสกุล ที่มีความใกล้ชิดกัน (*V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. labrusca*, *V. cinerea*, *V. aestivalis*, *V. vinifera* และ องุ่นลูกผสมข้ามสายพันธุ์) ตลอดจนได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของไพร์เมอร์กับองุ่น *V. vinifera* จำนวน 120 สายพันธุ์ พบว่า แต่ละตำแหน่งหรือแต่ละคู่ของไพรเมอร์ให้อัลลีล (allele) ที่มีความแตกต่างกัน 4 ถึง 15 อัลลีล และได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมาย Microsatellite จำนวน 13 คู่ ที่มีความสามารถแยกความแตกต่างของพันธุกรรมองุ่นได้

Sefc *et al*. (2000) ได้คัดเลือกเครื่องหมาย Microsatellite จำนวน 9 คู่ (VVMD5, VVMD7,VVS2, ssrVrZAG21, ssrVrZAG47, ssrVrZAG62, ssrVrZAG64, ssrVrZAG79 และ ssrVrZAG83) สำหรับวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมขององุ่นและศึกษาความแตกต่างของพันธุ์องุ่นจากแหล่งปลูก 8 ประเทศ ในยุโรป ได้แก่ กรีซ, โครเอเชีย, ทางเหนืออิตาลี, ออสเตรีย, เยอรมนี, ฝรั่งเศส, สเปน และโปรตุเกส พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลนี้สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์องุ่นเหล่านี้ได้ดี ทั้งพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนกันหรือต่างกัน เช่น องุ่นพันธุ์ Blauburger, Blaufrankisch , Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Shiraz, Semillon, Tempranillo และ Akominato นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มพันธุ์องุ่นที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมจากสเปนและโปรตุเกสได้ ซึ่งไพร์เมอร์ชุดนี้ยังสามารใช้ในการจำแนกพันธุ์องุ่นในยุโรปได้อีกด้วย

This *et al*. (2004) ได้มีการพัฒนาชุดมาตรฐานของเครื่องหมาย microsatellite จำนวน 6 คู่ (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62, และ VrZAG79) ในการวิเคราะห์องุ่นจำนวน 46 สายพันธุ์ ซึ่งได้รวบรวมลักษณะที่มีความแตกต่างกันในห้องปฏิบัติการ และศึกษาความแตกต่างของพันธุ์องุ่นจากแหล่งปลูก 7 ประเทศ และบางสายพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนกันหรือต่างกัน เช่น ความแตกต่างของขนาดอัลลีล (alleles) และความแตกต่างระหว่างความถี่ของอัลลีล ซึ่งสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการอ้างอิงของอัลลีล พบว่า ใน 33 สายพันธุ์ ยังพบความแตกต่างของอัลลีล 13 ถึง 23 อัลลีล ที่ถูกคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย microsatellite ในการจำแนกและแยกความแตกต่างของพันธุ์องุ่นได้

Ghetea *et al*. (2010) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมขององุ่น เพื่อใช้ในการประเมินลักษณะทางพันธุ์กรรม การระบุสายพันธุ์ และแยกความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์องุ่นที่ถูกเก็บรวบรวมยืนไว้ใน National Institute for Biotechnologies in Horticulture จำนวน 9 พันธุ์ ได้แก่พันธุ์ Muscat Ottonel, Italian Riesling, Cabernet Sauvignon, Sauvignon, Tamaioasa Romaneasca, Negru Aromat, Feteasca Alba, Feteasca Regala, Feteasca Neagra ด้วยเครื่องหมาย microsatellite จำนวน 15 คู่ พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 15 คู่ สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมและสามารถแยกความแตกต่างของขนาดอัลลีล (alleles) ในองุ่นของโรมาเนียได้

Huang *et al*. (2010) ได้ศึกษายีนที่มีการแสดงออก (expressed sequence tags ESTs) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ชนิด SSR หรือ EST-SSR จากยีนขององุ่นที่ถูกรวบรวมไว้ในฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI) สามารถดาวน์โหลดข้อมูลทั้งหมดได้ จำนวน 215,609 ยีน พบว่า มีเพียงยีน จำนวน 6,447 ยีน และนำข้อมูล 6,447 ยีน ไปทำการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (clustering analysis) เหลือเพียง จำนวน 1,037 ยีน ที่สามารถนำไปออกแบบไพรเมอร์ SSR ได้ และสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 150 คู่ เพื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างของพันธุ์องุ่นได้

2.14 การใช้เครื่องหมาย Microsatellite ในการตรวจสอบสายพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์

เทคนิค Microsatellite สามารถใช้ในการจำแนกและระบุสายพันธุ์องุ่นในไวน์ได้ ซึ่งมีรายงานโดย Siret *et al*. (2000) ได้ใช้เครื่องหมาย Microsatellite จำนวน 4 คู่ (VVMD5, VVMD27, VVMD32 และ VVMD36) (Bowers *et al*., 1996, 1999) ในการวิเคราะห์ความหลากหลายในองุ่น (*Vitis vinifera*) เพื่อใช้การระบุสายพันธุ์องุ่นที่ใช้ผลิตไวน์ในเชิงการค้า จากการทดลองสกัดดีเอ็นเอในส่วนที่เหลือจากมัส (must) และไวน์ จากกระบวนการหมักองุ่นจำนวน 6 สายพันธุ์ (Chardonnay, Clairette Blanche, Grenache Noir, Merlot, Muscat blanc a petits grains และ Syrah) พบว่า สามารถวิเคราะห์และสกัดดีเอ็นเอจากกระบวนการหมักไวน์จากส่วนที่เหลือในกระบวนการหมักได้แต่ดีเอ็นเอที่สกัดได้ยังไม่เพียงพอและปริมาณความเข้มดีเอ็นที่ได้ยังไม่เหมาะสมสำหรับในการวิเคราะห์เพื่อระบุสายพันธุ์

Baleiras-Couto *et al*. (2006) ได้คัดเลือกและระบุสายพันธุ์องุ่น เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพขององุ่นที่ใช้ผลิตมัส (Must) และไวน์ จากองุ่นที่มีความแตกต่างกัน 5 พันธุ์ (Touriga Franca, Fernao Pires, Tinta Barroca, Tinto Cao และ Marselan) โดยใช้เครื่องหมาย microsatellite จำนวน 6 คู่ (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79 และ VVS2) (Bowers *et al*., 1996, 1999; Thomas and Scott *et al*., 1993; Thomas *et al*., 1993) และบนคลอโรพลาส จำนวน 2 คู่ (cpSSR3 และ cpSSR5)

(Weising and Gardner, 1999) ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automatic sequencer จากองุ่นที่ใช้ผลิตมัส พบว่า มีความหลากหลายของสายพันธุ์องุ่นที่ใช้ในการผลิตมัส แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่เป็นไปได้ระหว่างอัตราส่วนในการผสม และความหลากหลายของความถี่อัลลิล (alleles) ของส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตมัส อาจนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบแหล่งที่มา ควบคุมคุณภาพของไวน์ และตรวจสอบไวน์ปลอมปนได้

ในขณะที่ Savazzini *et al*. (2006) ได้พัฒนาเทคนิค real-time PCR (time polymerase chain reaction quantification) ในการตรวจสอบดีเอ็นเอองุ่นที่ใช้ผลิตไวน์ เพื่อใช้ในการยืนยันสายพันธุ์องุ่น ตรวจสอบแหล่งที่มา และพื้นที่ปลูก เพื่อใช้คัดเลือกพันธุ์องุ่นที่ใช้ผลิตไวน์ ด้วยไพรเมอร์ VvNCED2 และ ScRRS3 พบว่า ประสบความสำเร็จในการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากส่วนที่เหลือจากมัสและไวน์ นอกจากนี้ยังใช้เครื่องหมาย microsatellite จำนวน 6 คู่ (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG 62 และ VrZAG 79) (Thomas *et al*., 1993; Bowers *et al*., 1996, 1999; Thomas and Scott *et al*., 1993) มาใช้ในการตรวจสอบไวน์หลังกระบวนการหมักมาแล้ว 1 ปี พบว่า ยังสามารถตรวจสอบและระบุสายพันธุ์องุ่นที่ใช้ผลิตไวน์ได้ แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ดีเอ็นเอองุ่นที่ใช้ผลิตมัสและไวน์ ขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปฏิกิริยาด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค real-time PCR เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกพืช จุลินทรีย์ และใช้ในการตรวจสอบพืชที่มีการตัดต่อทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังใช้ตรวจสอบเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ยังคงเหลือของกระบวนการผลิตไวน์ได้

Harta *et al*. (2011) ได้ศึกษาและทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอองุ่นด้วยเครื่องหมาย Microsatellite จำนวน 4 คู่ (VVS2, VVMD27, VVMD5 และ VVMD7) เพื่อใช้ในการตรวจสอบไวน์ในเชิงการค้า และแยกความแตกต่างขององุ่นทำไวน์ในโรมาเนีย (Tamaioasa Romanesca, Galbena de Odobeşti, Feteasca Neagra Busuioaca de Bohotin) โดยวิเคราะห์ไวน์อายุ 12 เดือน และ 18 เดือน พบว่า เครื่องหมาย VVS2 และ VVMD7 สามารถตรวจสอบและจำแนกพันธุ์องุ่นหลังกระบวนการหมักไวน์ได้ นอกจากนี้จากการสกัดดีเอ็นเอ ยังพบว่าไวน์อายุ 12 เดือน คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ยังดีกว่าไวน์อายุ 18 เดือน และให้ผลเป็นที่น่าพอใจในการตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์องุ่นที่ใช้ผลิตไวน์

2.15 การใช้เครื่องหมาย Microsatellite ในคลอโรพลาสดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบสายพันธุ์องุ่น

นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบองุ่นโดยใช้เทคนิค Microsatellite ในการศึกษาบนคลอโรพลาส (chloroplast) ซึ่งมีรายงานโดย Arroyo-Garca *et al*. (2002) โดยใช้ไพรเมอร์ Microsatellite เพื่อศึกษาความ

หลากหลาย (polymorphisms) ในตัวอย่างองุ่น *Vitis vinifera*, *Vitis berlandieri*, *Vitis riparia* และ *Vitis rupestris* จากไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 10 คู่ พบว่า มีเพียงจำนวน 3 คู่ (cpSSR3, cpSSR5 และ cpSSR10) เท่านั้น ที่สามารถแยกความแตกต่างของจำนวนมอโนนิวคลีโอไทด์ (mononucleotide) ที่มีความหลากหลายภายในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) และลักษณะรูปแบบทางพันธุกรรม (haplotypes) ถูกแสดงออกในองุ่นพันธุ์ *V. vinifera* ที่ใช้ผลิตไวน์ในสเปนและกรีซได้

Imazio *et al*. (2006) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมขององุ่น โดยใช้เครื่องหมาย Microsatellite บนคลอโรพลาส จำนวน 8 คู่ ได้แก่ ccmp2, ccmp3, ccmp4, ccmp5, ccmp6, ccmp7, ccmp8 และ ccmp10 (Weising and Gardner., 1999) จากองุ่นแถบ Middle-East ถึง Western European ในกลุ่มตัวอย่าง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 สหรัฐอเมริกา, ยูเครน, รัสเซีย, อิหร่าน, เลบานอน กลุ่มที่ 2 โรเมเนีย, เชโกสโลวะเกีย, ฮังการี, ยูโกสลลาเวีย, บอสเนีย กลุ่มที่ 3 อิตาลี, กรีซ และ กลุ่มที่ 4 สเปน โปรตุเกส, ฝรั่งเศส พบว่า ในจำนวน 142 สายพันธุ์ ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมขององุ่นสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีการแลกเปลี่ยนสายพันธุ์องุ่นระหว่างแหล่งปลูกต่างๆ ในกลุ่ม Middle-East และ Western European

Doulaty *et al*. (2007) ได้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมขององุ่น ในยุโรปจำนวน 6 สายพันธุ์ และ องุ่นป่า (*Vitis labrusca*) จำนวน 63 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย Microsatellite บนคลอโรพลาส จำนวน 8 คู่ ได้แก่ ccmp2, ccmp3, ccmp4, ccmp5, ccmp6, ccmp7, ccmp8 และ ccmp10) (Weising and Gardner., 1999) พบว่า จากไพรเมอร์ทั้งหมด 8 คู่ มีเพียงไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ccmp3 และ ccmp10 ที่สามารถแยกความหลากหลายและจำแนกองุ่นสายพันธุ์ปลูกได้ นอกนี้ไพรเมอร์ ccmp3 ยังสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุ์กรรมขององุ่นป่าได้ดี

Dzhambazova *et al*. (2009) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมขององุ่น จากการเก็บรวบรวมองุ่นป่า จำนวน 51 สายพันธุ์ และองุ่นสายพันธุ์ปลูก จำนวน 19 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย Microsatellite จำนวน 7 คู่ ได้แก่ VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, ssrVrZAG21, ssrVrZAG62, ssrVrZAG79 (Thomas and Scott., 1993; Bowers *et al*., 1996; Bowers and Meredith., 1996; Sefc *et al*., 1999) และบนคลอโรพลาสต์ จำนวน 5 คู่ ได้แก่ ccmpSSR3, cpSSR5,cpSSR10, ccSSR5, ccSSR9 (Weising and Gardner, 1999; Chung *et al*., 2003) จากองุ่นป่าทั้งหมดจำนวน 51 สายพันธุ์ และองุ่นสายพันธุ์ปลูก จำนวน 19 พันธุ์ พบว่า มีเพียงองุ่นป่าจำนวน 6 สายพันธุ์ เท่านั้น ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากองุ่นสายพันธุ์ปลูกที่เก็บรวบรวมไว้ จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย Microsatellite ในการแบ่งกลุ่มและจำแนกความแตกต่างระหว่างองุ่นป่าและองุ่นสายพันธุ์ปลูก นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างองุ่นในบัลแกเรีย องุ่นยุโรป และเอเชียได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

(1) เครื่องพีซีอาร์ (PCR หรือ Thermal cycler) ของ APPLIED BIOSYSTEMS

(2) เครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ของ HERAEUS

(3) เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) ของ HERAEUS

(4) เครื่องเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) ของ LIFE TECHNOLOGIES

(5) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของ SHELLAB

(6) เครื่องวัดปริมาณ DNA และ RNA (Spectrophotometer) ของ PERKIN ELMER

(7) เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (Pipetman) ของ GILSON

(8) เครื่องผสม (Vortex mixer) ของ SCIENTIFIC INDUSTRIES

(9) ตู้ดูดควันพิษ (Frame Hood) ของ TRANE

(10) เครื่องชั่ง ของ SARTORIUS

(11) ชุดถ่ายภาพพร้อมเครื่องมือวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Gel Documentation) ของ BIO- RAD

(12) เครื่องหาลำดับสารพันธุกรรมแบบกึ่งอัตโนมัติ (DNA Sequencer) ABI 377

(13) ตู้เย็น -20^{O} องศาเซลเซียส ของ PUFFER HUBBARD

(14) ตู้เย็น 4^{O} องศาเซลเซียส ของ CHILLED

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

(1) ชุดสกัด DNA extraction kit (DNeasy Plant Mini Kit, Germany)

(2) Extraction Buffer [(CTAB: hexadecyltrimetyl ammonium bromide) 10 กรัม, NaCl 81.82 กรัม, 0.5 M EDTA pH 8.0 40 มิลลิลิตร, 1 M Tris-HCl pH 8.0 50 มิลลิลิตร)]

(3) Washing solution (NH4OAc 0.077 กรัม, Absolute ethanol 70 มิลลิลิตร)

(4) TE buffer (2 M Tris-HCl pH 8.0 500 ไมโคลิตร, 0.5 M EDTA pH 8.0 200 ไมโคลิตร)

(5) chloroform

(6) isoamyl alcohol

(7) 2-mercaptoethanol

(8) Ethidium bromide

(9) Isopropanol

(10) RNase A

(11) 3M NaOAc

(12) 70% Ethanol

(13) Agarose gel

(14) 10X TBE buffer (Tris base 108 กรัม, Boric acid 55 กรัม, EDTA 93 กรัม)

(15) เอนไซม์ดีเอ็นเอเทคโพลิเมอเรส (DNA *Taq* polymerase); Bioline, USA

(16) ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ (microsatellite) ที่ติดฉลากด้วยสีฟูออเรสเซนต์ แสดงในตารางที่ 4.1

(17) ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs); Bioline, USA

3.2 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นทำไวน์ที่ปลูกในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค Microsatellite primer

การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ

- การสกัดดีเอ็นเอและปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ
- การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง
- การวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอจากการทำ PCR

1.1 ตัวอย่างองุ่นทำไวน์ที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างพันธุ์องุ่นทำไวน์ที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์เอ็นเอ จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ไร่องุ่นหัวหินฮิลส์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ไร่องุ่นพีบี วัลเล่ย์ เขาใหญ่ไวน์เนอรี่ จังหวัดนครราชสีมา และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บตัวอย่างใบองุ่นที่มีลักษณะใบกึ่งอ่อนกึ่งแก่ ที่อยู่รองจากยอด 3-4 ใบ เก็บใส่ถุงพลาสติกใส่กล่องที่มีน้ำแข็ง เพื่อใช้ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ รายชื่อพันธุ์องุ่นทำไวน์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 รายชื่อพันธุ์องุ่นทำไวน์ที่ใช้ในการทดลองและสถานที่เก็บรวบรวม

พันธุ์องุ่น	แหล่ง/สถานที่เก็บ
1. Shiraz	ไร่องุ่นพีบี วัลเล่ย์ เขาใหญ่ไวน์เนอรี่ จังหวัดนครราชสีมา
2. Shiraz 174	ไร่องุ่นหัวหินฮิลล์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
3. Shiraz	ไร่องุ่นหัวหินฮิลล์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
4. Cabernet Sauvignon	ไร่องุ่นพีบี วัลเล่ย์ เขาใหญ่ไวน์เนอรี่ จังหวัดนครราชสีมา
5. Cabernet Sauvignon	ไร่องุ่นหัวหินฮิลล์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
6. Chenin Blanc	ไร่องุ่นพีบี วัลเล่ย์ เขาใหญ่ไวน์เนอรี่ จังหวัดนครราชสีมา
7. Chenin Blanc 220	ไร่องุ่นหัวหินฮิลล์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
8. Chenin Blanc 880	ไร่องุ่นหัวหินฮิลล์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
9. Colombard	ไร่องุ่นพีบี วัลเล่ย์ เขาใหญ่ไวน์เนอรี่ จังหวัดนครราชสีมา
10. Colombard 607B	ไร่องุ่นหัวหินฮิลล์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
11. Colombard 607	ไร่องุ่นหัวหินฮิลล์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
12. Colombard 625	ไร่องุ่นหัวหินฮิลล์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
13. Tempranillo	ไร่องุ่นพีบี วัลเล่ย์ เขาใหญ่ไวน์เนอรี่ จังหวัดนครราชสีมา
14. Tempranillo 776	ไร่องุ่นหัวหินฮิลล์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
15. Tempranillo RJ51	ไร่องุ่นหัวหินฮิลล์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
16. Chardonay	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
17. Riesling	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
18. Guetramimer	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
19. Zintandel	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
20. Niagara	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
21. Carbernet Franc	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
22. Rubired	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
23. Babera	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
24. Macabau Blanc	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
25. Faustino	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
26. Delaware	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
27. Merlot	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
2.8 Pinot Noir	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
29. Marechal Foch	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อน

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Agrawal *et al.* (1992) โดยนำตัวอย่างใบอ่อน 0.1 กรัม ใส่ในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้เป็นผงละเอียดเติม Extraction Buffer [(เตรียม 500 มิลลิลิตร: CTAB (hexadecyltrimetyl ammonium bromide) 10 กรัม, NaCl 81.82 กรัม, 0.5 M EDTA pH 8.0 40 มิลลิลิตร, 1 M Tris-HCl pH 8.0 50 มิลลิลิตร)] จำนวน 700 ไมโครลิตร แล้วเติม 2-mercaptoethanol จำนวน 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทส่วนผสมใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผสมตัวอย่างในหลอดโดยการกลับหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเติม chloroform:iso-amyl alcohol อัตรา 24:1 จำนวน 700 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในหลอดให้เข้ากันโดยวิธีกลับหลอดไปมา 5-10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน จำนวน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม 3 M sodium acetate จำนวน 50 ไมโครลิตร และ Isopropanol จำนวน 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปแช่ในตู้ลบ -20 องศาเซลเซียส หรือน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ค่อยๆ เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย Washing solution (เตรียม 100 มิลลิลิตร: NH_4OAc 0.077 กรัม, Absolute ethanol 70 มิลลิลิตร) จำนวน 300 ไมโครลิตร โดยการกลับหลอดเบาๆ นาน 2-3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอธิลแอลกอฮอล์ จำนวน 500 ไมโครลิตร จำนวน 1 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกำจัด RNA และละลายตะกอนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย TE buffer (เตรียม 100 มิลลิลิตร: 2 M Tris-HCl pH 8.0 500 ไมโครลิตร, 0.5 M EDTA pH 8.0 200 ไมโครลิตร) จำนวน 100 ไมโครลิตร และ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

1.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ

การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer อาศัยหลักการที่เบสเป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร ส่วนโปรตีนจะดูดกลื่นแสงได้ดีที่สุดที่ประมาณ 280 นาโนเมตร และสารละลายดีเอ็นเอที่เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (A_{260} หรือ OD_{260}) เท่ากับ 1 (สุรินทร์, 2540) ขั้นตอนของวิธีการวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอมีต่อไปนี้

(1) ผสมสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการหาความเข้มข้น จำนวน 2 ไมโครลิตร กับ TE buffer จำนวน 198 ไมโครลิตร (dilution factor = 200) แล้วใส่ลงใน cuvette จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) (A_{260} และ A_{280}) โดยใช้ TE buffer เป็น blank

(2) คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ดังนี้

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ = A_{260} x 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x dilution factor

(หมายเหตุ: A_{260} มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

(3) ความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอ สามารถคำนวณได้จาก ค่าสัดส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรมีค่า A_{260} / A_{280} อยู่ในช่วงระหว่าง 1.85-2.00 ในกรณีที่ต่ำกว่า 1.85 แสดงว่าดีเอ็นเอนั้นไม่บริสุทธิ์ มีสารที่ใช้ในกระบวนการสกัดปนเปื้อนอยู่ และในกรณีที่มีค่ามากกว่า 2.00 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอ (RNA) หรือโปรตีนปนเปื้อนอยู่

การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะแทรกเข้าไปอยู่ในเกลียวคู่ของสายดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตก็จะเกิดการเรืองแสงขึ้น ขั้นตอนการตรวจมีดังนี้

(1) เตรียมอะกาโรส 1.0% โดยชั่งผงอะกาโรส 1.0 กรัม ใส่ลงใน 1X TBE buffer (เตรียม 1.000 มิลลิลิตร: Tris-base 108 กรัม, Boric acid 55 กรัม, M EDTA 93 กรัม) จำนวน 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อละลายผงอะกาโรส

(2) ตั้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในถาด (electrophoresis tray) ให้เจลหนา 3-4 มิลลิเมตร จากนั้นที่เสียบหวีลงไปให้ตรงตำแหน่งเพื่อทำให้มีช่องเล็ก ๆ สำหรับหยอดตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอ

(3) ปล่อยให้เจลเย็นลงและแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 45 นาที เท 1X TBE buffer ให้ท่วม แล้วดึงหวีออกอย่างระมัดระวัง ไม่ให้หลุมที่เกิดจากการดึงหวีออกฉีกขาด

(4) นำถาดที่มีแผ่นเจลใส่ลงไปในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่มีสารละลาย 1X TBE buffer อยู่ โดยให้วางด้านที่มีหลุมอยู่ทางด้านขั้วลบ

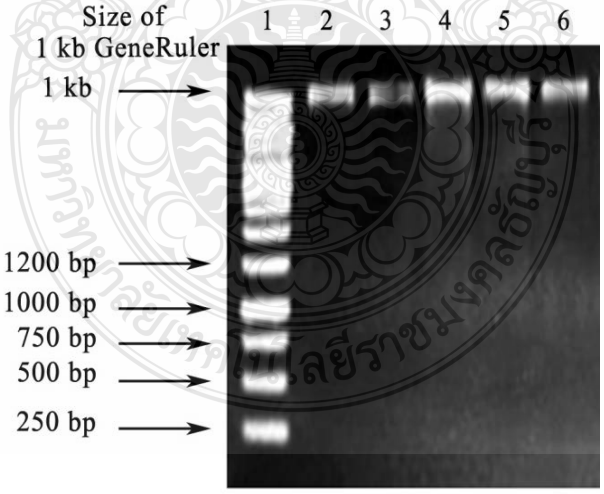
(5) ผสมดีเอ็นเอกับสี (loading dye) โดยใช้ดีเอ็นเอ จำนวน 2 ไมโครลิตร และสี จำนวน 2 ไมโครลิตร แล้วหยอดสารละลายดีเอ็นเอกับสีลงในหลุมของเจลที่เตรียมไว้ โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA marker ชนิด 1 kb เป็นดีเอ็นเอเปรียบเทียบใส่ในหลุมแรก

(6) ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิลแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้มีแรงไฟฟ้า 100 โวลต์ ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนไปพอประมาณ โดยดูจากสีที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจล หรือหลังจากเริ่มต้นต่อกระแสไฟฟ้าเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงปิดเครื่อง

(7) นำแผ่นเจลไปย้อมสีในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 10 นาที แล้วนำแผ่นเจลออกจากสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ นำไปแช่ในถาดที่มีน้ำไหลประมาณ 10 นาที เพื่อล้างเอธิเดียมโบรไมด์ที่ค้างอยู่บนแผ่นเจล

(8) นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้เครื่อง Gel Documentation บันทึกภาพของแผ่นเจล เพื่อใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพและตรวจสอบปริมาณของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ และการแตกหักของดีเอ็นเอจากลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้

จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยการเจือจางด้วย TE ให้ทุกตัวอย่างมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วเก็บใส่ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาสภาพของดีเอ็นเอสำหรับใช้ศึกษาต่อไป



ภาพที่ 3.1 แสดงจีโนมิกดีเอ็นเอของตัวอย่างพันธุ์องุ่น 5 พันธุ์ที่สกัดได้ (แถวที่ 2-6) และ (1) Molecular weight maker (1kb Gene Ruler) (2) พันธุ์ Shiraz (3) พันธุ์ Cabernet Sauvignon (4) พันธุ์ Chenin Blanc (5) พันธุ์ Colombard (6) พันธุ์ Tempranillo

1.4 การคัดเลือก Microsatellite primer ที่เหมาะสมสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอองุ่นทำไวน์

(1) การเพิ่มประมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR) โดยใช้ microsatellite primer

นำ microsatellite primer จำนวน 35 คู่ ไปทดลองกับตัวแทนองุ่นทำไวน์ที่สุ่มคัดเลือกไว้ จำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ Shiraz, Cabernet Sauvignon, Chenin Blanc, Tempranillo และ Colombard ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ส่วนที่ต้องการในหลอดทดลอง โดยมีองค์ประกอบและสภาวะการทำปฏิกิริยามีดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร, 100mM dNTPs (Bioline, USA) จำนวน 2 ไมโครลิตร, 5 unit/μl เอนไซม์ DNA polymerase (IMMOLASETM DNA Polymerase; Bioline, USA) จำนวน 0.2 ไมโครลิตร, 10X ImmoBuffer จำนวน 2 ไมโครลิตร, 50mM $MgCl_2$ จำนวน 0.8 ไมโครลิตร และ 10 μM ไพรเมอร์ forward และ reverse อย่างละ 1 ไมโครลิตร ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ด้วย deionized H_2O ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ในกรณีนี้ Forward primer ที่ใส่ในปฏิกิริยาติดฉลากด้วยสีฟูออเรสเซนต์ที่ปลาย 5' แล้วนำไปเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรม PCR ให้ทำงานดังนี้ initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 7 นาที จำนวน 1 รอบ, ช่วง denaturation 95 องศาเซลเซียส 40 วินาที, annealing 55 องศาเซลเซียส 40 วินาที, extention 72 องศาเซลเซียส 40 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที จำนวน 1 รอบ ดังแสดงในตารางที่ 3.3

(2) การวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากผลผลิต PCR

การเตรียมกระจกสำหรับเครื่องอ่านลำดับสารพันธุกรรมแบบกึ่งอัตโนมัติ (ABI Prism™ 377 DNA Sequencer) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ ทำการล้างกระจกขนาด 36 X 48 เซนติเมตร ด้วยน้ำเปล่าให้ทั่วทั้งแผ่นให้สะอาดตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำกระจกมาประกอบเข้ากับชุดอุปกรณ์ Cassette โดยใช้ spacer หนา 0.2 มิลลิเมตร อยู่ระหว่างขอบของกระจก 2 แผ่น แล้วเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง Urea มา 10.8 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น จำนวน 13.91 มิลลิลิตร เติม 29:1 Polyacrylamide gel จำนวน 3 มิลลิลิตร, 10X TBE จำนวน 3 มิลลิลิตร และ 10% APS (Ammonium persulphate) จำนวน 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติม TEMED จำนวน 18 ไมโครลิตร จากนั้นนำกระบอกฉีดยาฉีดเจลจากด้านล่างกระจก พร้อมเคาะกระจกไล่ฟองอากาศที่อาจมีขึ้น แล้วใส่หวีเข้าที่ด้านบนของกระจก จากนั้นปล่อยเจลให้แข็งตัวไม่น้อยกว่า

2 ชั่วโมง แล้วประกอบกระจกที่เตรียมเจลเรียบร้อยแล้วเข้ากับเครื่อง ABI Prism™ 377 DNA Sequencer เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับโหลดตัวอย่างในการวิเคราะห์

(3) การเตรียมหลอดตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI Prism™ 377 DNA Sequencer แต่ละหลอดใส่

- Hidi formamide	1.35	ไมโครลิตร
- Loading buffer	0.5	ไมโครลิตร
- DNA size standard GS-500 (ROX)	0.15	ไมโครลิตร
- PCR Product	1	ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วแช่ลงในน้ำแข็งทันที เพื่อเตรียมไว้สำหรับนำเข้าเครื่องอ่านลำดับสารพันธุกรรมแบบกึ่งอัตโนมัติ ABI Prism™ 377 DNA Sequencer แล้วโหลด (load) ตัวอย่าง เครื่องจะทำงานตามโปรมแกรมที่ตั้งค่าไว้ เครื่องจะวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอได้จากผลผลิต PCR โดยวิธี electrophoresis โดยใช้โปรแกรม Genescan เทียบกับค่าดีเอ็นเอขนาดมาตรฐานโดยใช้ DNA size standard และวิเคราะห์ขนาดของลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Genotyper ซึ่งทุกขั้นตอนเครื่องจะทำงานโดยอัตโนมัติ (หทัยรัตน์ และณัฐหทัย, 2548)

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นและปริมาณสารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง เพื่อคัดเลือก Microsatellite primer

Reagents	Final concentration	Volume/µl
DNA template (40ng/µl)	4ng/µl	2
10X PCR buffer	1 X	2
100mM dNTPs	10 mM	2
50mM $MgCl_2$	4 mM	0.8
10mM Forward primer label with fluorescent	0.5 µl	1
10mM Reverse primer	0.5 µl	1
5 Unit/ml *Tag* DNA polymerase	0.05 u/µl	0.2
ddH_2O		11
Total		20 µl

ตารางที่ 3.3 ขั้นตอนการตั้งโปรแกรมทำปฏิกิริยา PCR ด้วย Microsatellite primer

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (^{0}C)	เวลา	นาที
Pre denaturation	95	7	1 รอบ
Denaturation	95	40	40 รอบ
Annealing	55	40	
Extention	72	40	
Final Extention	72	7	1 รอบ
Holding	4	α	

1.5 หลักการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเออองุ่น

ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอหรืออัลลีล ในกรณีที่เห็นเป็นกราฟชัดเจนและสามารถแยกความแตกต่าง (Polymorphic) ของดีเอ็นเออองุ่นแต่ละพันธุ์ได้ ส่วนไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจนหรือให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกันทุกพันธุ์ (monomorphic) จะถูกคัดทิ้ง ภาคละเอียดของ microsatellite primer ที่ได้นำมาศึกษาคัดเลือกทั้งหมด 35 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

1.6 การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นทำไวน์ด้วยไพรเมอร์ Microsatellite primer

นำดีเอ็นเอขององุ่นจำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ ที่ปรับความเข้มข้นให้ได้ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำ microsatellite primer ที่คัดเลือกไว้ ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์ขนาดของผลิตผลจาก PCR ด้วยเครื่อง ABI Prism™ 377 DNA Sequencer เช่นเดียวกับการดำเนินงานขั้นต้นการคัดเลือก microsatellite primer

การบันทึกข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรืออัลลีล (alleles) มีหน่วยเป็นคู่เบส (base pair) ที่ได้จากการแยกขนาดด้วยเครื่อง ABI Prism™ 377 DNA Sequencer โดยที่ microsatellite primer แต่ละคู่จะให้แถบดีเอ็นเอกับพันธุ์องุ่นเพียง 2 แถบ หรือ 2 อัลลีล ถ้าอัลลีลทั้งสองมีขนาดเท่ากันจะเรียกเป็น homozygous หากอัลลีลทั้งสองมีขนาดความยาวต่างกันจะพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ หรือ 2 peak เรียกตำแหน่งว่าเป็น heterozygous

การวิเคราะห์ข้อมูลนำค่าอัลลีลบันทึกลงในตาราง alleles ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏจะใช้เฉพาะแถบที่เป็น Polymorphic คือ เป็นแถบที่มีความแตกต่างกันขององุ่นแต่ละพันธุ์ที่ศึกษา โดยพันธุ์ใดมีแถบหรือปรากฏแถบดีเอ็นเอ (Present) ให้เป็น 1 พันธุ์ใดไม่มีแถบ (Absent) ให้เป็น 0 สำหรับแถบดีเอ็นเอที่พบในทุกพันธุ์ที่ไม่มีความแตกต่างกัน จะไม่มีการนำมาวิเคราะห์ระยะหางทางพันธุกรรม จากนั้นนำค่าดัชนีความเหมือนที่ได้ไปจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยใช้โปรแกรม UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmatic Average) และสร้าง Dendrogram ที่แสดงความสัมพันธ์ขององุ่นทำไวน์ที่ทำการศึกษาแต่ละพันธุ์

การทดลองที่ 2 ศึกษาเปรียบเทียบพันธุกรรมขององุ่นทำไวน์ที่นิยมปลูกในประเทศไทยกับต่างประเทศ

ในการทดลองต้องการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นที่นิยมนำมาทำไวน์ จำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Shiraz, Cabernet Sauvignon, Chenin Blanc, Tempranillo และ Colombard โดยใช้ microsatellite primer เพื่อเป็นการยืนยันสายพันธุ์องุ่นทำไวน์ 5 พันธุ์ ดังกล่าวข้างต้น

ที่มีชื่อเดียวกัน ที่ปลูกในประเทศไทยกับต่างประเทศ ว่ามีพันธุกรรมเหมือนกันหรือไม่ ในการดำเนินการมีขั้นดังต่อไปนี้

2.1 สืบค้นข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นพันธุ์ ดังกล่าวมาข้างต้นที่ใช้วิธี microsatellite primer จากฐานข้อมูลต่างประเทศหรือเอกสารวิชาการต่างๆ บันทึกแถบหรือรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ขององุ่นทั้ง 5 พันธุ์ จากฐานข้อมูลของต่างประเทศ ในรูปแบบของความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือเรียกว่า อัลลีล (alleles) มีหน่วยเป็นคู่เบส (bp)

2.2 นำอัลลีลขององุ่นทั้ง 5 พันธุ์ ที่ได้จากต่างประเทศ ในข้อ 2.1 เปรียบเทียบกับอัลลีลขององุ่นซึ่งมีชื่อเดียวกัน ที่ปลูกในประเทศไทยจาก 2 แหล่งปลูก คือ ไร่องุ่นหัวหินฮิลส์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และไร่องุ่นพีบี วัลเล่ย์ เขาใหญ่ไวน์เนอรี่ จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งได้ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธีการเดียวกันจากการทดลองนี้ กรณีที่องุ่นที่มีชื่อเดียวกันที่มาจากต่างสถานที่หาก พบว่า มี microsatellite primer เพียง 1 ตำแหน่ง ที่ให้อัลลีลต่างกันจะถือว่ามีพันธุกรรมต่างกัน

การทดลองที่ 3 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุพันธุ์องุ่นในน้ำไวน์

การสกัดดีเอ็นเอองุ่นจากน้ำไวน์ เพื่อนำมาตรวจสอบวิเคราะห์เป็นขั้นตอนสำคัญ เพราะในน้ำไวน์มีดีเอ็นเอปริมาณน้อย ตลอดจนมีการเสียหายหรือแตกหักของดีเอ็นเอจากกระบวนการผลิต อาทิเช่น การหมัก การบ่ม การกรอง เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้จะแบ่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอในน้ำไวน์ออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ (1) การตกตะกอนไวน์ (2) การสกัดดีเอ็นเอ สำหรับขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอได้ทำการทดสอบ 2 วิธี คือ วิธีแรกเป็นการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNA extraction kit (Qiagen, Germany) และ วิธีที่สอง เป็นการสกัด ดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB เพื่อเปรียบเทียบ

3.1 การสกัดดีเอ็นเอขององุ่นจากน้ำไวน์

(1) การตกตะกอนน้ำไวน์ เตรียมตัวอย่างไวน์ปริมาณ 60 มิลลิลิตร แล้วทำการตกตะกอนไวน์ด้วยวิธีดัดแปลงจาก Savazzini *et al.* (2006) โดยการเติม 2-propanal ปริมาณ 36 มิลลิลิตร หรือ 0.6 เท่า ของปริมาณไวน์ ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ค่อยๆ เทน้ำใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ปล่อยให้แห้งเก็บตะกอนที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอขั้นตอนต่อไป

(2) การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNA extraction kit ประกอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ AP1, สารละลายบัฟเฟอร์ AP2, สารละลายบัฟเฟอร์ AP3/E, สารละลายบัฟเฟอร์ AW, สารละลายบัฟเฟอร์ AE, QIAshredder Mini spin column และ Dneasy Mini spin column โดยมี

ขั้นตอนวิธีการสกัดดังนี้ นำตะกอนที่ตกไว้ (ขั้นตอนที่ 1) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP1 จำนวน 400 ไมโครลิตร และ RNase A จำนวน 4 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการกลับหลอดไปมาทุก 2-3 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP2 จำนวน 130 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็ง นาน 5 นาที แล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำใสใส่ในหลอด QIAshredder Mini spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บน้ำใส จากนั้นใส่สารละลายบัฟเฟอร์ AP3/E ปริมาณ 1.5 เท่าของน้ำใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน ดูดน้ำใส จำนวน 650 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด DNeasy Mini spin column ที่ประกอบไว้กับหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งน้ำใสที่ผ่าน Column ออกมา (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นประกอบ DNeasy Mini spin column ใส่หลอดใหม่ขนาน 2 มิลลิลิตร ล้างตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ AW จำนวน 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งน้ำใส แล้วล้างตะกอนอีกครั้งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ AW จำนวน 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งน้ำใส ประกอบ spin column ใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย บัฟเฟอร์ AE จำนวน 50 ไมโครลิตรแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นต่อไป

(3) การสกัดดีเอ็นเอแบบวิธี CTAB นำตะกอนของน้ำไวน์ที่เตรียมไว้ (ขั้นตอนที่ 1) มาทำการสกัดดีเอ็นเออุ่นในน้ำไวน์ด้วยวิธีดัดแปลงจาก Savazzini *et al*. (2006) เติมสารละลาย Extraction Buffer [(เตรียม 500 มิลลิลิตร: CTAB (hexadecyltrimetyl ammonium bromide) 10 กรัม, 5 M NaCl 140 มิลลิลิตร, 0.5 M EDTA pH 8.0 40 มิลลิลิตร, 1 M Tris-HCl pH 8.0 50 มิลลิลิตร)] จำนวน 700 ไมโครลิตร แล้วเติม 2-mercaptoethanol จำนวน 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทส่วนผสมใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยการกลับหลอดไปมาทุก ๆ 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเติม chloroform:iso-amyl alcohol อัตรา 24:1 จำนวน 700 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในหลอดให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาประมาณ 5-10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน จำนวน 500 ไมโครลิตร เติม 3 M sodium acetate จำนวน 50 ไมโครลิตร และ Isopropanol จำนวน 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปแช่ในตู้ลบ -20 องศาเซลเซียส หรือแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ค่อยๆ เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย

Washing solution (เตรียม 100 มิลลิลิตร: NH4OAc 0.077 กรัม, Absolute ethanol 70 มิลลิลิตร) จำนวน 300 ไมโครลิตร โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ เป็นเวลา 2-3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอธิลแอลกอฮอล์ จำนวน 500 ไมโครลิตร จำนวน 1 ครั้ง นำไปปั่นเหวียงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกำจัด RNA และละลายตะกอนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย TE buffer (เตรียม 100 มิลลิลิตร: 2 M Tris-HCl pH 8.0 500 ไมโคลิตร, 0.5 M EDTA pH 8.0 200 ไมโครลิตร) จำนวน 100 ไมโครลิตร และ RNase A เข้มข้น10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากน้ำไวน์

ก่อนทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิค microsatellite ทำการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ว่ามีดีเอ็นเอเพียงพอและมีสารยับยั้งการทำปฏิกิริยา PCR หรือไม่ โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้ไพรเมอร์บริเวณ ribosomal DNA ในช่อง 18S rDNA ของสิ่งมีชีวิต คือ NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) Forward primer และ NS4 (CTTCCGTCAATTCCTTTAAG) Reverse primer (Kuzoff *et al*., 1998) โดยมีปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบเข้มข้น 60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 3 ไมโครลิตร, 100mM dNTPs (Bioline, USA) จำนวน 2 ไมโครลิตร, 5 unit/µl เอนไซม์ DNA polymerase (IMMOLASETM DNA Polymerase; Bioline, USA) จำนวน 0.2 ไมโครลิตร, 10X ImmoBuffer จำนวน 2 ไมโครลิตร, 50mM $MgCl_2$ จำนวน 0.8 ไมโครลิตร และ 10mM NS1 Forward และ NS4 Reverse อย่างละ 1 ไมโครลิตร ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ด้วย deionized H_2O แล้วนำไปเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรม PCR ให้ทำงานดังนี้ Pre denaturation 95 องศาเซลเซียส 7 นาที จำนวน 1 รอบ, ช่วง denaturation 95 องศาเซลเซียส 40 วินาที, annealing 55 องศาเซลเซียส 40 วินาที, extention 72 องศาเซลเซียส 40 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที จำนวน 1 รอบ ตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR ด้วยไพรเมอร์ 18S เท่านั้นที่จะนำไปวิเคราะห์พันธุ์องุ่นน้ำไวน์ต่อไป

ในการทดลองนี้ใช้ไวน์แดงยี่ห้อ Monsoon Valley ที่ใช้องุ่นพันธุ์ Shiraz ในการผลิตทำการทดลอง 9 ตัวอย่าง ตั้งแต่ขั้นตอนการตกตะกอนไวน์ การสกัดดีเอ็นเอ ทั้งสองวิธีการทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไวน์โดยการใช้ไพรเมอร์ 18S rDNA

การทดลองที่ 4 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นที่ระบุในฉลากไวน์

การทดลองต้องการวิเคราะห์ดีเอ็นเอองุ่นในไวน์ที่ระบุในฉลาก โดยใช้ microsatellite primer เพื่อตรวจสอบและระบุพันธุ์องุ่นในน้ำไวน์ ดังกล่าวว่าเหมือนกับที่ระบุในฉลากหรือไม่ ในการดำเนินการมีขั้นดังต่อไปนี้

4.1 ตัวอย่างไวน์ทำการซื้อไวน์จากท้องตลาด จำนวน 9 ขวด และได้รับความอนุเคราะห์ไวน์จากบริษัท สยาม ไวเนอรี่ จำกัด จำนวน 2 ขวด และบริษัท กราน-มอนเต้ จำกัด จำนวน 1 ขวด รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงตัวอย่างไวน์พันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ ชนิดของไวน์ และปีที่ผลิตไวน์ที่ใช้ในการศึกษาทดลองดังนี้

พันธุ์องุ่น	ชนิดไวน์	ยี่ห้อไวน์	ปีไวน์
1. Shiraz	ไวน์แดง	Monsoon Valley	2013(2556)
2. Shiraz	ไวน์แดง	Vineyards	2013(2556)
3. Shiraz	ไวน์แดง	Taras	2013(2556)
4. Cabernet Sauvignon	ไวน์แดง	Vineyards	2013(2556)
5. Cabernet Sauvignon	ไวน์แดง	Hardys	2013(2556)
6. Shiraz Cabernet Sauvignon	ไวน์แดง	Hardys	2013(2556)
7. Chenin Blanc	ไวน์ขาว	Monsoon Valley	2013(2556)
8. Chenin Blanc	ไวน์ขาว	Spring	2013(2556)
9. Colombard	ไวน์ขาว	Vineyards	2013(2556)

4.2 นำไวน์แต่ละขวด จำนวน 60 มิลลิลิตร มาทำการตกตะกอน และสกัดดีเอ็นเอตามข้อ 3.1 โดยใช้ microsatellite primer จำนวน 6 คู่ ได้แก่ VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 และ VrZAG79 ลำดับเบสแสดงในตารางที่ 4.1 (Thomas *et al*., 1993; Bowers *et al*., 1996,1999; Sefc *et al*., 1999) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมขององุ่นได้ดี ทั้งพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนกันหรือต่างกัน (Sefc *et al*., 2000) มาใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอขององุ่นในน้ำไวน์ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธีตามข้อ 3.1 ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอด

ทดลองใช้ไพรเมอร์ ดังกล่าวมาข้างต้นที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนที่ปลาย 5’ โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเข้มข้น จำนวน 3 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบและสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR และวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากผลผลิต PCR ตามข้อ 1.4

4.3 ทำการบันทึกแถบหรือรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของอุ่นในน้ำไวน์ทั้ง 9 ตัวอย่าง ในรูปแบบของความยาวอัลลีล กรณีที่อุ่นมีชื่อเดียวกันที่ระบุในฉลากข้างขวดไวน์หา พบว่ามี microsatellite primer เพียง 1 ตำแหน่ง ที่ให้อัลลีลต่างกันจะถือว่ามีพันธุกรรมต่างกัน

3.3 สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย

3.3.1 สถานที่ทำการวิจัย

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

3.3.2 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัย เดือนมิถุนายน 2555 ถึง เดือนมีนาคม 2557

บทที่ 4
ผลการทดลองและการวิจารณ์

4.1 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นทำไวน์ที่ปลูกในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค Microsatellite primer

4.1.1 การสกัดแยกดีเอ็นเอจากใบองุ่น

สกัดดีเอ็นเอจากใบองุ่น จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรฟอรีซิสในเจลอะกาโรสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้ส่วนใหญ่จะมีค่าอัตราส่วนระหว่าง 260 ต่อ 280 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 1.85-2.00 ซึ่งถือว่าเป็นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ สำหรับการตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอโดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังภาพที่ 3.1

4.1.2 การคัดเลือก Microsatellite primer ที่เหมาะสมสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอองุ่นทำไวน์

จากการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite primer สำหรับการจำแนกและการวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุ์องุ่นทำการสุ่มเลือกองุ่นทำไวน์ 5 ตัวอย่างพันธุ์ จากประชากรขององุ่นทำไวน์ทั้งหมด 29 ตัวอย่างพันธุ์ มาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการใช้ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นทำไวน์ พบว่า มีไพรเมอร์ที่ให้แถบคมชัด และให้แถบที่มีความแตกต่าง (Polymorphic band) ในแต่ละพันธุ์อย่างชัดเจนในกลุ่มต่างๆ จึงทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ดีที่สุดไว้ 18 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ได้แก่ FAM 02, FAM32, FAM 44, FAM 46, FAM 57, FAM 59, FAM 60, FAM 75, FAM 79, FAM 126, FAM 129, FAM 138 (Huang *et al*., 2010) VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VRZAG62 และ VRZAG79 (Thomas and Scott, 1993; Bowers *et al*., 1996; Sefc *et al*., 1999) เกณฑ์การคัดเลือกโดยดูจากจำนวนอัลลีล (alleles) หรือแถบดีเอ็นเอที่พบมากและให้แถบชัดเจนในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดย พบว่า microsatellite primer ชนิดซ้ำกันชนิด 2 เบส (dinuclcetide repeat) จำนวน 11 ไพรเมอร์ เป็นเบสซ้ำ 3 เบส (trinucleotide repeat) 6 ไพรเมอร์ และที่เหลือเป็นชนิดเบสซ้ำ 5 เบส (pentanucleotide repeat) ได้แก่ ไพรเมอร์ FAM46 กับ FAM129

ตารางที่ 4.1 แสดงชื่อลำดับเบสจาก Microsatellite primer ที่ใช้คัดเลือกสำหรับการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเออุ่นทำไวน์ จำนวน 35 คู่ รวมทั้งชนิดของลำดับเบส ขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์แต่ละคู่

ชื่อ microsatellite primer	จำนวนของลำดับเบสซ้ำ	sequences of primer 5'⟶3'forward	5'⟶3'-reverse	annealing temperatures (°C)
VVS2	$(GA)_{22}$	F-CAGCCCGTAAATGTATCCATC	R-AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG	54
VVMD5	$(CT)_3AT(CT)_{11}ATAG(AT)_3$	F-CTAGAGCTACGCCAATCCAA	R-TATACCAAAAATCATATTCCTAAA	56
VVMD7	$(CT)_{14.5}$	F-AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	R-CGAACCTTCACACGCTTGAT	54
VVMD27	$(CT)_x$	F-GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	R-ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	54
VrZAG62	$(GA)_{19}$	F-GGTGAAATGGGCACCGAACACCACGC	R-CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	54
VrZAG79	$(GA)_{19}$	F-AGATTGTGGAGGAGGGAACCAAACCG	R-TGCCCCCATTTTCAAACTCCCTTCC	54
FAM02	$(TC)_{10}$	F-GCCTTGGACCGAACTATC	R-CTAAGAAACACCATTCATCAG	56
FAM04	$(CT)_{10}$	F-GTGACTTACAATCCTTCCAAA	R-AGGGAGAGAGAGAGAGAGAGA	58
FAM10	$(AAT)_{13}$	F-TGAAGCACTGATGCTTATTG	R-ACAATGTCACACACAAGGTG	56
FAM13	$(CAG)_6$	F-CTCTTCAGGAAACACTGGAG	R-CCTGGAGTTCCTGGTAGATT	60
FAM14	$(CTT)_8$	F-AGACCACCATGGATCACTT	R-CTTGATATTCTTAATGGGCG	56
FAM18	$(AGA)_7$	F-AGAGAGCAAAGGAACATGAA	R-ACAAACCCTAACCCTAGCTC	56
FAM32	$(CAC)_7$	F-AAACTGGACTCCACTGTCTG	R-GTGGAGATGGCACTAATAGC	60
FAM35	$(CAG)_7$	F-CACTCTCCAACTCCAGATGT	R-ATGTTTCCCATATTCACAGC	60
FAM41	$(AGC)_6$	F-CAGAAGTTGAGAAGTCAGGG	R-ACTTTGGCATTCCTAACTGA	68
FAM44	$(AAG)_6$	F-GAGGAGGTGGAAGGAGAA	R-TTTGATAAGGTTGATGGTCC	52
FAM46	$(AAAGG)_4$	F-TAACCTCACATCACATCCCT	R-TATTAGGGTCTGCTGCAAAT	56
FAM50	$(AG)_{14}$	F-CACAAAGCATGTCCATAAAC	R-GGCTTATGCATTACTGGACT	56
FAM57	$(CT)_{16}$	F-CCATCTACCATCACCTTTGT	R-GGAGAAGTGGTATTTGGTGA	58
FAM59	$(GCA)_7$	F-GATGGTATACGACGGAGAAA	R-AGAGTACGACCCTTCGATCT	58

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงชื่อลำดับเบสจาก Microsatellite primer ที่ใช้คัดเลือกสำหรับการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเออุ่นทำไวน์ จำนวน 35 คู่ รวมทั้งชนิดของลำดับเบส ขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์แต่ละคู่

ชื่อ microsatellite primer	จำนวนของลำดับเบสซ้ำ	sequences of primer 5'⟶3'forward	5'⟶3'-reverse	annealing temperatures (°C)
FAM60	$(CAA)_6$	F-CCTCATCTGGCTTTCATAAC	R-CTGGACAGAACTTGGATCAT	58
FAM71	$(AT)_9$	F-AGTCTCTTCAAGTGCCTCAG	R-CTGCATAGACTGACGAAACA	60
FAM72	$(CT)_{14}$	F-TCAGTCCAGATTTACCTTGC	R-TCATGTGGTTCTGCAATAGA	58
FAM75	$(CTT)_{11}$	F-CCTGTAAACGCTTCAAATCT	R-ATGGCTGAGTCATAGAGAGG	52
FAM79	$(AG)_{12}$	F-GCAGAAGCAAGAAGTGAAGT	R-AGATTCAAAGCCACTGAAGA	58
FAM81	$(GCC)_8$	F-TTCTCTCAACATACATGGCA	R-GCACTGAATACACTTGGGTT	56
FAM102	$(TATG)_5$	F-ACCCATGTTCTCTTCAACAC	R-CGAGAGATTGGAGAGTATCG	54
FAM106	$(TCG)_6$	F-TCATCAACATCATCATCCAC	R-GCACTCTTCTCACCTTTGTT	58
FAM126	$(AG)_{10}$	F-CGACCTAAGAAACACCATTC	R-CCTTGGACCGAACTATCTG	58
FAM129	$(AAAGG)_4$	F-ACATCCCTTTGTTGTCTTCTT	R-ATTTGTGCTGTTGTCTGTTGT	58
FAM137	$(TC)_9$	F-CAAACTGTCCAATCCTCATAGT	R-AGTAGAGCCAAGTGTCAAACC	36
FAM138	$(GCA)_9$	F-CGAGTGGTAGAGAGGAGAGAG	R-GTTGAGGGTGATGGTAAGG	64
FAM144	$(ACC)_9$	F-CACCACTATCACCACTACCAC	R-AGGAGGCGAATGAAGGTC	56
FAM145	$(CAA)_7$	F-TCCAACAACAACAACTACTAC	R-AGGAATCTCGTGTCGCTC	52
FAM146	$(TC)_9$	F-CAAACTGTCCAATCCTCATAGT	R-AGTAGAGCCAAGTGTCAAACC	62

4.1.3 การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นทำไวน์ด้วยไพรเมอร์ Microsatellite primer

การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นทำไวน์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ 18 คู่ ซึ่งมีรายละเอียดดังตารางที่ 4.1 จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากรองุ่นทำไวน์ 29 ตัวอย่างพันธุ์ พบว่าให้จำนวนอัลลีล (alleles) หรือแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่มีความแตกต่างกันถึง 133 อัลลีล ที่มีขนาดตั้งแต่ 112-262 คู่เบส โดยที่ไพรเมอร์ทั้งหมดให้อัลลีลที่มีความแตกต่างกันหรือมีความผันแปรตั้งแต่ 3 ถึง 12 อัลลีล หรืออาจกล่าวโดยเฉลี่ยแต่ละไพรเมอร์ให้อัลลีลที่มีความแตกต่างกันเฉลี่ยถึง 7.4 อัลลีลต่อไพรเมอร์ โดยที่ไพรเมอร์ FAM02 ให้อัลลีลดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันมากที่สุดถึง 12 อัลลีล ที่มีขนาดดังนี้ 188, 190, 198, 200, 204, 208, 216, 218, 220, 226, 232 และ 234 คู่เบส รองลงมาคือไพรเมอร์ VrZAG79 กับ FAM126 ให้อัลลีลต่างกัน 11 แบบ VVS2, VVMD27, FAM79, VVMD7 กับ FAM75 ให้อัลลีลต่างกัน 9 แบบ VVMD5, VrZAG62, FAM57 ให้อัลลีลต่างกัน 8 แบบ, FAM32, FAM60 ให้อัลลีลต่างกัน 5 แบบ FAM59 และ FAM138 ให้อัลลีลต่างกัน 4 แบบ ขณะที่ไพรเมอร์ FAM44, FAM46 และ FAM129 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีต่างกันน้อยที่สุดเพียง 3 แบบ คือแบบที่ 1 มีขนาดตั้งแต่ 112, 115, 118 แบบที่ 2 มีขนาด 141,146,151 และ แบบที่ 3 มีขนาด 112, 117, 122 คู่เบส ตามลำดับ รายละเอียดแสดงในตารางที่ 4.2

สำหรับการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นทำไวน์ทั้ง 29 ตัวอย่างพันธุ์ โดยใช้ microsatellite primer 18 คู่ ที่คัดเลือกไว้ ผลการดำเนินการ ได้ข้อมูลของลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างน้อย 522 ข้อมูล โดยที่ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดสรุปไว้ในตารางที่ 4.3 ซึ่งประกอบด้วย ขนาดและจำนวนอัลลีลทั้งหมด โดยใช้สัญญาลักษณ์บวก (+) หมายถึงมีหรือปรากฏของอัลลีลนั้น และสัญญาลักษณ์บวก (-) หมายถึงไม่มีหรือไม่ปรากฏของอัลลีลนั้น แต่ในไพรเมอร์ VrZAG79 จะพบอัลลีล 11 แบบ คือ 230, 232, 236, 238, 242, 244, 246, 248, 250, 252 และ 262 คู่เบส (bp) จะเห็นว่าอัลลีลขนาด 230 คู่เบส พบเฉพาะใน 2 พันธุ์เท่านั้นคือ พันธุ์ Zintandel และ Niagara สำหรับอัลลีลขนาด 232 คู่เบส พบเฉพาะพันธุ์ Riesling ซึ่งอาจใช้เป็นไพรเมอร์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพันธุ์ Riesling ได้ในทำนองเดียวกันจากตารางที่ 4.3 จะเห็นว่าในไพรเมอร์ VVS2 พบอัลลีล 10 แบบ มีขาด 123, 125, 127, 133, 135, 137, 139, 143, 145 และ 151 คู่เบส จะเห็นว่าอัลลีลขนาด 123, 127, และ 135 คู่เบส พบเฉพาะในพันธุ์ Niagara และ Faustino เท่านั้นตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นได้ว่าเอกลักษณ์สามารถนำไปใช้ในการจำแนกพันธุ์เหล่านี้ได้

ตารางที่ 4.2 แสดงขนาดและจำนวน alleles ของพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ที่ปลูกในประเทศไทย จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 18 คู่

ลำดับที่	ไพรเมอร์	ขนาดของอัลลีล (Base pair)	จำนวนอัลลีลที่พบ
1	VVS2	123, 125, 127, 133, 135, 137, 139, 143, 145 และ 151	10
2	VVMD5	226, 228, 232, 236, 238, 240, 244 และ262	8
3	VVMD7	235, 237, 243, 247, 249, 251, 255, 257 และ 261	9
4	VVMD27	175, 179, 181, 183,185, 189, 191, 195, 199 และ207	10
5	VrZAG62	182, 186, 188, 190, 194, 196, 198 และ200	8
6	VrZAG79	230, 232, 236, 238, 242, 244, 246, 248, 250, 252 และ 262	11
7	FAM02	188, 190, 198, 200, 204, 208, 216, 218, 220, 226, 232 และ 234	12
8	FAM32	191, 194, 197, 203 และ 209	5
9	FAM44	112, 115 และ 118	3
10	FAM46	141, 146 และ 151	3
11	FAM57	132, 134, 136, 138, 140, 142, 154 และ 156	8
12	FAM59	168, 171, 174 และ 180	4
13	FAM60	114, 132, 135, 141 และ 144	5
14	FAM75	142, 145, 148, 151, 157, 160, 163, 166 และ 169	9
15	FAM79	143, 145, 147, 149, 153, 155, 159, 163,165 และ 173	10
16	FAM126	189, 193, 201, 203, 209, 213 219, 221, 223, 227 และ 235	11
17	FAM129	112, 117 และ 122	3
18	FAM138	203, 206, 209 และ 212	4
		รวมทั้งสิ้น	133

สำหรับไพรเมอร์อื่นๆ ก็พบอัลลีลหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นแถบเอกลักษณ์ คือไม่พบแถบนี้ในองุ่นพันธุ์อื่นๆ ทั้ง 29 พันธุ์ ดังกล่าวสำหรับในตารางที่ 4.3 อัลลีลเหล่านั้นจะใส่สัญลักษณ์บวก (+) และพบว่าไพรเมอร์ที่ให้อัลลีลเอกลักษณ์เพียงแถบเดียว หมายถึงตำแหน่งนั้นอัลลีลที่เข้าคู่กันมีความยาวของอัลลีลเท่ากันเรียกอัลลีลที่อยู่ในสภาพนั้นว่าเป็น homozygous สำหรับตำแหน่งที่ อัลลีลที่เข้าคู่กันมีขนาดความยาวไม่เท่ากันเมื่อแยกโดยวิธี electropholesis จะพบแถบ 2 แถบ ที่เคลื่อนที่ไม่เท่ากันเนื่องจากความยาวของอัลลีลต่างกันเรียกสภาพอัลลีลในตำแหน่งนี้ว่าเป็น heterozygous เช่นในตารางที่ 4.3 ไพรเมอร์ VVS2 ในพันธุ์ Shiraz ให้อัลลีลที่มีขนาดเท่ากัน 1 แถบ เป็น homozygous alleles ขนาด 133 คู่เบส ขณะที่ไพรเมอร์ VVMD5 พันธุ์ Shiraz ให้อัลลีลที่มีความยาวต่างกันเป็น heterozygous alleles คือ 260 กับ 232 คู่เบส เป็นต้น เมื่อนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่น 29 ตัวอย่างพันธุ์ ที่ได้จากเทคนิค microsatellite 18 คู่ ทำการแปลงข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังนี้ ตำแหน่งที่พบหรือมีแถบดีเอ็นเอจากบวก (+) เป็น 1 ในตำแหน่งที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอ (-) เป็น 0

นำข้อมูลที่แปลงแล้วไปวิเคราะห์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมขององุ่นแต่ละพันธุ์ โดยใช้โปรแกรม UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmatic Average) เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ clustered analysis โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือน similarity matrix และแสดงผลในกราฟแผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogarm) โดยใช้ ward method ดังภาพที่ 4.1 และระยะห่างหรือความเหมือนทางพันธุกรรมดังตารางที่ 4.4 พบว่าสามารถแบ่งพันธุ์องุ่นทำไวน์ ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่ม A และ B ตามระยะห่างทางพันธุกรรม โดยทั้งหมดสองกลุ่มมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากกว่า 0.9 โดยทั้งสองกลุ่มมีทั้งองุ่นแดงและองุ่นขาวอยู่ในกลุ่มเดียวกัน สำหรับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทั้ง 4 กลุ่ม พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มย่อยๆ ได้อีก 2 กลุ่ม คือ a1และ a2 โดยที่ a1 ประกอบด้วย องุ่นที่มีชื่อคลายคลึงกัน 3 ตัวอย่างพันธุ์ Tempranillo RJ51 กับ Tempranillo 776 เก็บรวบรวมจากไร่องุ่นหัวหิน ฮิลล์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์และ พันธุ์ Tempranillo ที่เก็บมาจากไร่องุ่นพีบี วัลเล่ย์ เขาใหญ่ไวน์เนอรี่ จังหวัดนครราชสีมา ทั้ง 3 ตัวอย่างพันธุ์ไม่พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยใช้ microsatellite primer 18 คู่ (ตารางที่ 4.1) หรือมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเป็น 0.00 จึงสรุปได้ว่าน่าจะเป็นพันธุ์เดียวกันซึ่งมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันจากพันธุ์อื่นๆ ในกลุ่ม a2 มากเฉลี่ยถึง 0.6

ตารางที่ 4.3 จำนวนแถบดีเอ็นเอ (alleles) ที่พบในพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 18 คู่

Primer	alleles size (bp)	Shiraz 174	Shiraz	Shiraz	Cabernet Sauvignon	Cabernet Sauvignon	Chenin Blanc 220	Chenin Blanc 880	Chenin Blanc	Colombard 607B	Colombard 607C	Colombard 625	Colombard	Tempranillo 776	Tempranillo RJ51	Tempranillo	Chardonay	Riesling	Guetramimer	Marechal Foch	Zintandel	Niagara	Carbernet Franc	Rubired	Babera	Macabau Blanc	Faustino	Deraware	Merlot	Pinot Noir
VVS2	123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	133	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
	135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	139	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	143	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	151	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
VVMD5	226	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
	228	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	232	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-
	238	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	240	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	244	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	262	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VVMD7	235	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	237	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
	243	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	247	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	249	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
	251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	255	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	257	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	261	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
VVMD27	175	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	179	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	181	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	183	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	185	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
	189	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	191	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	207	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VrZAG62	182	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	186	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
	188	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	194	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	196	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	198	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-

หมายเหตุ: + = มีแถบ (present)

- = ไม่มีแถบ (absent)

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) จำนวนแถบดีเอ็นเอ (alleles) ที่พบในพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 18 คู่

Primer	alleles size (bp)	Shiraz 174	Shiraz	Shiraz	Cabernet Sauvignon	Cabernet Sauvignon	Chenin Blanc 220	Chenin Blanc 880	Chenin Blanc	Colombard 607B	Colombard 607C	Colombard 625	Colombard	Tempranillo 776	Tempranillo RJ51	Tempranillo	Chardonay	Riesling	Guetramimer	Marechal Foch	Zintandel	Niagara	Carbernet Franc	Rubired	Babera	Macabau Blanc	Faustino	Deraware	Merlot	Pinot Noir
VrZAG79	230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	232	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	238	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
	242	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	244	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	246	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	248	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	250	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
	252	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	262	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
FAM02	188	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
	198	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
	220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	226	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	232	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	234	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FAM32	191	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	194	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
	197	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	203	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	209	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FAM44	112	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	118	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
FAM46	141	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	151	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
FAM57	132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	138	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
	140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	142	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
	154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
	156	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + = มีแถบ (present)

- = ไม่มีแถบ (absent)

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) จำนวนแถบดีเอ็นเอ (alleles) ที่พบในพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์ จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 18 คู่

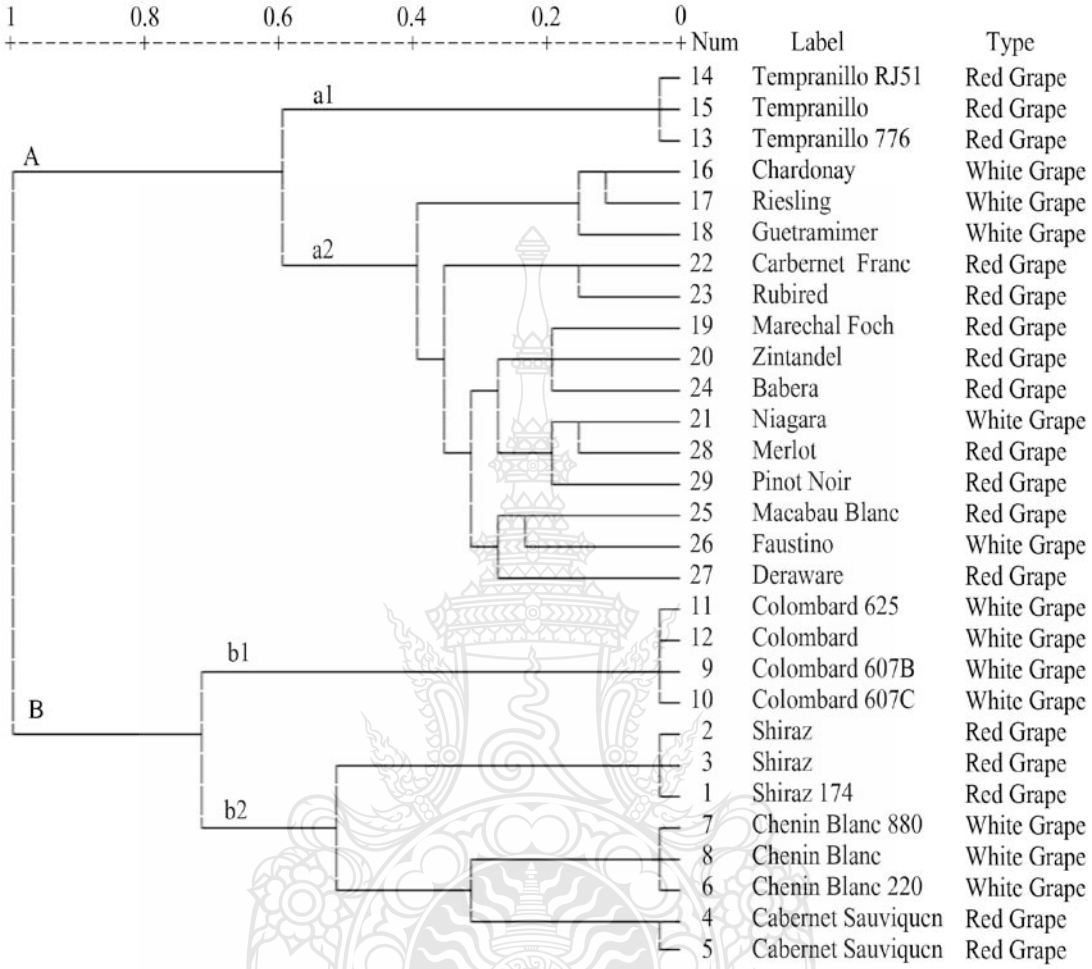
Primer	alleles size (bp)	Shiraz 174	Shiraz	Shiraz	Cabernet Sauvignon	Cabernet Sauvignon	Chenin Blanc 220	Chenin Blanc 880	Chenin Blanc	Colombard 607B	Colombard 607C	Colombard 625	Colombard	Tempranillo 776	Tempranillo RJ51	Tempranillo	Chardonay	Riesling	Guetramimer	Marechal Foch	Zintandel	Niagara	Carbernet Franc	Rubired	Babera	Macabau Blanc	Faustino	Deraware	Merlot	Pinot Noir
FAM59	168	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	
	171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
	174	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FAM60	114	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	135	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	
	141	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
	144	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
FAM75	142	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	
	145	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	148	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	
	151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
	163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	169	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
FAM79	143	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	145	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
	149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
	153	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	155	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	159	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
	165	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	173	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FAM126	189	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	193	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
	201	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	203	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
	209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	219	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
	213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	221	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	223	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	235	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
FAM129	112	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	122	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
FAM138	203	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	206	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	212	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + = มีแถบ (present)

- = ไม่มีแถบ (absent)

ตารางที่ 4.4 ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของพันธุ์องุ่น 29 ตัวอย่างพันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 18 คู่ ทำการประเมินโดยวิธี UPGMA

Case	Shiraz 174	Shiraz	Shiraz	Cabernet Sauvignon	Cabernet Sauvignon	Chenin Blanc 220	Chenin Blanc 880	Chenin Blanc	Colombard 607B	Colombard 607C	Colombard 625	Colombard	Tempranillo 776	Tempranillo RJ51	Tempranillo	Chardonay	Riesling	Guetramimer	Marechal Foch	Zintandel	Niagara	Carbernet Franc	Rubired	Babera	Macabau Blanc	Faustino	Deraware	Merlot	Pinot Noir
Shiraz 174	0.00																												
Shiraz	0.00	0.00																											
Shiraz	0.00	0.00	0.00																										
Cabernet Sauviqucn	0.57	0.57	0.57	0.00																									
Cabernet Sauviqucn	0.57	0.57	0.57	0.00	0.00																								
Chenin Blanc 220	0.47	0.47	0.47	0.41	0.41	0.00																							
Chenin Blanc 880	0.47	0.47	0.47	0.41	0.41	0.00	0.00																						
Chenin Blanc	0.47	0.47	0.47	0.41	0.41	0.00	0.00	0.00																					
Colombard 607B	0.61	0.61	0.61	0.55	0.55	0.53	0.53	0.53	0.00																				
Colombard 607C	0.61	0.61	0.61	0.55	0.55	0.53	0.53	0.53	0.00	0.00																			
Colombard 625	0.61	0.61	0.61	0.55	0.55	0.53	0.53	0.53	0.00	0.00	0.00																		
Colombard	0.61	0.61	0.61	0.55	0.55	0.53	0.53	0.53	0.00	0.00	0.00	0.00																	
Tempranillo 776	0.55	0.55	0.55	0.76	0.76	0.75	0.75	0.75	0.61	0.61	0.61	0.61	0.00																
Tempranillo RJ51	0.55	0.55	0.55	0.76	0.76	0.75	0.75	0.75	0.61	0.61	0.61	0.61	0.00	0.00															
Tempranillo	0.55	0.55	0.55	0.76	0.76	0.75	0.75	0.75	0.61	0.61	0.61	0.61	0.00	0.00	0.00														
Chardonay	0.61	0.61	0.61	0.75	0.75	0.76	0.76	0.76	0.71	0.71	0.71	0.71	0.73	0.73	0.73	0.00													
Riesling	0.63	0.63	0.63	0.80	0.80	0.67	0.67	0.67	0.73	0.73	0.73	0.73	0.71	0.71	0.71	0.29	0.00												
Guetramimer	0.59	0.59	0.59	0.69	0.69	0.63	0.63	0.63	0.76	0.76	0.76	0.76	0.67	0.67	0.67	0.41	0.43	0.00											
Marechal Foch	0.54	0.54	0.54	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.54	0.54	0.54	0.54	0.52	0.52	0.52	0.48	0.56	0.54	0.00										
Zintandel	0.75	0.75	0.75	0.88	0.88	0.78	0.78	0.78	0.80	0.80	0.80	0.80	0.71	0.71	0.71	0.73	0.75	0.75	0.52	0.00									
Niagara	0.69	0.69	0.69	0.82	0.82	0.73	0.73	0.73	0.67	0.67	0.67	0.67	0.73	0.73	0.73	0.75	0.76	0.80	0.58	0.65	0.00								
Carbernet Franc	0.82	0.82	0.82	0.84	0.84	0.86	0.86	0.86	0.80	0.80	0.80	0.80	0.71	0.71	0.71	0.69	0.75	0.75	0.62	0.71	0.73	0.00							
Rubired	0.82	0.82	0.82	0.92	0.92	0.90	0.90	0.90	0.84	0.84	0.84	0.84	0.71	0.71	0.71	0.57	0.63	0.67	0.56	0.67	0.84	0.43	0.00						
Babera	0.53	0.53	0.53	0.75	0.75	0.69	0.69	0.69	0.75	0.75	0.75	0.75	0.57	0.57	0.57	0.71	0.76	0.73	0.50	0.49	0.75	0.80	0.69	0.00					
Macabau Blanc	0.57	0.57	0.57	0.86	0.86	0.76	0.76	0.76	0.78	0.78	0.78	0.78	0.65	0.65	0.65	0.55	0.65	0.61	0.52	0.61	0.82	0.69	0.61	0.47	0.00				
Faustino	0.76	0.76	0.76	0.98	0.98	0.92	0.92	0.92	0.86	0.86	0.86	0.86	0.69	0.69	0.69	0.71	0.76	0.73	0.58	0.80	0.75	0.69	0.69	0.71	0.59	0.00			
Deraware	0.82	0.82	0.82	1.00	1.00	0.82	0.82	0.82	0.96	0.96	0.96	0.96	0.78	0.78	0.78	0.84	0.90	0.75	0.62	0.78	0.80	0.71	0.86	0.76	0.69	0.65	0.00		
Merlot	0.69	0.69	0.69	0.63	0.63	0.69	0.69	0.69	0.75	0.75	0.75	0.75	0.61	0.61	0.61	0.67	0.69	0.73	0.52	0.69	0.78	0.61	0.80	0.67	0.71	0.71	0.69	0.00	
Pinot Noir	0.61	0.61	0.61	0.82	0.82	0.69	0.69	0.69	0.71	0.71	0.71	0.71	0.69	0.69	0.69	0.51	0.61	0.61	0.54	0.80	0.86	0.84	0.80	0.67	0.55	0.86	0.80	0.55	0.00



ภาพที่ 4.1 การจัดกลุ่ม (Dendrogarm) และแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันองุ่นทำไวน์ จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ ที่ได้จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 18 คู่

สำหรับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันองุ่นในกลุ่ม a2 จำนวน 14 ตัวอย่างพันธุ์ มีค่าความห่างหรือแตกต่างทางพันธุกรรมประมาณ 0.4 สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้อีก 5 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วยองุ่นพันธุ์ Chardonay, Riesling และ Guetramimer โดยที่พันธุ์ Chardonay กับพันธุ์ Riesling มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.29 พันธุ์ Chardonay กับพันธุ์ Guetramimer มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.41 พันธุ์ Riesling กับพันธุ์ Guetramimer มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.43 ดังแสดงตารางที่ 4.4

กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยองุ่นพันธุ์ Carbernet Franc และ Rubired องุ่นสองพันธุ์นี้มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.43 ดังแสดงตารางที่ 4.4

กลุ่มย่อยที่ 3 ประกอบด้วยองุ่นพันธุ์ Marechal Foch, Zintandel, Babera และ Niagara โดยที่พันธุ์ Marechal Foch กับพันธุ์ Zintandel มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.52 พันธุ์ Marechal Foch กับพันธุ์ Babera มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.50 พันธุ์ Marechal Foch กับพันธุ์ Niagara มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.57 พันธุ์ Zintandel กับพันธุ์ Babera มีค่ามีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.49 พันธุ์ Zintandel กับพันธุ์ Niagara มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.64 ดังแสดงตารางที่ 4.4

กลุ่มย่อยที่ 4 ประกอบด้วยองุ่นพันธุ์ Merlot และ Pinot Noir องุ่นสองพันธุ์นี้มีค่ามีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.54 ดังแสดงตารางที่ 4.4

กลุ่มย่อยที่ 5 ประกอบด้วยองุ่นพันธุ์ Macabau Blanc, Faustino และ Deraware โดยที่พันธุ์ Macabau Blanc กับพันธุ์ Faustino มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.58 ในขณะที่พันธุ์ Macabau Blanc กับพันธุ์ Deraware มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.68 พันธุ์ Faustino กับพันธุ์ Deraware มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.64 ดังแสดงตารางที่ 4.4

สำหรับกลุ่ม B ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ b1 และ b2 อย่างชัดเจนดังนี้

กลุ่มที่ b1 ประกอบด้วยองุ่นพันธุ์ Colombard 625, Colombard และ Colombard 607B Colombard 607C องุ่นสามตัวอย่างพันธุ์นี้มีชื่อคล้ายกันแต่เก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกต่างกัน มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.00 แสดงว่าทั้งสามตัวอย่างพันธุ์นี้มีพันธุกรรมที่เหมือนกันหรืออาจเป็นพันธุ์เดียวกันดังแสดงตารางที่ 4.4 และมีความแตกต่างจากพันธุ์ในกลุ่มที่ b2 ประมาณ 0.5 ดังภาพที่ 4.1

กลุ่มที่ b2 ยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 3 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วยองุ่นพันธุ์ Shiraz, Shiraz และ Shiraz 174 องุ่นสามพันธุ์นี้มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.00 แสดงว่าทั้งสามตัวอย่างพันธุ์นี้มีพันธุกรรมที่เหมือนกันแม้แหล่งปลูกต่างกัน ดังแสดงตารางที่ 4.4

กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยองุ่นพันธุ์ Chenin Blanc 880, Chenin Blanc และ Chenin Blanc 220 องุ่นสามตัวอย่างพันธุ์นี้ มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.00 แสดงว่าทั้งสามตัวอย่างพันธุ์นี้มีพันธุกรรมที่เหมือนกันแม้แหล่งปลูกต่างกัน ดังแสดงตารางที่ 4.4

กลุ่มย่อยที่ 3 ประกอบด้วยองุ่นพันธุ์ Cabernet Sauvignon และ Cabernet Sauvignon องุ่นสองพันธุ์นี้มีค่าระยะห่างหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.00 แสดงว่าทั้งสามตัวอย่างพันธุ์นี้มีพันธุกรรมที่เหมือนกันแม้แหล่งปลูกต่างกัน ดังแสดงตารางที่ 4.4

จากผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นทำไวน์จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ โดยใช้ microsatellite primer 18 คู่ พบว่า สามารถจำแนกและแบ่งกลุ่มพันธุ์องุ่นทำไวน์ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จากการวิเคราะห์ตามระยะห่างทางพันธุกรรม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dzhambazova *et al.* (2009) โดยใช้โดยใช้ microsatellite primer จำนวน 7 คู่ ในการศึกษาลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรม สามารถแบ่งกลุ่มและจำแนกความแตกต่างระหว่างองุ่นป่าและองุ่นสายพันธุ์ปลูก นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างองุ่นในบัลแกเรียองุ่นยุโรป และเอเชีย เช่นเดียวกับ Huang *et al.* (2010) ได้ใช้ microsatellite primer จำนวน 150 คู่ นำมาใช้ในการทำแผนที่ยีนหรือจีโนมในจำแนกความแตกต่างขององุ่น และยังถูกนำใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในองุ่นชนิดอื่นๆ ได้เป็นผลสำเร็จ

นอกจากนี้ (Thomas and Scott, 1993; Bowers *et al.*, 1996; Sefc *et al.*, 1999) เครื่องหมายmicrosatellite ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกและระบุสายพันธุ์องุ่นทำไวน์และองุ่นสำหรับเป็นต้นตอ (Paetkau *et al.*, 1995) เนื่องจากมีการแลกเปลี่ยนพันธุ์องุ่นระหว่างแหล่งปลูกต่างๆ ทำให้ไม่ทราบแหล่งกำเนิดขององุ่นพันธุ์นั้นๆ เช่นเดียวกับ Sefc *et al.* (2000) ได้ใช้ microsatellite primer จำนวน 9 คู่ ในการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมขององุ่นและศึกษาความแตกต่างของพันธุ์องุ่นจากแหล่งปลูก 8 ประเทศ ในยุโรป ได้แก่ กรีซ, โครเอเชีย, ทางเหนืออิตาลี, ออสเตรีย, เยอรมนี, ฝรั่งเศส, สเปน และโปรตุเกส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ This *et al.* (2004) โดยใช้ microsatellite primer จำนวน 6 คู่ ในการวิเคราะห์องุ่นจำนวน 46 สายพันธุ์ และศึกษาความแตกต่างของพันธุ์องุ่นจากแหล่งปลูก 7 ประเทศบางสายพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนกัน ด้วยเครื่องหมาย

โมเลกุลนี้สามารถแยกความแตกต่างของพันธุกรรมอุ่นเหล่านี้ได้ดี ทั้งพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนกันหรือต่างกัน

4.2 ศึกษาพันธุกรรมของอุ่นทำไวน์ที่ปลูกในประเทศไทยกับต่างประเทศ

จากการศึกษาและสืบค้นข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากฐานข้อมูลต่างประเทศหรือเอกสารวิชาการต่างๆ ของพันธุ์อุ่นที่นิยมนำมาทำไวน์ จำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ อุ่นแดงพันธุ์ Shiraz, Cabernet Sauvignon อุ่นขาวพันธุ์ Chenin Blanc, Colombard และ Tempranillo พบว่า microsatellite primer จำนวน 6 คู่ ได้แก่ VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 และ VrZAG79 (Thomas and Scott, 1993; Bowers *et al*., 1996; Sefc *et al*., 1999) มีรายละเอียดของอัลลีลที่ได้จำแนกพันธุ์อุ่นที่ปลูกในประเทศกับต่างประเทศ ได้ข้อมูลอัลลีลหรือความยาวของแถบดีเอ็นเอของอุ่นทั้ง 5 พันธุ์ และสามารถแยกออกจากพันธุ์อุ่นที่ใช้ทำไวน์กลุ่มอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน ดังแสดงตารางที่ 4.3 เป็นการสรุปขนาดและจำนวนแถบดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์ที่ได้จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงนำมาศึกษาในครั้งนี้ จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ทางพันธุกรรมแบบกึ่งอัตโนมัติ (ABI Prism^{TM} 377 DNA Sequencer) ตามวิธีการของ Anonymous (1997) เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือขนาดของอัลลีลของพันธุ์อุ่นที่นิยมทำไวน์ในประเทศไทย มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของอุ่นจากต่างประเทศ พบว่า อุ่นทั้ง 5 พันธุ์ ที่มีชื่อเดียวและปลูกต่างสถานที่นั้นมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันดังที่แสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งมีลายละเอียดดังนี้

ไพรเมอร์ VVS2 พบว่า แถบดีเอ็นเอเป็นอุ่นพันธุ์ Shiraz อัลลีล 1 และ 2 มีขนาดเท่ากันจึงพบเพียง 1 แถบ คือขนาด 133 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Vouillamoz *et al.* (2006) และ Topfer *et al*. (2007) พันธุ์ Cabernet Sauvignon เพียง 2 แถบ คือขนาด 139 และ 151 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Botta *et al.* (1995) และ Lamboy *et al*. (1998) พันธุ์ Chenin Blanc เพียง 2 แถบ คือขนาด 133 และ 151 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Sefer *et al*. (2000) และ Topfer *et al*. (2007) ที่ปลูกในประเทศไทยตรงกับพันธุ์อุ่นที่ปลูกในต่างประเทศที่ใช้เป็นฐานข้ออ้างอิง ส่วนพันธุ์ Tempranillo ที่ปลูกในประเทศกับต่างประเทศมีเพียง 1 แถบ คือขนาด 143 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Leao *et al*. (2008) ส่วนพันธุ์ Tempranillo ถูกอ้างอิงโดย Sefer *et al*. (2000) ที่มีลำดับเบสแตกต่างกันเพียง 1 คู่เบส ระหว่าง A และ T ซึ่งสอดคล้องกับทางบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือแจ้งว่ามีค่าผิดพลาดได้ไม่เกิน ±1 ในขณะที่พันธุ์ Colombard ที่ปลูกในประเทศกับต่างประเทศมีเพียง 2 แถบคือ ขนาด 143 และ 151 คู่เบส ตรงกันจากการอ้างอิงโดย Topfer *et al*. (2007) ส่วนพันธุ์ Colombard อ้างอิงโดย Veloso *et al*. (2010) มีเพียง 2 แถบ คือ ขนาด 145 และ 153 คู่เบส

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นทำไวน์จากฐานข้อมูลต่างประเทศกับของไทยโดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 6 คู่ เพื่อระบุความเหมือนหรือความแตกต่างกันทางพันธุกรรม

Locus	allele 1	allele 2	Cultivar	Reference
VVS2	133	133	Syrah(Shiraz)	Vouillamoz *et al.* 2006
Dinuclcetide Repeat $(GA)_{22}$	133	133	Syrah(Shiraz)	Topfer and Erika. 2007
	133	133	Syrah(Shiraz)	This paper
	139	151	Cabernet Sauvignon	Botta *et al.* 1995
	139	151	Cabernet Sauvignon	Lamboy *et al.* 1998
	139	151	Cabernet Sauvignon	This paper
	133	151	Chenin Blanc	Sefe *et al.* 2000
	133	151	Chenin Blanc	Topfer and Erika. 2007
	133	151	Chenin Blanc	This paper
	145	153	Colombard	Topfer and Erika. 2007
	143	151	Colombard	Veloso *et al.* 2010
	143	151	Colombard	This paper
	142	144	Tempranillo	Sefer *et al.* 2000
	143	143	Tempranillo	Leao *et al.* 2008
	143	143	Tempranillo	This paper
VVMD5	226	232	Syrah(Shiraz)	Siret *et al.* 2000
Dinuclcetide Repeat $(CT)_3AT(CT)_{11}$	226	232	Syrah(Shiraz)	Vouillamoz *et al.* 2006
	226	232	Syrah(Shiraz)	This paper
	232	240	Cabernet Sauvignon	Bowers *et al.* 1996
	232	240	Cabernet Sauvignon	Stover *et al.* 2009
	232	240	Cabernet Sauvignon	This paper
	228	232	Chenin Blanc	Bowers *et al.* 1996
	228	232	Chenin Blanc	Vouillamoz *et al.* 2006
	228	232	Chenin Blanc	This paper
	232	240	Colombard	Bowers *et al.* 1996
	232	240	Colombard	Veloso *et al.* 2010
	232	240	Colombard	This paper
	234	234	Tempranillo	Sefe *et al.* 2000
	233	233	Tempranillo	Martinez de Toda *et al.*
	233	233	Tempranillo	This paper

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) เปรียบเทียบข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นทำไวน์จากฐานข้อมูลต่างประเทศกับของไทยโดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 6 คู่ เพื่อระบุความเหมือนหรือความแตกต่างกันทางพันธุกรรม

Locus	allele 1	allele 2	Cultivar	Reference
VVMD7	239	239	Syrah(Shiraz)	Vouillamoz *et al.* 2006
Dinucleotide Repeat	239	239	Syrah(Shiraz)	Topfer and Erika. 2007
$(CT)_{14.5}$	239	239	Syrah(Shiraz)	This paper
	239	239	Cabernet Sauvignon	Bowers *et al.* 1996
	239	239	Cabernet Sauvignon	Lamboy *et al.* 1998
	239	239	Cabernet Sauvignon	This paper
	239	257	Chenin Blanc	Bowers *et al.* 1996
	239	257	Chenin Blanc	Vouillamoz *et al.* 2006
	239	257	Chenin Blanc	This paper
	239	239	Colombard	Bowers *et al.* 1996
	239	239	Colombard	Laucou *et al.* 2008
	239	239	Colombard	This paper
	237	251	Tempranillo	Gonzalez-Andres *et al.* 2007
	237	251	Tempranillo	Martin *et al.* 2011
	237	251	Tempranillo	This paper
VVMD27	189	191	Syrah(Shiraz)	Siret *et al.* 2000
Dinucleotide Repeat	189	191	Syrah(Shiraz)	Veloso *et al.* 2010
$(CT)_x$	189	191	Syrah(Shiraz)	This paper
	175	189	Cabernet Sauvignon	Vouillamoz *et al.* 2006
	175	189	Cabernet Sauvignon	Stover *et al.* 2009
	175	189	Cabernet Sauvignon	This paper
	175	189	Chenin Blanc	Vouillamoz *et al.* 2006
	175	189	Chenin Blanc	Leao *et al.* 2008
	175	189	Chenin Blanc	This paper
	176	182	Colombard	Topfer and Erika. 2007
	175	181	Colombard	Veloso *et al.* 2010
	175	181	Colombard	This paper
	181	183	Tempranillo	Leao *et al.* 2008
	181	183	Tempranillo	Stover *et al.* 2009
	181	183	Tempranillo	This paper

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) เปรียบเทียบข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นทำไวน์จากฐานข้อมูลต่างประเทศกับของไทยโดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 6 คู่ เพื่อระบุความเหมือนหรือความแตกต่างกันทางพันธุกรรม

Locus	allele 1	allele 2	Cultivar	Reference
VrZAG62	188	194	Syrah(Shiraz)	Topfer and Erika. 2007
Dinuclcetide Repeat	188	194	Syrah(Shiraz)	Veloso *et al*. 2010
$(GA)_{19}$	188	194	Syrah (Shiraz)	This paper
	188	194	Cabernet Sauvignon	Frei *et al.* 2006
	188	194	Cabernet Sauvignon	Veloso *et al*. 2010
	188	194	Cabernet Sauvignon	This paper
	189	195	Chenin Blanc	Vouillamoz *et al*. 2006
	189	195	Chenin Blanc	Leao *et al*. 2008
	188	194	Chenin Blanc	This paper
	188	196	Colombard	Topfer and Erika. 2007
	188	196	Colombard	Bonnet *et al*.2009-2011
	188	195	Colombard	This paper
	195	199	Tempranillo	Sefc *et al*. 2000
	195	199	Tempranillo	Garcia-Beneytez *et al*. 2002
	194	198	Tempranillo	This paper
VrZAG79	244	250	Syrah(Shiraz)	Sefe *et al*. 2000
Dinuclcetide Repeat	244	250	Syrah(Shiraz)	Vouillamoz *et al*. 2006
$(GA)_{19}$	244	250	Syrah(Shiraz)	This paper
	247	247	Cabernet Sauvignon	Sefc *et al*. 2000
	246	246	Cabernet Sauvignon	Stover *et al*. 2009
	246	246	Cabernet Sauvignon	This paper
	247	151	Chenin Blanc	Topfer and Erika. 2007
	247	251	Chenin Blanc	Leao *et al*. 2008
	246	250	Chenin Blanc	This paper
	243	257	Colombard	Topfer and Erika. 2007
	243	247	Colombard	Veloso *et al*. 2010
	242	246	Colombard	This paper
	247	251	Tempranillo	Sefe *et al*. 2000
	246	250	Tempranillo	Stover *et al*. 2009
	246	250	Tempranillo	This paper

ไพรเมอร์ VVMD5 พบว่า มีแถบดีเอ็นเอเป็นองุ่นพันธุ์ Shiraz มี 2 แถบ คือขนาด 226 และ 232 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Siret *et al.* (2000) และ Vouillamoz *et al.* (2006) พันธุ์ Cabernet Sauvignon มี 2 แถบคือ ขนาด 232 และ 240 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Bowers *et al.* (1996) และ Stover *et al.* (2009) พันธุ์ Chenin Blanc มี 2 แถบ คือขนาด 228 และ 232 คู่เบส เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Bowers *et al.* (1996) และ Vouillamoz *et al.* (2006) พันธุ์ Colombard มี 2 แถบ คือขนาด 232 และ 240 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Bowers *et al.* (1996) และ Veloso *et al.* (2010) องุ่นพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยมีแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรงกับพันธุ์องุ่นที่ปลูกในต่างประเทศที่ใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิง ส่วนพันธุ์ Tempranillo ที่ปลูกในประเทศกับต่างประเทศมีแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ คือขนาด 243 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงพันธุ์โดย Martin *et al.* (2011) ส่วนพันธุ์ Tempranillo อ้างอิงโดย Sefer *et al.* (2000) มีเพียง 1 แถบ คือขนาด 234 คู่

ไพรเมอร์ VVMD7 พบว่า มีแถบดีเอ็นเอเป็นองุ่นพันธุ์ Shiraz จำนวน 2 แถบ คือขนาด 239 และ 239 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Vouillamoz *et al.* (2006) และ Topfer *et al.* (2007) พันธุ์ Cabernet Sauvignon จำนวน 2 แถบ คือขนาด 232 และ 240 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Bowers *et al.* (1996) และ Lamboy *et al.* (1998) พันธุ์ Chenin Blanc จำนวน 2 แถบ คือขนาด 237 และ 257 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Bowers *et al.* (1996) และ Vouillamoz *et al.* (2006) พันธุ์ Colombard จำนวน 2 แถบ คือขนาด 239 และ 239 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Bowers *et al.* (1996) และ Laucou *et al.* (2008) และพันธุ์ Tempranillo เพียง 2 แถบ คือขนาด 237 และ 251 คู่ เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Gonzalez-Andres *et al.* (2007) และ Martin *et al.* (2011) ที่ปลูกในประเทศตรงกับพันธุ์องุ่นที่ปลูกในต่างประเทศที่ใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิง

ไพรเมอร์ VVMD27 พบว่า มีแถบดีเอ็นเอเป็นองุ่นพันธุ์ Shiraz มี 2 แถบ คือขนาด 189 และ 191 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Siret *et al.* (2000) และ Veloso *et al.* (2010) พันธุ์ Cabernet Sauvignon มี 2 แถบ คือขนาด 179 และ 189 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Vouillamoz *et al.* (2006) และ Stover *et al.* (2009) พันธุ์ Chenin Blanc มี 2 แถบคือ ขนาด 175 และ 189 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Vouillamoz *et al.* (2006) และ Leao *et al.* (2008) พันธุ์ Tempranillo มี 2 แถบ คือ ขนาด 181 และ 183 คู่ เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Leao *et al.* (2008) และ Stover *et al.* (2009) ที่ปลูกในประเทศไทยตรงกับพันธุ์องุ่นที่ปลูกในต่างประเทศที่ใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิง ในขณะที่พันธุ์ Colombard ที่ปลูกในประเทศกับต่างประเทศมีเพียง 2 แถบคือ ขนาด 175 และ 181 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Veloso *et al.* (2010) ส่วนพันธุ์ Colombard อ้างอิงโดย Topfer *et al.* (2007) มีเพียง 2 แถบคือขนาด 176 และ 182 คู่เบส ที่มีลำดับเบสแตกต่างกันเพียง 1 คู่เบส อาจเป็นอัลลีลเดียวกันแต่อาจใช้เครื่องวิเคราะห์ต่างกันผลจึงผิด 1 คู่เบส

ไพรเมอร์ VrZAG62 พบว่า มีแถบดีเอ็นเอเป็นองุ่นพันธุ์ Shiraz มี 2 แถบ คือขนาด 188 และ 194 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Veloso *et al.* (2010) และ Topfer *et al.* (2007) พันธุ์ Cabernet Sauvignon มี 2 แถบ คือขนาด 188 และ 194 คู่เบส อ้างอิงโดย Veloso *et al.* (2010) และ Frei *et al.* (2006) ที่ปลูกในประเทศไทยตรงกับพันธุ์องุ่นที่ปลูกในต่างประเทศที่ใช้เป็นฐานข้ออ้างอิง ในขณะที่พันธุ์ Chenin Blanc มี 2 แถบ คือขนาด 188 และ 194 คู่เบส พันธุ์ Colombard มี 2 แถบ คือขนาด 188 และ 195 คู่ เบส และพันธุ์ Tempranillo มี 2 แถบ คือขนาด 194 และ 198 คู่ ที่ปลูกในประเทศกับต่างประเทศนั้นมีลำดับเบสแตกต่างกันเพียง 1 คู่เบส อาจเป็นการตรวจวิเคราะห์เครื่องต่างกันซึ่งอาจผิดพลาดได้ 1 คู่เบส ซึ่งถือว่ายังเป็นอัลลีลเดียวกัน

ไพรเมอร์ VrZAG79 พบว่า มีแถบดีเอ็นเอเป็นองุ่นพันธุ์ Shiraz มี 2 แถบ คือขนาด 188 และ 194 คู่เบส ตรงกับการอ้างอิงโดย Sefer *et al.* (2000) และ Vouillamoz *et al.* (2006) ที่ปลูกในประเทศไทยตรงกับพันธุ์องุ่นที่ปลูกในต่างประเทศที่ใช้เป็นฐานข้ออ้างอิง ในขณะที่พันธุ์ Cabernet Sauvignon มี 2 แถบคือ ขนาด 246 และ 246 คู่เบส ตรงกับกรอ้างอิงโดย Sefer *et al.* (2000) พันธุ์ Chenin Blanc มี 2 พันธุ์ Colombard มี 2 แถบ คือขนาด 242 และ 246 คู่ เบส เบส และพันธุ์ Tempranillo มี 2 แถบ คือ ขนาด 246 และ 250 คู่ เบส ตรงกับกรอ้างอิงโดย Sefer *et al.* (2000) ที่ปลูกในประเทศกับต่างประเทศนั้นมีลำดับเบสแตกต่างกันเพียง 1 คู่เบส อาจเป็นการใช้เครื่องวิเคราะห์ต่างกันในการทำลายพิมพ์ซึ่งอาจผิดพลาดได้ ±1 คู่เบส แต่อย่างไรก็ตามถือยังเป็นอัลลีลเดียวกัน

สำหรับพันธุ์องุ่นที่นิยมนำมาใช้ทำไวน์ที่ปลูกและมีชื่อเดียวกันในประเทศจาก 2 แหล่งปลูกคือ ไร่องุ่นหัวหินฮิลส์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และไร่องุ่นพีบี วัลเล่ย์ เขาใหญ่ ไวน์เนอรี่ จังหวัดนครราชสีมา ดังแสดงในตารางที่ 3.1 จากการประเมินลักษณะพันธุกรรมหรือการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่น เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรืออัลลีล (alleles) มาเปรียบเทียบซึ่งสรุปไว้ในดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยใช้ microsatellite primer จำนวน 6 คู่ ดังกล่าวมาข้างต้นที่ได้นำมาศึกษาในครั้งนี้ พบว่าไพรเมอร์ 6 คู่ สามารถแยกความแตกต่างออกจากพันธุ์องุ่นที่นิยมใช้ทำไวน์กลุ่มอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน เป็นการสรุปขนาดและจำนวนแถบดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์ที่ได้จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เมื่อนำอัลลีลหรือแถบดีเอ็นเอมาเปรียบ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ถึงแม้พันธุ์องุ่นนั้นจะ มาจากสถานที่ปลูกหรือสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันก็ไม่ผลต่อลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์องุ่น จึงสรุปได้ว่าองุ่นที่นิยมนำมาทำไวน์ 5 พันธุ์ คือ พันธุ์ Shiraz, Cabernet Sauvignon, Chenin Blanc, Colombard และ Tempranillo มีพันธุกรรมที่เหมือนกันทั้งพันธุ์ที่ปลูกในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้ microsatellite primer 18 คู่ สามารถนำมาใช้ตรวจสอบไวน์ได้

เนื่องจากมีการแลกเปลี่ยนพันธุ์องุ่นระหว่างแหล่งปลูกต่างๆ ทำให้ไม่ทราบแหล่งกำเนิดขององุ่นพันธุ์นั้นๆ Paetkau *et al.* (1995) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sefc *et al.* (2000) ได้ใช้ microsatellite primer จำนวน จำนวน 9 คู่ ในการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมขององุ่นและศึกษาความแตกต่างของพันธุ์องุ่นจากแหล่งปลูก 8 ประเทศ ในยุโรป เช่นเดียวกับ This *et al.* (2004) โดยใช้ microsatellite primer จำนวน 6 คู่ ในการวิเคราะห์และศึกษาความแตกต่างของพันธุ์องุ่นจากแหล่งปลูก 7 ประเทศ บางสายพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนกันหรือต่างกัน ในการจำแนกและแยกความแตกต่างของพันธุ์องุ่น ถึงแม้พันธุ์องุ่นนั้นจะมีชื่อเดียวกัน มาจากสถานที่ปลูกที่ต่างกันได้

4.3 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุพันธุ์องุ่นในน้ำไวน์

จากการสกัดดีเอ็นเอและเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอของไวน์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทแรกไวน์แดง และประเภทสองไวน์ขาว จากการเก็บผลผลิตในปี 2013 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3.4 จากการตกตะกอนไวน์ด้วย 2-propanal โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 2 วิธี คือ วิธีแรกเป็นการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (ตามคำแนะนำของบริษัท) และวิธีที่สองเป็นการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่ถูกพัฒนาขึ้นจากวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบ ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบสกัดดีเอ็นเอจากไวน์เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกองุ่นที่ใช้ทำไวน์ (Garcia-Beneytez *et al*., 2002; Savazzini *et al*., 2006; Baleiras-Couto และ Eiras-Dias., 2006)

การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำไวน์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit พบว่า มีข้อดีคือดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ ได้สารละลาย ดีเอ็นเอที่ใสและไม่มีสี ดังนั้นการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมหากต้องการดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี เนื่องจากสามารถกำจัดสารปนเปื้อนจำพวกโปรตีน สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) และสารพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีอยู่มากในน้ำไวน์ออกไปได้ ในขณะเดียวกันดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอแบบวิธี CTAB ด้วยวิธีดัดแปลงจาก Savazzini *et al.* (2006) ได้สารละลายดีเอ็นเอที่ใสและไม่มีสี รวมทั้งสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ภายหลังพบว่ามีตะกอนสีขาวขุ่นปนเปื้อนกับสารละลายดีเอ็นเอ

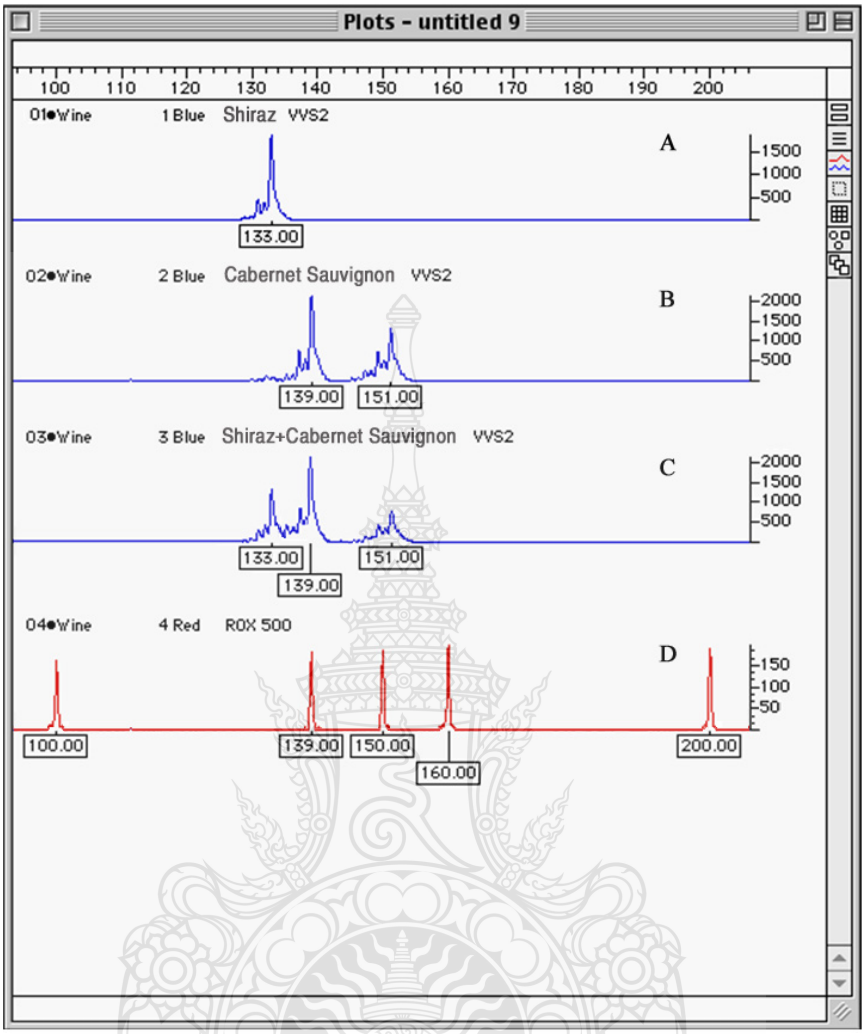
นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ในตัวอย่างไวน์ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง จาก 2 วิธีมาตรวจสอบคุณภาพด้วยด้วยวิธี electrophoresis ไม่พบแถบดีเอ็นเอเป็นไปได้ว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้อาจมีปริมาณน้อยเนื่องจากการเสียหายหรือแตกหักของดีเอ็นเอจากกระบวนการผลิต อาทิเช่น การหมัก การบ่ม การกรอง เป็นต้น (Garcia-Beneytez *et al*., 2002; Savazzini *et al*., 2006) ในขณะที่การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย

วิธีวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ในตัวอย่างไวน์ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง มีความเข้มข้นเฉลี่ยประมาณ 60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีปริมาณและคุณภาพสูงเมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

ดังนั้นการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ว่ามีดีเอ็นเอเพียงพอและมีสารยับยั้งการทำปฏิกิริยา PCR หรือไม่จาก 2 วิธีโดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ บริเวณ ribosomal DNA ในช่อง 18S rDNA ของสิ่งมีชีวิต (Kuzoff *et al*., 1998) ในการคัดเลือกดีเอ็นเอที่สกัดได้ พบ ว่าเมื่อนำผลผลิต PCR มาตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis สามารถตรวจสอบและคัดเลือกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธี ก่อนทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิค microsatellite พบว่า ทั้งสองวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่างวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit และการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบ CTAB ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Baleiras-Couto และ Eiras-Dias (2006) ที่พบว่า การสกัดดีเอ็นเอจากทั้งสองวิธีนี้ก็ไม่พบมีความแตกต่างกัน เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอข้างต้นมาศึกษาต่อด้วยเทคนิค microsatellite พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยาแสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นสามารถนำมาใช้งานต่อได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.2

4.4 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นที่ระบุในฉลากไวน์

จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอองุ่นในไวน์ที่ระบุในฉลากจากแหล่งผลิตต่างๆ จำนวน 9 ตัวอย่างโดยใช้ microsatellite primer จำนวน 6 คู่ คือ VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 และ VrZAG79 (Thomas and Scott, 1993; Bowers *et al*., 1996; Sefc *et al*., 1999) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 7 ได้จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงนำมาศึกษาในครั้งนี้ รวมกับการใช้เครื่องวิเคราะห์ทางพันธุกรรมแบบกึ่งอัตโนมัติ (ABI Prism™ 377 DNA Sequencer) ตามวิธีการของ Anonymous (1997) วิเคราะห์ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ ซึ่งจะมีขนาดของความยาวอัลลีล (alleles) ที่ต่างกันในองุ่นแต่ละพันธุ์ จึงสามารถแยกความแตกต่างขององุ่นแต่ละพันธุ์ได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 แสดงผลการตรวจพันธุ์องุ่นในน้ำไวน์ โดยใช้ Microsatellite primer VVS2 (A) ไวน์ที่ทำจากพันธุ์ Shiraz ยี่ห้อ Taras (B) พันธุ์ Cabernet Sauvignon ยี่ห้อ Hardy (C) พันธุ์ Shiraz กับ Cabernet Sauvignon ยี่ห้อ Hardy (D) DNA size standard (ROX 500)

โดยใช้ไพรเมอร์ VVS2 ที่ติดฉลากด้วยสีฟูออเรสเซนต์ด้วยสีฟ้า (Blue) ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากน้ำไวน์ของแต่ละยี่ห้อที่ระบุในฉลาก จะเห็นภาพ electropherograms บนสุดเป็นผลผลิต PCR ของ (A) ไวน์ที่ทำจากพันธุ์ Shiraz ยี่ห้อ Taras ให้อัลลีล 1 แถบ คือขนาด 133 คู่เบส รองลงมาเป็น (B) พันธุ์ Cabernet Sauvignon ยี่ห้อ Hardy ให้อัลลีล 2 แถบ คือขนาด 139 และ 151 คู่เบส (C) พันธุ์ Shiraz กับ Cabernet Sauvignon ยี่ห้อ Hardy ให้อัลลีล 3 แถบ คือขนาด 133, 139 คู่เบส และ

151 คู่เบส (D) ด้านล่างสุดเป็นขนาดของอัลลีลของ DNA size standard ที่ใส่ไว้ในหลอดทดลองที่จะตรวจสอบขนาดของอัลลีลทุกครั้ง เพื่อความถูกต้องและแม่นยำของขนาดอัลลีลที่ใช้ในการศึกษา และขนาดของอัลลีลหรือแถบดีเอ็นเอที่ตรวจพบยังสรุปไว้ในตารางที่ 4.6 ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ไพรเมอร์ VVS2 จากการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอขององุ่นพันธุ์ Shiraz เพียง 1 แถบ คือขนาด 133 คู่เบส พันธุ์ Chenin Blanc เพียง 2 แถบ คือขนาด 133 และ 151 คู่เบส พันธุ์ Cabernet Sauvignon เพียง 2 แถบ คือขนาด 139 และ 151 คู่เบส และ พันธุ์ Colombard เพียง 2 แถบ คือขนาด 143 และ 151 คู่เบส นอกจากนี้ยังสามารถแยกความแตกต่างอัลลีลของไวน์ที่มีส่วนผสมขององุ่นแดง 2 พันธุ์ คือองุ่นแดงพันธุ์ Shiraz และ Cabernet Sauvignon ได้อย่างชัดเจน ในจำนวนนี้พบแถบดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกความแตกต่างขององุ่น 4 พันธุ์นี้ได้ จำนวน 4 แถบ โดยพันธุ์ Shiraz ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีรูปแบบแตกต่างจากพันธุ์ Chenin Blanc, Cabernet Sauvignon และ Colombard เพียง 1 แถบคือขนาด 133 คู่เบส พันธุ์ Chenin Blanc มีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างจากพันธุ์ Shiraz, Cabernet Sauvignon และ Colombard เพียง 1 แถบ คือขนาด 151 คู่เบส พันธุ์ Cabernet Sauvignon มีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างจากพันธุ์ Shiraz, Chenin Blanc และ Colombard เพียง 1 แถบ คือขนาด 139 คู่เบส ส่วนพันธุ์ Colombard มีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างจากพันธุ์ Shiraz, Chenin Blanc และ Cabernet Sauvignon เพียง 1 แถบ คือขนาด 143 คู่เบส

ไพรเมอร์ VVMD5 จากการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอขององุ่นพันธุ์ Shiraz เพียง 1 แถบ คือขนาด 226 และ 232 คู่เบส พันธุ์ Chenin Blanc เพียง 1 แถบ คือขนาด 228 และ 232 คู่เบส และสามารถแยกความแตกต่างอัลลีลของไวน์ที่มีส่วนผสมขององุ่นแดง 2 พันธุ์ คือองุ่นแดงพันธุ์ Shiraz และ Cabernet Sauvignon ได้อย่างชัดเจน ในจำนวนนี้พบแถบดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกความแตกต่างขององุ่น 4 พันธุ์นี้ได้ จำนวน 4 แถบ โดยพันธุ์ Shiraz ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีรูปแบบแตกต่างจากพันธุ์ Chenin Blanc, Cabernet Sauvignon และ Colombard เพียง 1 แถบ คือขนาด 226 คู่เบส พันธุ์ Chenin Blanc มีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างจากพันธุ์ Shiraz, Cabernet Sauvignon และ Colombard เพียง 1 แถบ คือขนาด 228 คู่เบส ในขณะที่องุ่นพันธุ์ Cabernet Sauvignon และ Colombard เพียง 2 แถบ คือขนาด 232 และ 240 คู่เบส ในจำนวนนี้ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกความแตกต่างขององุ่นทั้งสองพันธุ์นี้ได้

ไพรเมอร์ VVMD7 จากการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอขององุ่นพันธุ์ Chenin Blanc เพียง 2 แถบ คือขนาด 237 และ 257 คู่เบส ในจำนวนนี้พบแถบดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกความแตกต่างขององุ่น 4 พันธุ์นี้ได้ จำนวน 2 แถบ โดยพันธุ์ Chenin Blanc ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีรูปแบบแตกต่างจากพันธุ์ Shiraz, Cabernet Sauvignon และ Colombard เพียง 1 แถบ คือขนาด 257 คู่เบส ในขณะที่พันธุ์

Shiraz, Cabernet Sauvignon และ Colombard และไวน์ที่มีส่วนผสมขององุ่นแดง 2 พันธุ์ คืออุ่นแดงพันธุ์ Shiraz และ Cabernet Sauvignon เพียง 1 แถบ ซึ่งมีขนาด 237 คู่เบส ในจำนวนนี้ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกความแตกต่างขององุ่นทั้งสามพันธุ์นี้ได้

ไพรเมอร์ VVMD27 จากการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอขององุ่นพันธุ์ Shiraz เพียง 2 แถบ คือขนาด 189 และ 191 คู่เบส และพันธุ์ Colombard เพียง 2 แถบ คือขนาด 175 และ 181 คู่เบส และสามารถแยกความแตกต่างอัลลีลของไวน์ที่มีส่วนผสมขององุ่นแดง 2 พันธุ์ คืออุ่นแดงพันธุ์ Shiraz และ Cabernet Sauvignon ได้อย่างชัดเจน ในจำนวนนี้พบแถบดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกความแตกต่างขององุ่น 4 พันธุ์นี้ได้ จำนวน 4 แถบโดยพันธุ์ Shiraz มีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างจากพันธุ์ Chenin Blanc, Cabernet Sauvignon และ Colombard เพียง 1 แถบ คือขนาด 191 คู่เบส พันธุ์ Colombard มีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างจากพันธุ์ Shiraz, Chenin Blanc และ Cabernet Sauvignon เพียง 1 แถบ คือขนาด 181 คู่เบส ในขณะที่พันธุ์ Chenin Blanc และ Cabernet Sauvignon เพียง 2 แถบ คือขนาด 175 และ 189 คู่เบส ในจำนวนนี้ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกความแตกต่างขององุ่นทั้งสองพันธุ์นี้ได้

ไพรเมอร์ VrZAG62 จากการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอขององุ่นพันธุ์ Colombard เพียง 2 แถบ คือขนาด ขนาด 188 และ 196 คู่เบส ในจำนวนนี้พบแถบดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกความแตกต่างขององุ่น 4 พันธุ์นี้ได้ จำนวน 3 แถบโดยพันธุ์ Colombard มีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างจากพันธุ์ Shiraz, Chenin Blanc และ Cabernet Sauvignon เพียง 1 แถบ คือขนาด 196 คู่เบส ในขณะที่พันธุ์ Shiraz, Chenin Blanc และ Cabernet Sauvignon และไวน์ที่มีส่วนผสมขององุ่นแดง 2 พันธุ์ คืออุ่นแดงพันธุ์ Shiraz และ Cabernet Sauvignon เพียง 2 แถบ คือขนาด 188 และ 194 คู่เบส ในจำนวนนี้ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกความแตกต่างขององุ่นทั้งสามพันธุ์นี้ได้

ไพรเมอร์ VrZAG79 จากการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอขององุ่นพันธุ์ Shiraz เพียง 2 แถบ คือขนาด 244 และ 250 คู่เบส พันธุ์ Chenin Blanc เพียง 2 แถบ คือขนาด 246 และ 250 คู่เบส พันธุ์ Cabernet Sauvignon เพียง 1 แถบ คือขนาด 246 คู่เบส และ พันธุ์ Colombard เพียง 2 แถบ คือขนาด 242 และ 246 คู่เบส และสามารถแยกความแตกต่างอัลลีลของไวน์ที่มีส่วนผสมขององุ่นแดง 2 พันธุ์ คืออุ่นแดงพันธุ์ Shiraz และ Cabernet Sauvignon ได้อย่างชัดเจน ในจำนวนนี้พบแถบดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกความแตกต่างขององุ่น 4 พันธุ์นี้ได้ จำนวน 4 แถบโดยพันธุ์ Shiraz ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีรูปแบบแตกต่างจากพันธุ์ Chenin Blanc, Cabernet Sauvignon และ Colombard เพียง 1 แถบ คือขนาด 244 คู่เบส พันธุ์ Cabernet Sauvignon มีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างจากพันธุ์ Shiraz, Chenin Blanc และ

Colombard เพียง 1 แถบ คือขนาด 246 คู่เบส ส่วนพันธุ์ Colombard มีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างจากพันธุ์ Shiraz, Chenin Blanc และ Cabernet Sauvignon เพียง 1 แถบ คือขนาด 242 คู่เบส เป็นที่น่าสังเกตว่าไพรเมอร์ VrZAG79 ให้แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ Chenin Blanc ที่มีรูปแบบดีเอ็นเอที่เหมือนกับพันธุ์ Colombard เพียง 1 แถบ คือ 246 คู่เบส ดังนั้นถ้านำเอาแถบดีเอ็นเอทั้งสองแถบมารวมกันก็สามารถแยกความแตกต่างจากองุ่นพันธุ์อื่นๆได้ เมื่อนำขนาดอัลลีลขององุ่นแต่ละพันธุ์ที่ตรวจพบในน้ำไวน์ แสดงตารางที่ 4.6 มาเปรียบเทียบกับขนาดของอัลลีลจากใบที่แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าขนาดอัลลีลขององุ่นแต่ละพันธุ์ที่ตรวจพบในน้ำไวน์ตรงกับที่ระบุในฉลาก ตรงกับขนาดของอัลลีลจากใบที่ใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิง

จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอขององุ่นในไวน์ที่ระบุในฉลาก โดยใช้ microsatellite primer จำนวน 6 คู่ มาใช้ในการตรวจสอบและระบุพันธุ์องุ่นในน้ำไวน์ พบว่า สามารถตรวจสอบและระบุสายพันธุ์องุ่นแต่พันธุ์ที่นำมาใช้ผลิตไวน์ในเชิงการค้าจากแหล่งผลิตต่างๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง ในไวน์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Siret *et al.* (2000) ที่ใช้ microsatellite primer จำนวน 4 คู่ ในการวิเคราะห์ความหลากหลายขององุ่น เพื่อใช้การระบุสายพันธุ์องุ่นที่ใช้ผลิตไวน์ในเชิงการค้า พบว่าสามารถวิเคราะห์และตรวจสอบดีเอ็นเอจากกระบวนการหมักไวน์จากส่วนที่เหลือในกระบวนการหมักได้ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Harta *et al.* (2011) ที่ใช้ microsatellite primer จำนวน 4 คู่ เพื่อใช้ในการตรวจสอบไวน์ในเชิงการค้า โดยวิเคราะห์ไวน์อายุ 12 เดือน และ 18 เดือน พบว่าสามารถตรวจสอบและจำแนกพันธุ์องุ่นหลังกระบวนการหมักไวน์ได้ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Savazzini *et al.* (2006) ที่ใช้ microsatellite primer จำนวน 6 คู่ มาใช้ในการตรวจสอบไวน์หลังกระบวนการหมักมาแล้ว 1 ปี พบว่า ยังสามารถตรวจสอบและระบุสายพันธุ์องุ่นที่ใช้ผลิตไวน์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Faria *et al.*, (2000); Baleiras-Couto และ Eiras-Dias (2006); Savazzini และ Martinelli (2006) ที่ได้นำ microsatellite primer จำนวน 6 คู่ มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบและระบุสายพันธุ์องุ่น เพื่อควบคุมคุณภาพขององุ่นที่นำมาใช้ทำไวน์

ตารางที่ 4.6 สรุปขนาดของแถบดีเอ็นเอ (alleles) ที่ตรวจพบในน้ำไวน์จากแหล่งผลิตต่างๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง โดยใช้ Microsatellite primer จำนวน 6 คู่

Primer	alleles size (bp)	พันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์น้ำไวน์ / ยี่ห้อ								
		Shiraz			Chenin Blanc		Cabernet Sauvignon		Colombard	Shiraz + Cabernet Sauvignon
		Monsoon Valley	Vineryards	Taras	Monsoon Valley	Spring	Vineryards	Hardys	Monsoon Valley	Hardys
VVS2	133	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	139	-	-	-	-	-	+	+	-	+
	143	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	151	-	-	-	+	+	+	+	+	+
VVMD5	226	+	+	+	-	-	-	-	-	+
	228	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	232	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	236	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	240	-	-	-	-	-	+	+	+	+
VVMD7	237	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	257	-	-	-	+	+	-	-	-	-
VVMD27	175	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	181	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	189	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	191	+	+	+	-	-	-	-	-	+
VrZAG62	188	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	194	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	196	-	-	-	-	-	-	-	+	-
VrZAG79	242	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	244	+	+	+	-	-	-	-	-	+
	246	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	250	+	+	+	+	+	-	-	-	+

หมายเหตุ: + = มีแถบ (present)
- = ไม่มีแถบ (absent)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นทำไวน์ที่ปลูกในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค Microsatellite primer

จากการคัดเลือก microsatellite primer ทั้งหมด 35 คู่ มีไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้จำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมขององุ่นทำไวน์ ได้จำนวน 18 คู่ ที่เหมาะสมในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นทำไวน์ เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 18 คู่ ไปทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นทำไวน์ 29 ตัวอย่างพันธุ์ พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอหรืออัลลีล ที่มีความแตกต่างกันทั้งหมดถึง 133 แถบ โดยแต่ละไพรเมอร์ให้อัลลีลแตกต่างกันตั้งแต่ 3-12 แถบ หรืออัลลีลเฉลี่ย 7.4 อัลลีลต่อไพรเมอร์ ได้ข้อมูลพันธุกรรมจากการประเมินครั้งนี้ 522 ข้อมูล

เมื่อนำไปวิเคราะห์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมขององุ่นแต่ละพันธุ์ โดยใช้โปรแกรม UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmatic Average) โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือน similarity matrix และแสดงผลในกราฟแผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) พบว่าสามารถแบ่งพันธุ์องุ่นทำไวน์ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนคือ กลุ่ม A และ B ตามระยะห่างทางพันธุกรรมโดยทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากกว่า 0.9 โดยทั้งสองกลุ่มมีทั้งองุ่นแดงและองุ่นขาวอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

5.1.2 ศึกษาพันธุกรรมขององุ่นทำไวน์ที่ปลูกในประเทศไทยกับต่างประเทศ

จากการศึกษาและสืบค้นข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากฐานข้อมูลต่างประเทศหรือเอกสารวิชาการต่างๆ ของพันธุ์องุ่นที่นิยมนำมาทำไวน์ จำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ องุ่นแดงพันธุ์ Shiraz, Cabernet Sauvignon องุ่นขาวพันธุ์ Chenin Blanc, Colombard และ Tempranillo พบว่า microsatellite primer จำนวน 6 คู่ (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 และ VrZAG79) สามารถจำแนกพันธุ์องุ่นที่ปลูกในประเทศกับต่างประเทศ ได้ข้อมูลอัลลีลหรือแถบดีเอ็นเอขององุ่นทำไวน์ทั้ง 5 พันธุ์ ที่สามารถแยกออกจากพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำไวน์กลุ่มอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือขนาดของอัลลีลของพันธุ์องุ่นที่นิยมทำไวน์ในประเทศไทย มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นจากต่างประเทศ พบว่า องุ่นทั้ง 5 พันธุ์ ที่มีชื่อเดียวและปลูกต่างสถานที่นั้นมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน

สำหรับพันธุ์องุ่นที่นิยมนำมาใช้ทำไวน์ที่ปลูกและมีชื่อเดียวกันในประเทศจาก 2 แหล่งปลูกคือ ไร่องุ่นหัวหินฮิลส์ วินยาร์ด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และไร่องุ่นพีบี วัลเล่ย์ เขาใหญ่ ไวน์เนอรี่ จังหวัดนครราชสีมา จากการประเมินลักษณะพันธุกรรมหรือการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่น เมื่อนำอัลลีลหรือแถบดีเอ็นเอมาเปรียบเทียบโดยใช้ microsatellite primer จำนวน 6 คู่ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ถึงแม้พันธุ์องุ่นนั้นจะมาจากสถานที่ปลูกหรือสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันก็ไม่ผลต่อลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์องุ่น

จึงสรุปได้ว่าองุ่นที่นิยมนำมาทำไวน์ 5 พันธุ์ คือ พันธุ์ Shiraz, Cabernet Sauvignon, Chenin Blanc. Colombard และ Tempranillo มีพันธุกรรมที่เหมือนกันทั้งพันธุ์ที่ปลูกในประเทศและต่างประเทศโดยใช้ microsatellite primer 18 คู่ สามารถนำมาใช้ตรวจสอบและระบุพันธุ์องุ่นไวน์ได้

5.1.3 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุพันธุ์องุ่นในน้ำไวน์

จากการสกัดดีเอ็นเอและเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอของไวน์ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ไวน์จากการเก็บผลผลิตในปี 2013 โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 2 วิธี คือ วิธีแรกเป็นการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit และวิธีที่สองเป็นการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่ถูกพัฒนาขึ้นจากวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบ และนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ไพรเมอร์บริเวณ ribosomal DNA ในช่อง 18S ในการคัดเลือกดีเอ็นเอ พบว่า เมื่อนำผลผลิต PCR มาตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis สามารถตรวจสอบและคัดเลือกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธี ก่อนทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิค microsatellite พบว่า ทั้งสองวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่างวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit และการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB

ดังนั้นดีเอ็นเอที่สกัดได้จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป มาศึกษาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมขององุ่นทำไวน์ด้วยเทคนิค Microsatellite พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยาแสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นสามารถนำมาใช้งานต่อได้

5.1.4 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นที่ระบุในฉลากไวน์

จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอองุ่นในไวน์ที่ระบุในฉลากโดยใช้ microsatellite primer จำนวน 6 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 และ VrZAG79 มาใช้ในการตรวจสอบและระบุพันธุ์องุ่นในน้ำไวน์ ร่วมกับการใช้ด้วยเครื่องวิเคราะห์ทางพันธุกรรมแบบกึ่งอัตโนมัติ (ABI Prism^{TM} 377 DNA Sequencer) จากการวิเคราะห์ พบว่า สามารถตรวจสอบและระบุพันธุ์องุ่นที่มีขนาดของความยาวอัลลีล (alleles) หรือแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันในองุ่นแต่ละพันธุ์ จึง

สามารถแยกความแตกต่างขององุ่นแต่ละพันธุ์ที่นำมาใช้ทำไวน์จากแหล่งผลิตต่างๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้

จากตัวอย่างไวน์ทั้ง 9 ตัวอย่าง พบว่า มีหนึ่งตัวอย่างไวน์ที่มีส่วนผสมขององุ่นแดง 2 พันธุ์ คือพันธุ์ Shiraz กับ Cabernet Sauvignon ในการศึกษาครั้งนี้ ก็ยังสามารถตรวจสอบความแตกต่างขนาดของอัลลีลหรือแถบดีเอ็นเอขององุ่นทั้งสองพันธุ์ที่อยู่ในน้ำไวน์ โดยใช้ microsatellite primer จำนวน 6 คู่ พบว่า สามารถตรวจสอบและจำแนกพันธุ์องุ่นที่นำมาใช้ทำไวน์ได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงสามารถนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพไวน์ได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

(1) จากการวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นโดยใช้เทคนิค microsatellite โดยใช้ไพรเมอร์ 18 คู่ ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่น จำนวน 29 ตัวอย่างพันธุ์ แสดงในรูปแบบของความยาวของอัลลีล จำนวน 522 ข้อมูล ที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ อาจมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอขององุ่นมีรูปแบบ (pattern) ที่คล้ายคลึงกันแต่ถ้าดูประกอบกันหลาย ๆ ไพรเมอร์ร่วมกันก็สามารถแยกและจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมขององุ่นแต่ละพันธุ์ได้มาใช้เป็น พ่อ แม่พันธุ์ ในการปรับปรุงพันธุ์

(2) รวบรวมและสร้างฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นทั้งในประเทศและต่างประเทศ ที่จัดเก็บข้อมูลลักษณะเฉพาะของพันธุ์องุ่นต่างๆ เพื่อใช้ในการสืบค้น เปรียบเทียบความเหมือน หรือความต่างของพันธุ์องุ่นแต่ละสายพันธุ์ ได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และนำไปใช้ประโยชน์สำหรับงานวิจัยในด้านต่างๆ ต่อไป

(3) การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ DNeasy Plant Mini Kit เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และใช้เวลาสกัดไม่มากนัก ส่วนวิธีสกัดดีเอ็นเอแบบวิธี CTAB อาจไม่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ จึงควรปรับหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากองุ่นในน้ำไวน์

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการเกษตร. (2546). **สถิติการปลูกองุ่นรายจังหวัดปีการเพาะปลูก**. ศูนย์สารสนเทศ กรมส่งเสริมการเกษตร.

กรมส่งเสริมการเกษตร. (2548). **สถิติแสดงแหล่งเพาะปลูกปี 2543 - 2547.** ฝ่ายข้อมูลสำหรับการเกษตร กองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กลุ่มเกษตรสัญจร. (2542). **การปลูกองุ่น.** พิมพ์ครั้งที่ 3. นนทบุรี: สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม.

นันทกร บุญเกิด. (2546). **คู่มือการสร้างสวนองุ่น**. พิมพ์ครั้งที่ 3. นครราชสีมา: สมบูรณ์พริ้นติ้ง.

ประดิษฐ์ ครุวัณณา. (2543). **ไวน์สำหรับอุตสาหกรรมในประเทศไทย.** สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรารถนา เผือกวิไล. (2550). **การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้สกุลแวนด้า**. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์).

ปวิณ ปุณศรี. 2504. **องุ่น.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สโมสรพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัฐพล ฉัตรบรรยงค์. (2549). **การตรวจสอบพันธุ์องุ่นโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี**. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์).

รัฐพล ฉัตรบรรยงค์. (2551). **เทคนิคการปลูกองุ่นในเมืองไทย**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์. (2551). **คู่มือการอบรมโครงการฝึกอบรมเพื่อพัฒนาคุณภาพสุราชนิดผลไม้และสุราพื้นบ้านที่มีแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี และผลิตภัณฑ์จากผลผลิตทางการเกษตร**. คณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุชาดา สุขหร่อง. (2548). ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ: หลักฐานทางพันธุกรรมในการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพร. **วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์, 19**(1), 75-86.

สืบศักดิ์ กลิ่นสอน. (2534). **ผลของการหมักพร้อมเปลือกที่มีต่อคุณภาพไวน์แดงและการให้อากาศน้ำองุ่นก่อนหมักที่มีต่อคุณภาพไวน์ขาว**. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์).

สุรีพร เกตุงาม. (2546). เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. **วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 5**(2), 37-59.

สุรศักดิ์ นิลนนท์. (2540). **รายงานการไปสัมมนาต่างประเทศเรื่อง IV International Seminar on Tropical Viticulture and Enology**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุรศักดิ์ นิลนนท์. (2531). **การพัฒนาและงานวิจัยการปลูกองุ่นทำไวน์ในประเทศไทย** จากเอกสารการสัมมนาเรื่อง ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการปลูกองุ่นและการผลิตไวน์ จัดโดยกรมสรรพสามิต และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วันที่ 28 ตุลาคม 2531 ณ ห้องบลูรูม 1 และ 2 โรงแรมรามาการ์เดน ถนนวิภาวดีรังสิต. กรุงเทพฯ.

สุรศักดิ์ นิลนนท์. (2547). **เทคโนโลยีการผลิตองุ่นเพื่อรับประทานสด.** เอกสารประกอบการฝึกอบรม สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรศักดิ์ นิลนนท์ และ จรัล เห็นพิทักษ์. (2548). **มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กับการวิจัยและพัฒนาองุ่นในประเทศไทย.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2549). ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าเกษตรกรรม พ.ศ.2547 - 2548. ส่วนวิจัยเศรษฐกิจพืชสวน สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ และ ณัฐหทัย เอพาณิช. (2458). **การวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวไทย**. หนังสือรายงานผลงานวิจัยประจำปี 2548 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. น. 1-27.

อรรัตน์ มงคลพร. (2548). **เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์.

Agrawal, G.K., R.N. Pandey & V.P. Agrawal. (1992). **Isolation of DNA from *Choerospondias asillari***. Biotech. Biodiv. Lett. 2: 19-24.

Amerine, M.A., H.W. Berg, R.E. Kunkee, C.S. Ough, V.L. Singleton & A.D. Webb. (1980). **The Technology of Wine Making**, 4th ed. Westport, Connecticut: AVI Publishing Company.

Anonymous. (1997). **GeneScan Reference Guid Chemistry Reference for The ABI Prism™ 377 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems**. Division of perkin-Elmer. International Union of Pure and Applied Chemistry. pp 1-33.

Arroyo-Garca, R., F. Lefort, M.T. Andres, J. Ibanez, J. Borrego & F. Cabello. (2002). **Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species**. Genome. 45: 1142-1149.

Baleiras-Couto, M.M. & J.E. Eiras-Dias. (2006). **Detection and identification of grape varieties in must and wine using nuclear and chloroplast microsatellite markers**. Analytica Chimica Acta. 563: 283-291.

Barysheva, I., T. Verbitskaya & Y. Sivolap. (1995). **RAPD - analysis of different genotypes of grape**. Plant Genome III Conference**.** San Diago, CA.

Bonnet, P. & J. Barbe. (2009-2011). **PlantGrape**, le catalogue des vignes cultivees en France, © UMT Geno-Vigne®, INRA – IFV – Montpellier SupAgro. Retrieved from http://plantgrape. plantnet-project.org/cepage/Colombard%20B

Botta, R., N.S. Scott, I. Eynard & M.R. Thomas. (1995). **Evaluation of microsatellite sequence -tagged site markers for characterizing *vitis vinifera* cultivars**. *Vitis*. 34: 99-102.

Bowers, J.E., B. Bandman & C.P. Meredith. (1993). **DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars**. American Journal of Enology and Viticulture. 44(3): 266-274. CABI. Accession no. 941602626

Bowers, J.E. & C.P. Meredith. (1996). **Genetic similarities among wine grape cultivars revealed by restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis**. Journal of the American Society for Horticultural Science. 121(4): 620-624

Bowers, J.E., G.S. Dangl, R. Vignani & C.P. Meredith. (1996). **Isolationand characterization of new polymorphic simple sequence repeatloci in grape (*Vitis vinifera* L.)**. Genome. 39: 628-633.

Bowers, J., G. Dangl & C. Meredith. (1999). **Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape**. American Journal of Enology and Viticulture. 50: 243-246.

Cervera, M.T., J.A. Cabezas, J.C. Sancha, T.F. Matinez & J.M. Martinez-Zapater. (1998). **Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources, a case study with accessions form Rioja (Spain)**. Theoretical and Applied Genetics. 97: 51-59.

Chadha, K.L. & S.D. Shikhamany. (1999). **The Grape Improvement, Production and Post-harvest Management**. Malhotra Publishing House, New Delhi, India.

Chung, S. & J. Staub. (2003). **The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa**. Theoretical and Applied Genetics**.** 107: 757-767.

Cuisset, C., J.M. Boursiquot & P. This. (1995). **Genetic diversity in grapevine (*Vitis vinifera*) assessed by microsatellite makers**. P44. Plant Genome IV Conference. San Diago, CA.

Doulaty, B.H., S.A. Mohammadi, M. Labra, A. Nazemieh, F.D. Mattia & M. Mardi. (2007). **Chloroplast Microsatellite Marker to Assess Genetic Diversity in Wild and Cultivated of Iran**. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10(11): 1855-1859.

Dzhambazova, T., I. Tsvetkov, I. Atanassov, K. Rusanov, J.M. Zapater, A. Atanassov & T. Hvarleva. (2009). **Genetic diversity in native Bulgarian grapevine germplasm (*Viti vinifera* L.) based on nuclear and chloroplast microsatellite polymorphisms**. *Vitis*. 48(3): 115-121.

Frei, A., N.A. Porret, J.E. Frey & J. Gafner. (2006). **Identification and charaterization of Swiss grapevine cultivars using microsatellite marker**. Mitteilungen Klosterneuburg. 56: 147-156.

Garcia-Beneytez, E., M.V. Moreno-Arribas, J. Borrego, M.C. Polo & J. Ibanez. (2002). **Application of a DNA Analysis Method for the Cultivar Identification of Grape Musts and Experimental and Commercial Wines of Vitis vinifera L. Using Microsatellite Markers.** Journal of Agricultural and Food Chemistry . 50(21): 6090-6096.

Ghetea, L.G., R.M. Motoc, C.F. Popescu, N. Barbacar, D. Iancu, C. Constantinescu & L.E. Barbarii. (2010). **Genetic profiling of nine grapevine cultivars from Romania, based on SSR markers**. Romanian Biotechnological Letters. 15(1): 116-124.

Gonzalez-Andres, F., J. P. Martin, J. Yuste, J. A. Rubio, C. Arranz & J. M. Ortiz. (2007). **Identification and molecular biodiversity of autochthonous grapevine cultivars in the 'Comarca del Bierzo', Leon, Spain**. *Vitis*. 46 (2): 71–76.

Harta, M., D. Pamfil, R. Pop & S.Vicas. (2011). **DNA Fingerprinting Used for Testing Some Romanian Wine Varieties**. Bulletin UASVM Horticulture. 68(1): 143-148.

Huang, H., J. Lu, Z. Ren, W. Hunter, E. Dowd & P. Dang. (2010). **Mining and validating grape (*Vitis* L.) ESTs to develop EST-SSR markers for genotyping and mapping**. Molecular Breeding. 28(2): 241-254.

Imazio, S., M. Labra, F. Grassi, A. Scienza & O. Failla. (2006). **Chloroplast microsatellites to investigate the origin of grapevine**. Genetic Resources and Crop Evolution. 53: 1003-1011.

Kuzoff, R.K., J.A. Sweere, D.E. Soltis, P.S. Soltis & E.A. Zimmer. (1998). **The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants**. Molecular Biology and Evolution. 15: 251-63.

Lamboy, W.F. & C.G. Alpha. (1998). **Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis* L.) species**. Journal of the American Society for Horticultural Science. 123: 182-188.

Laucou, V., J. M. Boursiquot, T. Lacombe, L. Bordenave, S. Decroocq & N. Ollat. (2008). **Parentage of grapevine rootstock 'Fercal' finally elucidated**. *Vitis*. 47 (3): 163–167.

Leao, P.C. de S. (2008). Recursos geneticos de videira (Vitis spp.): **analise da diversid e caracterizacao da colecao de germoplasma da emebrapa semi-arido**. Ph.D. Thesis. (The Universidad Federal de Vicosa, Brasil).

Martinez De Toda, F., J. Ibanez & P. Balda. (2012). **Genetic and ampelographic identification of different grape varieties known as 'Tempranillo' in Rioja (Spain)**. *Vitis*. 51 (1): 39-40.

Martin, J. P., C. Arranz, I. D. Castro, J. Yuste, J. A. Rubio, O. Pinto-Carnide & J. M. Ortiz. (2011). **Prospection and identification of grapevine varieties cultivated in north Portugal and northwest Spain**. *Vitis*. 50 (1): 29–33.

Moreno, S., Y. Gogorcena & J.M. Ortiz. (1995). **The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.)**. Scientia Horticulturae. 62: 237-243.

Morgante, M & A.M. Olivieri. (1993). **PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics**. The plant journal. 3: 175-182.

Narvaez, C.R., J.B. Valenzuela, C.S. Munoz & P.R. Hinrichsen. (2000). **Comparison of RAPD and AFLP as methods for genetic identification on *Vitis* based on the analysis of anonymous genomic sequences**. Agricultura Tecnica (Chile). 60(4): 320-340.

Nilnond. S. (2001). **Grape production in Thailand**. *In* M.K. Papademetriou and F.J. Dent, eds. Grape production in the Asia-Pacific Region. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand. pp. 70-79.

Paetkau, D., W. Calvert, I. Stirling & C. Strobeck. (1995). **Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears**. Molecular Ecology. 4: 347-354

Savazzini, F. & L. Martinelli. (2006). DNA analysis in wines: **Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification**. Analytica Chimica Acta. 563: 274-282.

Sefc, K.M., H. Steinkellner, J. Glossl, S. Kampfr & F. Regner. (1998). **Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis**. Theoretical and Applied Genetics. 97: 227-231.

Sefc, K.M., F.Regner, E. Turetschek, J. Glossl & H. Steinkellner. (1999)**. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species**. Genome. 42: 367-373.

Sefc, K.M., M.S. Lopes, F. Lefort, R. Botta, K.A. Roubelakis-Angelakis, J. Ibanez, I. Pejic, H.W. Wagner, J. Glossl & H. Steinkellner. (2000). **Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars**. Theoretical and Applied Genetics. 100: 498-505.

Sefc, K.M., F. Lefort, M.S. Grando, K.D. Scott, H. Steinkellner & M.R. Thomas. (2001). **Microsatellite markers for grapevine: a state of the Art**. *In* K.A. Roubelakis-Angelakis, ed. Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 433-463.

Scott, K.D., E.M. Abblet, L.S. Lee & R.J. Henry. (2000). **AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape**. Euphytica. 113(3): 245-249.

Siret, R., J.M Boursiquot, M.H. Merle, J.C. Cabanis, P. This & J. Agric. (2000). **Toward the Authentication of Varietal Wines by the Analysis of Grape (*Vitis vinifera* L.) Residual DNA in Must and Wine Using Microsatellite Markers**. Food Chemistry. 48: 5035-5040.

Stover, E., M. Aradhya, J. Yang, J. Bautista & G.S. Dangl. (2009). **Investigations into the Origin of 'Norton' Grape using SSR Markers**. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. 122:19-24.

This, P., A. Jung, P. Boccacci, J. Borrego, R. Botta, L. Costantini, M. Crespan, GS. Dangl, C. Eisenheld, F. Ferreira-Monteiro, S. Grando, J. Ibanez, T. Lacombe, V. Laucou, R. Magalhaes, C.P. Meredith, N. Milani, E. Peterlunger, F. Regner, L. Zulini & E. Maul. (2004). **Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification Of grape cultivars**. Theoretical and Applied Genetics. 109: 1448-1458.

Thomas, M.R., S. Matsumoto, P. Cain & N.S. Scott. (1993). **Repetitive DNA of grapvine: classes present and sequences suitable for cultivar identification**. Theoretical and Applied Genetics. 86: 173-180.

Thomas, M.R. & N.S. Scott. (1993). **Microsatellite repeats in grapevine revcal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSs)**. Theoretical and Applied Genetics. 86: 985-990.

Thomas, M.R., P. Cain & N.S. Scott. (1994). **DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivarsand evaluating genetic relatedness**. Plant Molecular Biology. 25: 939-949.

Topfer, R. & M. Erika. (2007). **Vitis International Variety Catalogue (VIVC)**. Retrieved from http://www.vivc.de/

Ulanovsky, S., Y. Gogorcena, F. Martinez de Toda & J.M. Ortiz. (2002). **Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (*Vitis vinifera* L.)**. Scientia Horticulturae. 92: 241-254.

Veloso, M.M., M.C.Almandanim, M. Baleiras-Couto, H.S. Pereira, L.C. Carneiro, P. Fevereiro & J. Eiras-Dias. (2010). **Microsatellite database of grapevine (*vitis vinifera* L.) cultivars used for wine production in Portugal**. *Vitis*. 25 (2): 53-62.

Vouillamoz, J.F., F. Andrea & A. Claire. (2006). **Swiss Vitis Microsatellite Database (SVMD)**. Retrieved from http://www1.unine.ch/svmd/

Wang, Y., J. Chen, J. Lu & O. Lamikanra. (1999). **Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vitis* species and Florida bunch grapes**. Scientia Horticulturae. 82: 85-94

Weising, K. & R. Gardner. (1999). **A set of concerved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms**. Genome. 42: 9-19.

Ye, G.N., G. Soylemezoglu, N.F. Weeden, W.F. Lamboy, R.M. Pool & B.I. Reisch. (1998). **Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting**. *Vitis*. 37: 33-38. CABI. Accession no. 981607791.

Zulini, I., E. Fabro & E. Peterlunger. (2003). **Genetic analysis of the grapevine cultivar 'Picolit' based on microsatellite and AFLP markers**. Acta Horticulturae. 603: 467-472. CABI. Accession no. 20043006272.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีเตรียมสารเคมี

1. TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)

2M Tris-HCl (pH 8.0)	500	ไมโครลิตร
0.5M EDTA (pH 8.0)	200	ไมโครลิตร

เตรียมโดยผสมสารต่างๆ ในหลอดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2. 1X TBE buffer

บัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ในรูปที่มีความเข้มข้น 10 เท่า (10X) เพื่อเตรียม 1X TBE buffer โดยเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ลงใน 10X TBE buffer จำนวน 100 มิลลิลิตร

การเตรียม 10X TBE buffer (89 mM Tris-OH, 89 mM boric acid, 2.5 mM EDTA)

Tris base	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
Na_2EDTA	93	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

3. Washing solution

NH_4OAc	0.077	กรัม
Absolute ethanol	70	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

4. Chloroform : Isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 : 1

Chloroform	240	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	10	มิลลิลิตร

หมายเหตุ : เก็บไว้ในขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิห้อง ขั้นการเตรียมจะต้องสวมถุงมือ และเตรียมในตู้ดูดอากาศ เนื่องจาก Chloroform เป็นสารที่มีกลิ่น และเป็นอันตราย

5. 2X CTAB

NaCl	81.82	กรัม
CTAB (hexadecyltrimetyl ammonium bromide)	10	กรัม
0.5M EDTA pH 8.0	40	มิลลิลิตร
1M Tris-HCl pH 8.0	50	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 500 มิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายอลงกรณ์ ศรีพลแท่น
วัน เดือน ปี	17 มิถุนายน 2527
ที่อยู่	92 หมู่ 6 ตำบลบ้านหัน อำเภอโนนศิลา จังหวัดขอนแก่น 40110
การศึกษา	ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์-พืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ พ.ศ. 2549
ประสบการณ์การทำงาน	นักวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผลงานทางวิชาการ	ได้ตีพิมพ์เรื่อง Application of Microsatellite Markers for Identification of Wine Grape Varieties in Thailand ลงในวารสารวิจัย มข. ปีที่ 21 ฉบับที่ 1 ประจาเดือน มกราคม – มีนาคม 2559
เบอร์โทร	0944865299
อีเมล์	Along_korn2008@hotmail.com