รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชุดโครงการวิจัย
การวิจัยและพัฒนาหมากจองเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้ชุมชน

โครงการวิจัยย่อยที่ 4
การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของหมากจองเพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดี

(Studies of genetic diversity of *Scaphium affine* (Mast.) Pierre
for selection of superior traits)

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.ณิชารัตน์ สวาสดิพันธ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
2. ผศ.ดร.อรัญญา พิมพ์มงคล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
3. นางวาริณี พละสาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

ผู้อำนวยการชุดโครงการ

ผศ.ดร.อรัญญา พิมพ์มงคล
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณ
ประจำปีงบประมาณ 2548 – 2549

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**
บทคัดย่อ 177
บทที่ 1 บทนำ 179
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 180
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 186
บทที่ 4 ผลการวิจัย 189
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย 200
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย 202
เอกสารอ้างอิง 203
ภาคผนวก 206
  ภาคผนวก ก สารเคมีและการเตรียมสารเคมี 207
  ภาคผนวก ข รูปแบบของ Genomic DNA 211
  ภาคผนวก ค รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD 213
  ภาคผนวก ง จำนวนและตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นแต่ละไพรเมอร์ในทุกตัวอย่างของหมากจอง 228

บทคัดย่อ

หมากจอง (*Scaphium affine* (Mast.) Pierre) พบกระจายในป่าเขตร้อนชื้นของประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน วุ้นจากเมล็ดใช้ประกอบเป็นอาหาร และเป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ มีการเก็บเมล็ดเพื่อการค้าในปริมาณมาก และพบว่าหมากจองมีการกระจายตัวเฉพาะในบางส่วนของประเทศไทย ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมากจองในพื้นที่ทั่วประเทศ และประเทศข้างเคียง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของหมากจองในแต่ละท้องที่ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการคัดเลือกพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ และการอนุรักษ์ โดยได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมากจอง ด้วยเทคนิค Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) คัดเลือกใช้ไพรเมอร์ 9 ชนิด (A02, A03, A08, A09, A13, B01, C06 และ H07) พบว่าให้ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 81 แถบ และหมากจองจาก จังหวัดจันทบุรี มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำที่สุด จากนั้นเมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาหาค่าดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index, S) และค่าระยะทางพันธุกรรม (genetic distance, D) แล้วนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ประชากรตามวิธี UPGMA พบว่าสามารถแบ่งหมากจองเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย ตัวอย่างหมากจองที่เก็บจาก จังหวัดอุบลราชธานี จันทบุรี กาญจนบุรี และประเทศลาว และกลุ่มที่ 2 คือ ตัวอย่างหมากจองที่เก็บจากประเทศมาเลเซีย

Abstract

Makjong (*Scaphium affine* (Mast.) Pierre) distributes in the tropical rain forest of Thailand and neighboring counties. Gel form seed coat can be used for food and traditional medicinal purposes and thus has high economic value. Makjong seeds were collected for exporting in mass volume. It distributes in some parts of Thailand forest; therefore, the purpose of this research was to study of genetic diversity of Makjong. This investigation would be used for breeding selection and conservation goals in the future. The genetic diversity of Makjong was studied by RAPD technique. DNA profiles using 9 RAPD primers (A02, A03, A08, A09, A13, B01, C06 and H07), produced 81 DNA fragments. Makjong from Chantaburi province had the lowest polymorphism. The value of similarity index (S) and genetic distance (D) were calculated. The dendrogram constructed by UPGMA divided Makjong populations into two groups. The first group was consisted of Makjong from Ubon Ratchathani, Chantaburi, Kanchanaburi province and Lao people’s democratic republic. The second group contained Makjong from Malaysia.

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หมากจอง (*Scaphium affine* (Mast.) Pierre) เป็นพืชในวงศ์ Sterculiaceae (เต็ม, 2523) กระจายตัวอยู่ในป่าที่ลุ่มต่ำของประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น พม่า กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (สปป. ลาว) รวมถึงประเทศไทย ในพื้นที่ป่าของประเทศไทยที่พบต้นหมากจองจำนวนมาก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี จังหวัดตราด และจังหวัดอุบลราชธานี หมากจองจัดเป็นไม้หวงห้ามประเภท ข[1] เปลือกหุ้มเมล็ดที่มีลักษณะเป็นวุ้นนำมาใช้ประกอบอาหารคาว หวาน ใช้ผลิตเป็นเครื่องดื่มบรรจุกระป๋องประเภทต่างๆ และสามารถนำมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคได้หลายอย่าง เช่น รักษาโรคหอบหืด โรคบิด ลำไส้อักเสบ แก้ร้อนในแก้กระหาย แก้ไอ ขับเสมหะ เมื่อวุ้นล้างสะอาดสามารถนำมาพอกตารักษาอาการตาอักเสบบวมแดงได้ และนอกจากนี้ราคาเมล็ดหมากจองแห้งค่อนข้างสูง ตลาดต้องการในปริมาณมาก แต่พบว่าการกระจายตัวของต้นหมากจองพบเฉพาะบางพื้นที่ของประเทศไทย ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมากจองในพื้นที่ทั่วประเทศ และประเทศข้างเคียง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของหมากจองในแต่ละท้องที่และเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการคัดเลือกพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ และการอนุรักษ์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมากจองที่แพร่กระจายทั่วประเทศและประเทศข้างเคียง(ในพื้นที่ทั่วประเทศ ที่สามารถพบหมากจอง เช่น จ. อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ.กาญจนบุรี ประเทศสาธารณรัฐประชาชนลาวและประเทศมาเลเซีย)

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของหมากจองในแต่ละท้องที่ ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดเลือกพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ และการอนุรักษ์พันธุ์

---

[1] ไม้ประเภท ข คือไม้หวงห้ามพิเศษหรือไม้หายากใกล้จะสูญพันธุ์ ห้ามทำไม้ก่อนได้รับอนุญาตโดยเด็ดขาดหรือได้รับอนุญาตเป็นกรณีพิเศษจากรัฐมนตรีก่อนเท่านั้น

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานของหมากจอง

การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของพืช อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยา รวมถึงอาศัยข้อมูลระดับโมเลกุลช่วยในการจัดจำแนก หมากจองมีลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom : Plantae
  Division : Magnoliophyta
    Class : Angiospermae
      Subclass : Dicotyledoneae
        Order : Malvales
        Family : Sterculiaceae
          Genus : *Scaphium*
            Species : *Scaphium affine*

Scientific name : *Scaphium affine* (Mast.) Pierre

Common name : Malva nut

หมากจองเป็นพืชในวงศ์ Sterculiaceae ซึ่งพืชในวงศ์นี้มีประมาณ 50 สกุล ในประเทศไทยพบประมาณ 16 สกุล โดยเป็นไม้หวงห้ามประเภท ก. ก็คือสกุล *Sterculia*, *Firmiana*, *Heritiera*, *Pterygota*, *Pterospermum* (*P. diversifolium* B1 : ลำป้าง, *P. acerifolium* Wild. : กระหนานปลิง), *Pterocymbium* (*P. javanicum* R.Br. : สำรองหนูหรือปออีเก้ง) และที่เป็นไม้หวงห้ามประเภท ข. คือ สกุล *Scaphium* (*S. macropodum* Beaum.) (เต็ม, 2523) ปัจจุบันมีการปรับเปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์ของหมากจองให้ถูกต้องเป็น *Scaphium affine* (Mast.) Pierre

Scaphium affine (Mast.) Pierre มีชื่อพื้นเมืองเรียกต่างๆ กันไปตามบริเวณที่พบ เช่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียก หมากจองหรือบักจอง ส่วนบริเวณภาคกลางตะวันออกและภาคใต้ เรียก สำรอง หรือ พุงทะลาย

2.2 การกระจายตัวของหมากจอง

หมากจอง พบกระจายตัวตามบริเวณป่าดงดิบและป่าพื้นราบ ของพื้นที่ที่เป็นป่าเขตร้อน หรือกึ่งเขตร้อน ของประเทศแถบเอเซียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น พม่า เวียดนาม กัมพูชา อินโดนีเซีย ฟิลลิปปินส์ มาเลเซีย ลาว รวมถึงประเทศไทย (Dallwitz, Paine and Zurcher, 1993; Dallwitz, 1980) จะพบมากในป่าบางจังหวัดของไทย เช่น จันทบุรี ตราด ระยอง กาญจนบุรี ยะลา นราธิวาส และ อุบลราชธานี

2.3 การใช้ประโยชน์และผลิตภัณฑ์จากหมากจอง

หมากจองใช้เป็นอาหารคาวและหวานโดยการนำผลหมากจองไปแช่น้ำ เปลือกที่หุ้มเมล็ดจะพองออกมีลักษณะคล้ายวุ้น นำไปทำเป็นอาหารจำพวกลาบ ป่นอีสาน แกงจืด (แทนสาหร่ายทะเล) หรือเติมน้ำเชื่อมใช้รับประทานเป็นของหวาน วุ้นของหมากจองยังมีสรรพคุณเป็นพืชสมุนไพร เมื่อใช้

วุ้นหมากจอง ปรุงกับน้ำตาลทรายแดง หรือชะเอมเทศ รับประทานแก้ร้อนในกระหายน้ำ แก้ไข้ แก้ไอ แก้เจ็บคอ ขับเสมหะ และยังช่วยรักษาโรคหอบหืด แก้ท้องเดินและลดอาการอักเสบ ส่วนวุ้นใสใช้พอกตาแก้อักเสบบวมแดงได้

หมากจอง กำลังจะกลายเป็นพืชเศรษฐกิจในหลายภูมิภาค เนื่องจากมีความต้องการผลแห้งของหมากจองในปริมาณมาก เพื่อส่งออกไปขายในต่างประเทศ เช่น ประเทศจีน ฮ่องกง ไต้หวัน และประเทศแถบตะวันออกกลาง และในขณะนี้ได้มีการนำวุ้นหมากจองมาทำผลิตภัณฑ์ ต่างๆ เช่น น้ำหมากจองบรรจุกระป๋อง หรือนำวุ้นหมากจองมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์คล้ายรังนก ฯลฯ ซึ่งเป็นสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ที่สำคัญที่สร้างรายได้ให้กับชุมชน เช่น กลุ่มแม่บ้าน ในพื้นที อ. นาจะหลวย จ. อุบลราชธานี และ อ. สอยดาว จ. จันทบุรี (ภาพที่ 2.2)

ภาพที่ 2.1 น้ำสำรอง ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากหมากจอง

2.4 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในพืช

การศึกษาทางความหลากหลายและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต สามารถเลือกใช้เทคนิคต่างๆได้ 2 เทคนิคหลัก คือ 1) เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) ซึ่งต้องอาศัยความเชี่ยวชาญในการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกของสิ่งมีชีวิต และลักษณะบางอย่างที่มีลักษณะภายนอกเหมือนกันอาจมีวิวัฒนามาจากต้นกำเนิดต่างกัน 2) เครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular marker) แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ การใช้โปรตีนเป็นเครื่องหมาย เช่น isozyme marker หรือ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมาย (DNA marker) หลักการของเครื่องหมายระดับโมเลกุลมีโดยย่อดังนี้

2.4.1 Protein marker

การใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีนในการตรวจสอบสิ่งมีชีวิต โดยใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส และย้อมสีดูแถบของโปรตีนจำเพาะบางครั้งเรียกเทคนิคนี้ว่า isozyme marker เนื่องจากอาศัยความแตกต่างของรูปแบบของโมเลกุลของเอนไซม์ การตรวจสอบโปรตีน สามารถตรวจสอบได้หลายตำแหน่ง วิธีนี้มีข้อดีคือช่วยแยกความแตกต่างของการแสดงออกแบบ co-dominant แต่จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังไม่มากนัก และถ้าไม่มีความแตกต่างของโปรตีนหรือรูปแบบของเอ็นไซม์ก็จะไม่สามารถแยกสิ่งมีชีวิตออกจากกันได้ ข้อด้อยคือโปรตีนและไอโซไซม์เสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัดและไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้นาน

2.4.2 DNA marker

การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้หลายวิธี เช่นโดยการหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) รวมถึงวิธีการตรวจสอบดีเอ็นเอ โดยการเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เทคนิคที่นิยมทั่วไปมีรายละเอียดดังนี้

2.4.2.1 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) เป็นการตรวจสอบความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) สิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์หรือต่างชนิดกัน ย่อมมีลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ เปลี่ยนไป ดังนั้นทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะมีขนาดแตกต่างกัน (polymorphism) การตรวจสอบ polymorphism สามารถทำได้โดยอาศัยหลักการเข้าคู่ (hybridization) ของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมระหว่างเอ็นไซม์ตรวจสอบกับชิ้นดีเอ็นเอพืชที่ต้องการตรวจสอบหลังจากตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเหล่านั้น ทำให้สามารถตรวจหาความแตกต่างสายพันธุ์ได้ โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ มาแยกด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส ย้ายแถบดีเอ็นเอจากเจลอิเลคโทรโฟรีซิสไปยังแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ แล้วทำการไฮบริไดซ์กับโพรบ (probe) เพื่อหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ หรือที่เรียกว่าเทคนิค Southern blot hybridization

2.4.2.2 Variable number of tandem repeats (VNTR) หรือ minisatellite เป็นการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยอาศัยดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำ ขนาดสั้น (ประมาณ 15-100 คู่เบส) จำนวนชุดซ้ำที่พบแตกต่างกันมาก ทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ มาแยกด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส ย้ายแถบดีเอ็นเอจากเจลอิเลคโทรโฟรีซิสไปยังแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ทำการตรวจสอบโดยวิธีไฮบริไดเซชัน (Jeffreys *et al*., 1985)

2.4.2.3 Simple sequence repeats (SSR) หรือ microsatellite เป็นการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยอาศัยดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำขนาดสั้นมาก (ประมาณ 1-4 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส) มีตำแหน่งกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม นำมาเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอบริเวณนี้ด้วยเทคนิค PCR แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยการทำอิเลคโทรโฟรีซิส

2.4.2.4 Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) เป็นการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ตามหลักของ PCR โดยใช้ primer ที่มีลำดับเบสประมาณ 10 เบสเพียงชนิดเดียวในการเพิ่มปริมาณ แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ ด้วยการทำอิเลคโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล (Agarose Gel Electrophoresis) และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) (William *et al*., 1990)

ในพืชมีการประยุกต์ใช้ RAPD โดยอาศัยหลักการว่าพืชแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้น เมื่อนำมาตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer ที่มีลำดับเบสโดยสุ่ม (random primer) นั้นถ้า primer มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอของพืชที่นำมาตรวจสอบก็จะเกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอต้นแบบขึ้น เนื่องจาก PCR นั้นใช้ random primer ดังนั้น primer เหล่านี้จึงสามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอของพืชโดยสุ่มได้หลายตำแหน่ง หากการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสมก็จะทำให้เกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอของพืชนั้นๆ ถ้าสายพันธุ์พืชตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบมีความแตกต่างของสารพันธุกรรมหรือเป็นคนละชนิดกันความสามารถในการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะแตกต่างกัน ทำให้ได้จำนวนและชิ้นของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน และสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในการบ่งบอกชนิดของสายพันธุ์ (cultivar identification)ได้ ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ เป็นเทคนิคที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว รวมถึงค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำ แต่มีข้อจำกัด คือ RAPD marker เป็น dominant marker จึงไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพวกที่เป็น homozygous และ heterozygous และมีปัญหาเรื่องการทำซ้ำ (reproducibility) แล้วให้ผลไม่เหมือนเดิม

2.4.2.5 DNA amplification fingerprint (DAF) เป็นการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ โดยใช้ primer เพียงชนิดเดียว คล้ายกับ primer ของ RAPD แต่มีขนาดสั้นกว่าเล็กน้อย โดยมีลำดับเบสประมาณ 5-8 เบส และสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR จะมี annealing temperature สูงกว่า ทำให้แก้ปัญหาเรื่อง reproducibility ได้ส่วนหนึ่ง แล้วจึงแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการทำอิเลคโทรโฟรีในโพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrylamide gel electrophoresis) แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) จึงมี resolution สูงกว่าในอะกาโรสเจล และแยก marker ได้มากกว่า (Caetno-Anolles *et al*., 1991)

2.4.2.6 Amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคที่รวมความน่าเชื่อถือของเทคนิค RFLP และประสิทธิภาพของปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองของตัว (PCR) เข้าด้วยกัน เนื่องจากใช้หลักการตรวจสอบความแตกต่างของชิ้น DNA ที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้สารกัมมันตรังสี (radioactive) หรือสารเรืองแสง (fluorescent) ในการติดฉลาก primer แล้วจึงตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยการทำอิเลคโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel

หลักการของ AFLP คือ สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตจะถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ที่มีตำแหน่งจดจำแตกต่างกัน ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะถูกต่อเข้ากับชิ้นดีเอ็นเอ ที่ทราบรหัส (adaptor) 2 ชนิด จากนั้นหากมีการเข้าคู่ที่เฉพาะเจาะจงระหว่างชิ้นดีเอ็นเอ รหัสเริ่มต้นจำลองตัว (primer) กับ adapter และเบสคัดเลือก (N) ในชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย จะทำให้ชิ้นดีเอ็นเอ เหล่านั้นเพิ่มปริมาณได้ เรียกขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะนี้ว่า selective amplification (Vos *et al*., 1995) ต่อจากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอ (PCR product) มาแยกด้วย denaturing polyacrylamide gel แบบเดียวกับที่ใช้ในการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอ (DNA profile) ที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ AFLP primer คู่หนึ่งๆ นี้เรียกว่า AFLP fingerprint

วิธีที่กล่าวมาเป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ แต่มีข้อดีและข้อจำกัดต่างกัน จึงควรเลือกเทคนิคให้เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาและวัตถุประสงค์ของงาน

2.4.3 กรณีศึกษาตัวอย่างของพืชที่อาศัยการประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล

2.4.3.1 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในมะละกอ

มะละกอ (*Carica papaya*) จัดอยู่ในวงศ์ *Caricaceae* ในสกุล *Carica* ประกอบด้วย 21 ชนิด บางชนิดเป็นไม้ผล หรือบางชนิดมีประโยชน์ทางด้านสมุนไพร มะละกอมีผลผลิตรวมทั่วโลกในปี 2000 ประมาณ 5,000,000 ตัน ถือว่าเป็นอุตสาหกรรมขนาดเล็กเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ ในภูมิภาคเขตร้อน อย่างไรก็ตามมะละกอเป็นหนึ่งในตัวอย่างหลักในการเริ่มการศึกษาทางเทคโนโลยีชีวภาพของพืชเขตร้อน

ในกระบวนการผลิตมะละกอเพื่อการค้า มีปัญหาหลายอย่างที่พบ ตัวอย่างเช่น ลักษณะด้อยคุณภาพ ปริมาณน้ำตาลต่ำ และปัญหาโรคพืชหลายชนิด โดยเฉพาะโรคจุดด่างของไวรัสชนิด P (PRSV-P) (Manshardt, 1992, Jobin Decor *et al*., 1997, Magdalita *et al*., 1997) มีการศึกษาวิจัยเพื่อควบคุมปัญหานี้ โดยการนำยีนที่มีประโยชน์ เช่น ยีนต้านทานไวรัสชนิด PRSV-P จากพืชชนิดอื่นในสกุล *Carica* มาทำการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้าม (Sharon *et al*., 1992) ส่วนการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์มะละกอโดยอาศัยเครื่องหมายทางโมเลกุล มี

การใช้เทคนิค VNTR และ SSR probe (Sharon *et al*., 1992) isozymes และ RAPDs (Jobin Decor *et al*., 1997, Stiles *et al*., 1993) โดยทำการแบ่งแยกและกำหนดความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชในสกุล *Carica* รวมทั้งระหว่างสายพันธุ์มะละกอที่ใช้ในการเพาะปลูก พบว่ามะละกอสายพันธุ์ที่ใช้ในการเพาะปลูกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับต่ำ (Stiles *et al*., 1993) ในทำนองเดียวกัน เทคนิคเหล่านี้ยังนำมาใช้ในการตรวจหาความเป็นไปได้ในการผลิตลูกผสม นอกจากนี้ RAPD marker ถูกนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างของ *C. papaya* และ *C. cauliflora* รวมทั้งการประเมินและตรวจหาลูกผสมด้วย (Magdalita *et al*., 1997, Magdalita *et al*., 1998) ทั้ง RAPD และ DAF ถูกนำมาใช้ตรวจแยกเพศของมะละกอ (Sondur *et al*., 1996, Somsri *et al*., 1998) ตำแหน่งของยีนที่ใช้ในการแยกเพศนี้ ถูกระบุอยู่บนแผนที่ยีนแบบง่าย ซึ่งมีการพัฒนามาจาก RAPD marker (Sondur *et al*., 1996)

2.4.3.2 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในกล้วย

กล้วย (*Musa* spp.L.) จัดอยู่ในวงศ์ Musaceae ประกอบด้วย 2 สกุล (genus) คือ *Ensete* และ *Musa* สกุล *Musa* นี้ประกอบด้วย 25 – 35 ชนิด กล้วยเป็นหนึ่งในพืชผลหลักของภูมิภาคเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ผลผลิตรวมทั่วโลกประมาณ 60,000,000 ตันในปี 2000 (FAOSTAT, 2001) แต่กระนั้นการปรับปรุงพันธุ์ในกล้วยยังมีน้อย อุตสาหกรรมเกี่ยวกับการผลิตกล้วยอยู่ในภาวะอันตรายเนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นของแมลงศัตรูพืชและการพัฒนาของโรคพืช ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการปลูกกล้วยที่ต้านทานต่อโรค (Faure *et al*., 1993, Vuylsteke *et al*., 1998) อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงพันธุกรรมของกล้วยเป็นเรื่องที่ยุ่งยาก เนื่องจากข้อจำกัดของความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Smith *et al*., 1998, Vuylsteke *et al*., 1998)

การนำเทคนิค Isozyme RFLP และ RAPD marker มาใช้ในการพัฒนาแผนที่เชื่อมโมเลกุล (molecular linkage map) ของ *M. acuminata* (Faure *et al*., 1993) และมีการพัฒนา RAPD marker สำหรับการตรวจหาลักษณะพันธุ์แคระที่ผิดปกติที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกล้วย ก่อนที่จะนำไปเพาะปลูกจริงต่อมาได้มีการพัฒนาไปเป็น SCAR marker (Damasco et al., 1996, Damasco et al., 1998)

2.4.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมากจอง

สำหรับการศึกษาทางด้านสายพันธุกรรมของหมากจองและพืชใกล้เคียงมีดังนี้ Lee *et al*. (2002) ศึกษาผลการตัดไม้ต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมากจอง ในประเทศมาเลเซีย โดยใช้เทคนิค RAPD marker เพื่อศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นทันทีต่อหมากจองกลุ่มเดียวกัน ก่อนและหลังการตัดไม้ และเพื่อศึกษาผลกระทบระยะยาวโดยเปรียบเทียบต้นที่เกิดใหม่และต้นที่ขึ้นในบริเวณใกล้เคียงที่ไม่มีการตัดไม้ ผลพบว่าไม่มีความแตกต่างจากผลกระทบแบบทันที อาจจะเนื่องจากการที่มีต้นหมากจองในบริเวณดังกล่าวจำนวนมากและลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ แต่จากการศึกษาผลกระทบระยะยาว พบว่า เกิดการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม ถึง 31.5% ซึ่งส่วนที่ศึกษาเป็นต้นที่เกิดใหม่ที่มีความหนาแน่นของต้นหมากจองน้อย แสดงให้เห็นว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและการเพิ่มการผสมพันธุ์ตัวเอง (inbreeding) มากขึ้น ผลมาจากจำนวนประชากรลดลงจากการตัดต้นไม้นั่นเอง Wickneswari *et al*., 1997 ได้ทำการศึกษาคล้ายคลึงกัน แต่ใช้เทคนิค isozyme marker พบว่าไม่มีความแตกต่างของ genetic diversity อย่างมีนัยสำคัญ

Das *et al*. (2001) ได้ทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของ *Heritiera formes*, *H. littoralis* และ *H. maccrophylla* ซึ่งเป็นพืชที่กำลังจะสูญพันธุ์ และจัดอยู่ในวงศ์

Sterculiaceae เช่นเดียวกับหมากจอง โดยใช้วิธี RAPD marker โดยเปรียบเทียบพืชที่ขึ้นอยู่ในป่าชายเลน และไม่ใช่ป่าชายเลน โดยที่พืชทั้ง 3 ชนิด มีจำนวนโครโมโซม 2n=38 ซึ่งมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในระดับ karyotype แต่ในระดับ DNA พบว่ามีความแตกต่างกันสูงโดย ที่ *H. formes* กับ *H. littoralis* มีความแตกต่างกัน 14.09% ระหว่าง *H. formes* กับ *H. maccrophylla* มีความแตกต่างกันถึง 52.73% และ *H. maccrophylla* มีความแตกต่างจาก *H. littoralis* ถึง 51.23% พบ marker ที่สำคัญ 2 อย่างคือ OPA-10 (1000 bp) และ OPD-15 (900 bp) ใน *H. maccrophylla* ที่อยู่ในป่าชายเลน

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บรวบรวบรวมตัวอย่าง

เก็บรวบรวมตัวอย่างของหมากจองจากแหล่งที่ตรวจสอบพบทั่วประเทศ และประเทศใกล้เคียง

3.1.1 จังหวัดอุบลราชธานี เก็บตัวอย่างต้นหมากจองที่อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย อ. นาจะหลวย จ. อุบลราชธานี

3.1.2 จังหวัดจันทบุรี เก็บตัวอย่างต้นหมากจองที่ อ. เขาคิชกูฏ จ. จันทบุรี

3.1.3 จังหวัดกาญจนบุรี เก็บตัวอย่างต้นหมากจองที่ อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี

3.1.4 ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (สปป. ลาว) เก็บตัวอย่างต้นหมากจองที่แขวงจำปาสัก ประเทศสปป. ลาว

3.1.5 ประเทศมาเลเซีย เก็บตัวอย่างโดยการซื้อตัวอย่างผลหมากจอง

3.2 สารเคมีและอุปกรณ์

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด Genomic DNA

ชุด DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., Germany)

ประกอบด้วย

- DNeasy Spin Columns
- QIAshredder™ Mini Spin Column
- Collection tubes
- Buffer AP1 : Lysis buffer
- Buffer AP2 : Precipitation buffer
- Buffer AP3/E : Binding buffer
- Buffer AW : Wash buffer
- Buffer AE : Elution buffer
- RNase A (100 mg/ml)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค RAPD analysis

- PCR master mix, 2x : 50 units/ml ของ Taq DNA Polymerase (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, 3mM $MgCl_2$
- Nuclease Free Water
- Random primers

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบและวัดปริมาณ DNA

- Agarose
- Lambda DNA marker
- 100 bp DNA Ladder
- 10x Loading buffer : 10mM Tris-HCl (pH 7.5) และ 1M EDTA (pH 7.5)

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 ศึกษาข้อมูลสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของผลหมากจอง โดยการวัดขนาด ศึกษารูปร่างลักษณะผิวและสีของเปลือกเมล็ด

3.3.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA)

สกัดดีเอ็นเอจากส่วนใบของต้นหมากจองที่เก็บจาก จ. อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี ประเทศสปป. ลาว และส่วนเอมบริโอของหมากจองจากประเทศมาเลเซีย ด้วย DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., Germany) โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างหมากจอง ที่เก็บจากพื้นที่ละ 5 ตัวอย่าง ทำ 2 ซ้ำ (รวม 50 ตัวอย่าง)

นำใบของหมากจองที่เก็บจาก จ. อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี ประเทศสปป. ลาว น้ำหนัก 50 mg และเอมบริโอของหมากจองจากประเทศมาเลเซียผ่าครึ่ง ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml หลอดละครึ่งเอมบริโอ จากนั้นนำมาเติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมและบดให้ละเอียด ปล่อยให้ไนโตรเจนเหลวระเหยไปจนหมด เติม AP1 Buffer 400 µl และ RNase A (100 mg/ml) 4 µl นำไปบ่มใน Thermoblock ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา10 นาที กลับหลอดไปมา2 - 3 ครั้ง จากนั้นเติม AP2 Buffer 130 µl ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา และนำไปบ่มในน้ำแข็ง นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอด QIAshredder™ Mini Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนที่ผ่าน QIAshredder™ Mini Spin Column ใส่ในหลอดใหม่ เติม AP3/E Buffer 650 µl ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นนำสารละลายที่ผสมกัน 650 µl ใส่ในหลอด DNeasy Spin Columns นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน DNeasy Spin Columns จากนั้นเติมสารละลายที่ผสมกันที่เหลือใส่ในหลอด DNeasy Spin Columns นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน DNeasy Spin Columns เติม AW Buffer 500 µl ลงใน DNeasy Spin Columns นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน DNeasy Spin Columns ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำ DNeasy Spin Columns ปล่อยให้แห้งในอากาศ ย้าย DNeasy Spin Columns ใส่บนหลอด microcentrifuge ใหม่ เติม AE Buffer 100 µl โดยการเติมสารละลายให้ตรงกับ membrane ที่อยู่ตรงกลางของ DNeasy Spin Columns บ่มสารละลายในหลอด DNeasy Spin Columns นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1นาที เก็บสารละลายใสที่ผ่าน DNeasy Spin Columns ซึ่งมีดีเอ็นเอของตัวอย่างละลายอยู่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °C จนกว่าจะใช้ต่อไป

3.3.3 ตรวจสอบคุณภาพ Genomic DNA ด้วยวิธี electrophoresis และวิธีวัดการเรืองแสงร่วมกับ ethidium bromide โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8 % ใน 1xTAE buffer

3.3.4 ศึกษาลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค RAPD

เพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค RAPD ใช้ random primers 51 ชนิด ปฏิกิริยา PCR รวม 10 µl ประกอบด้วย 5 µl ของ PCR master mix, 2x ที่ประกอบด้วย 50 units/ml ของ Taq DNA Polymerase (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, 3mM $MgCl_2$ (Promega, U.S.A.), 0.25µM random primer (Qiagen, Germany and Operon, Germany) และ 1 ng DNA template โดยมี PCR condition ดังนี้ denature ที่ 92 °C 1 นาที annealing ที่ 35°C 3 นาที extention ที่ 72 °C 2 นาที จำนวน 40 รอบและ final extention ที่ 72 °C 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของ DNA ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยการนำ PCR product 4 µl ผสมกับ 10X loading buffer 1 µl แยกขนาดบน agarose gel ความเข้มข้น 2% โดยใช้ 1x TAE buffer ในการละลายเจล โดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker และนำเจลที่ได้ย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 10 µg/ml (ภาคผนวก ก) นาน 45 นาที ถ่ายภาพโดยใช้เครื่อง gel documentation system

3.3.5 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

1) การวิเคราะห์ผลของ RAPD

จากผลการแยก DNA บน agarose gel สามารถใช้แยกความแตกต่างและบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่างได้ด้วย โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบ DNA และให้คะแนนแถบ DNA ที่เกิดขึ้น จากกลุ่มตัวอย่างและจากทุก primers โดยแถบ DNA ที่เกิดขึ้น ณ ตำแหน่งหนึ่งๆ ให้คะแนน 1 ส่วนแถบ DNA ทีไม่เกิดขึ้นให้คะแนน 0 นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนของแบบของ DNA ที่ได้จากแต่ละคู่โดยใช้ค่าดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index, S) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$S = 2 \times N_{ab} / (n_a + n_b)$$

เมื่อ n_a, n_b และ N_{ab} คือจำนวนแถบ DNA ที่พบใน a, b และทั้งใน a และ b ตามลำดับ โดย S จะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดย 0 คือ ทั้งสองตัวอย่างไม่มีแถบ DNA ที่เหมือนกันเลยและ S = 1 หมายถึงทั้งสองตัวอย่างมีแถบ DNA ที่เหมือนกันทั้งหมด แล้วจึงนำ ค่า S มาคำนวณหาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม D (genetic distance, D) จาก

$$D = \ln \frac{S}{r}$$

โดยการแปลงค่าจากค่า S เป็น D ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีของ Nei และ Li (Nei and Li, 1979)

2) การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

สามารถศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแต่ละตัวอย่าง โดยการใช้โปรแกรม FREETREE ศึกษา unweighted pair group method using arithmatic average (UPGMA) อ่านผลการวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Tree View X ซึ่งผลที่ได้อยู่ในรูปแผนภูมิรูปต้นไม้ (dendrograms)

3) การหาเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands มีวิธีการคำนวณ ดังนี้

$$\%\ \text{polymorphic bands} = \frac{\text{ผลรวมของ polymorphic band ทั้งหมด}}{\text{ผลรวมของแถบ DNA ที่เกิดทั้งหมด}} \times 100$$

ผลรวมของแถบ DNA ที่เกิดทั้งหมด = polymorphic band + monomorphic band

โดย polymorphic band = แถบของ DNA ที่ไม่เกิดขึ้นในตัวอย่างทุกตัวอย่างในแต่ละ primer

monomorphic band = แถบของ DNA ที่เกิดขึ้นจาก primer แต่ละชนิดและพบในตัวอย่างทุกตัวอย่าง

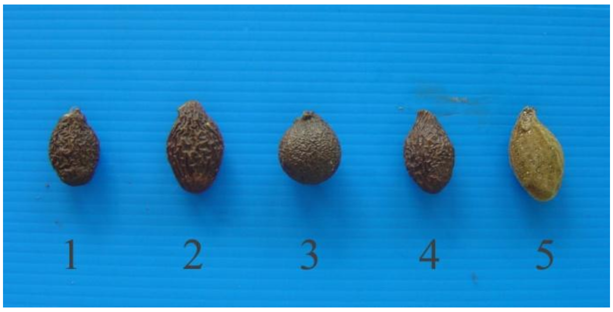
บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาข้อมูลสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของผลหมากจอง

ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดแก่ของหมากจองที่รวบรวมจาก จ.อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี ประเทศลาว และประเทศมาเลเซีย โดยการวัดขนาด รูปร่าง ลักษณะผิว และสีของเปลือกเมล็ด(ตารางที่ 4.1) พบว่า ตัวอย่างเมล็ดแก่หมากจองจาก จ.อุบลราชธานี จ. จันทบุรี และประเทศลาว มีลักษณะคล้ายกัน คือ รูปร่างเมล็ดยาวรี ผิวเปลือกเมล็ดมีลักษณะย่นและสีน้ำตาลเข้ม ส่วนเมล็ดแก่หมากจองจาก จ. กาญจนบุรี มีรูปร่างค่อนข้างกลม ผิวเปลือกเมล็ดมีลักษณะเรียบและสีน้ำตาเข้ม และหมากจองมาเลเซียมีรูปร่างยาวรี ผิวเปลือกเมล็ดมีลักษณะย่น มีขนคล้ายกำมะหยี่สีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดแก่ของหมากจอง

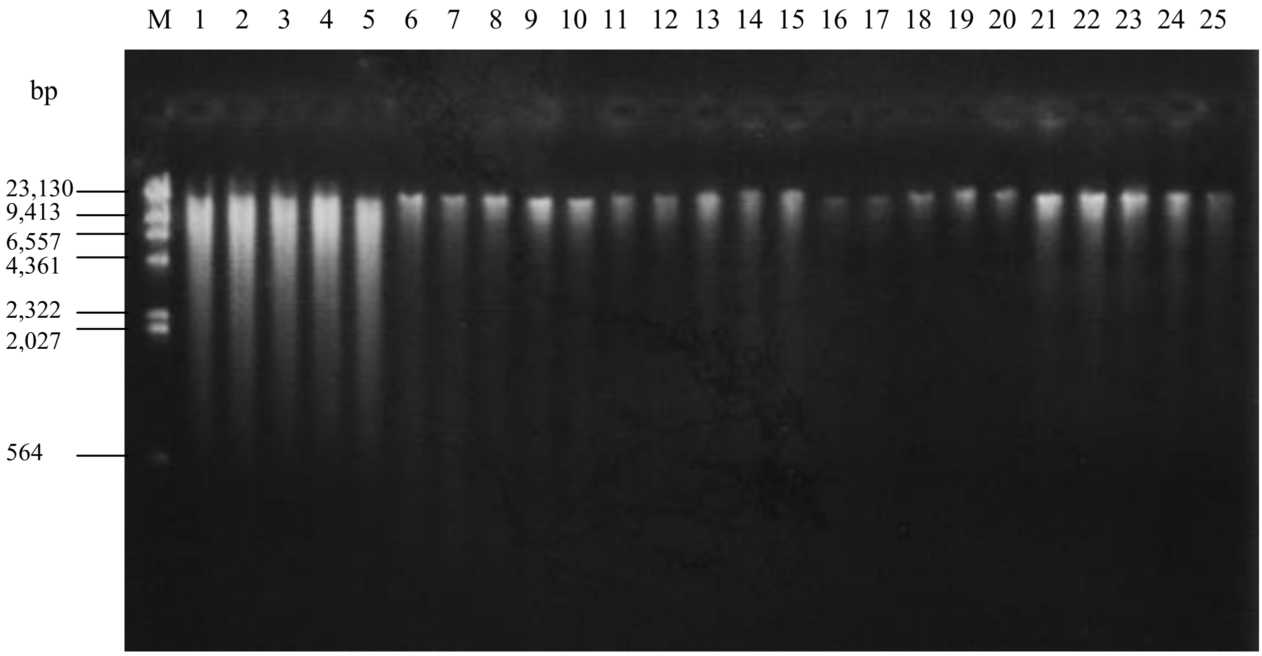
ตัวอย่างหมากจอง	ค่าเฉลี่ยขนาด		รูปร่าง	ลักษณะผิวและสีของเปลือกเมล็ด
	กว้าง (มม.)	ยาว (มม.)		
จ. อุบลราชธานี	14.20	23.00	ยาวรี	ลักษณะผิวย่น สีน้ำตาลเข้ม
จ. จันทบุรี	15.45	30.10	ยาวรี	ลักษณะผิวย่น สีน้ำตาลเข้ม
จ. กาญจนบุรี	28.00	31.00	ค่อนข้างกลม	ลักษณะผิวเรียบ สีน้ำตาลเข้ม
ประเทศลาว	15.75	25.50	ยาวรี	ลักษณะผิวย่น สีน้ำตาลเข้ม
ประเทศมาเลเซีย	15.60	26.20	ยาวรี	ลักษณะผิวย่น มีขนคล้ายกำมะหยี่สีน้ำตาลอ่อน



ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างเมล็ดแก่ของหมากจองที่เก็บรวบรวมจาก 1) จ.อุบลราชธานี 2) จ.จันทบุรี 3) จ.กาญจนบุรี 4) ประเทศลาว และ 5) ประเทศมาเลเซีย

4.2 การสกัด Genomic DNA

ดีเอ็นเอหมากจองที่เก็บรวบรวมมาจากทั้ง 5 แหล่ง มีขนาด ประมาณ 23,130 bp (ภาพที่ 4.2) มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 190–230 ng/µl จากความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ สามารถเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยการทำ dilution ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้น ที่ 1:10 เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วงที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ได้แถบดีเอ็นเอค่อนข้างคงที่และสามารถทำซ้ำได้


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
bp
23,130
9,413
6,557
4,361
2,322
2,027
564

ภาพที่ 4.2 รูปแถบ Genomic DNA ของตัวอย่างหมากจองทั้งหมด

M = λ DNA/*Hind* III marker
1-5 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี
6-10 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดจันทบุรี
11-15= ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี
16-20 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
21-25 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศมาเลเซีย

4.3 การคัดเลือกไพรเมอร์

ผลการคัดเลือกไพร์เมอร์ที่มีประสิทธิภาพจากไพรเมอร์ทั้งหมด 51 ชนิดกับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่สกัดจากตัวอย่างเอมบริโอหมากจองจากตัวอย่างที่เก็บจาก จ. อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี ประเทศลาว และประเทศมาเลเซีย อย่างละ 5 ตัวอย่าง รวม 25 ตัวอย่าง และทำจำนวน 2 ซ้ำ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่ามีไพรเมอร์ 9 ชนิด คือ A02, A03, A08, A09, A13, B01, C06 และ H07 ที่ให้แถบดีเอ็นเอคงที่และสามารถทำซ้ำ

4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD โดยการใช้ไพรเมอร์ 9 ชนิดที่ทำการคัดเลือกแล้ว พบว่าในแต่ละไพรเมอร์ เมื่อทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยการทำ agarose gel electrophoresis พบว่าจะให้จำนวนและตำแหน่งของแถบดีเอนเอที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 และ 4.11) และจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ทั้ง 9 ชนิด ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด 926 แถบ มีแถบดีเอ็นเอ 81 ตำแหน่ง เฉลี่ย 9 ตำแหน่งต่อไพรเมอร์ และขนาดของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 250-2,072 คู่เบส (ตารางที่ 4.2)

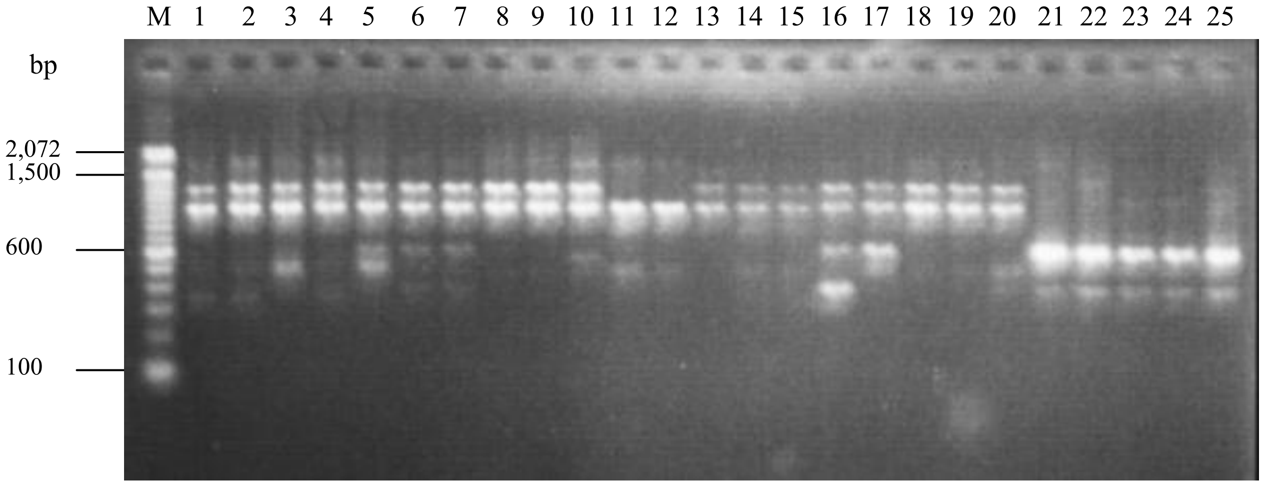
สำหรับการหาเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands ภายในของหมากจองจากแหล่งที่เก็บรวบรวมจาก จ. อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี ประเทศลาว และประเทศมาเลเซีย ที่เกิดจากไพรเมอร์ทั้งหมด มีเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands เท่ากับ 45.83, 26.82, 39.13, 34.09 และ 43.48 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ซึ่งพบว่าหมากจองจากทุกแหล่งมีเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands ภายในใกล้เคียงกัน โดยหมากจองจากจ. จันทบุรี มี เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands ต่ำที่สุด

---

* หมายเหตุ
A02 : TGCCGAGCTG
A03 : AGTCAGCCAC
A08 : GTGACGTAGG
A09 : GGGTAACGCC
A13 : CAGCACCCAC
A18 : AGGTGACCGT
B01 : GTTTCGCTCC
C06 : GAACGGACTC
H07 : CTGCATCGTG

รูปแบบของแถบ DNA แต่ละไพรเมอร์

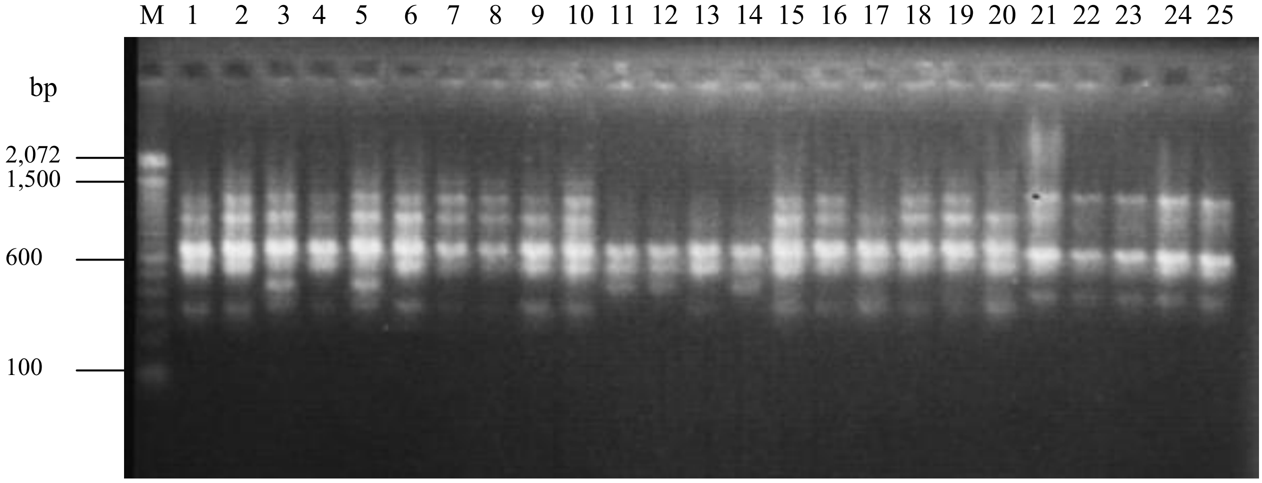
ไพรเมอร์ A02


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 4.3 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A02

M = 100bp DNA ladder
1-5 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี
6-10 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดจันทบุรี
11-15 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี
16-20 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
21-25 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศมาเลเซีย

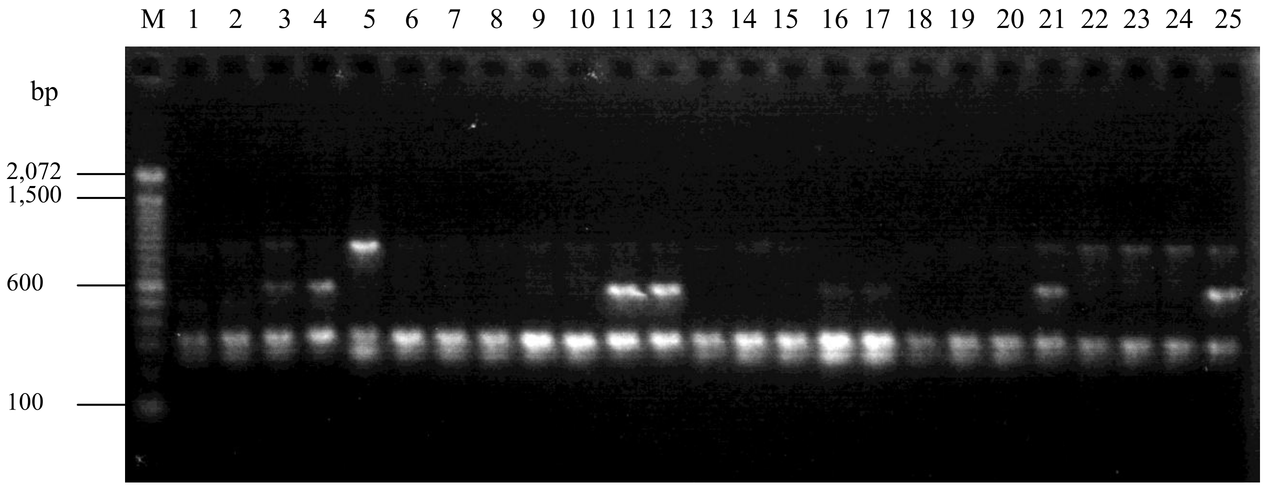
ไพรเมอร์ A03


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 4.4 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A03

M = 100bp DNA ladder
1-5 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี
6-10 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดจันทบุรี
11-15 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี
16-20 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
21-25 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศมาเลเซีย

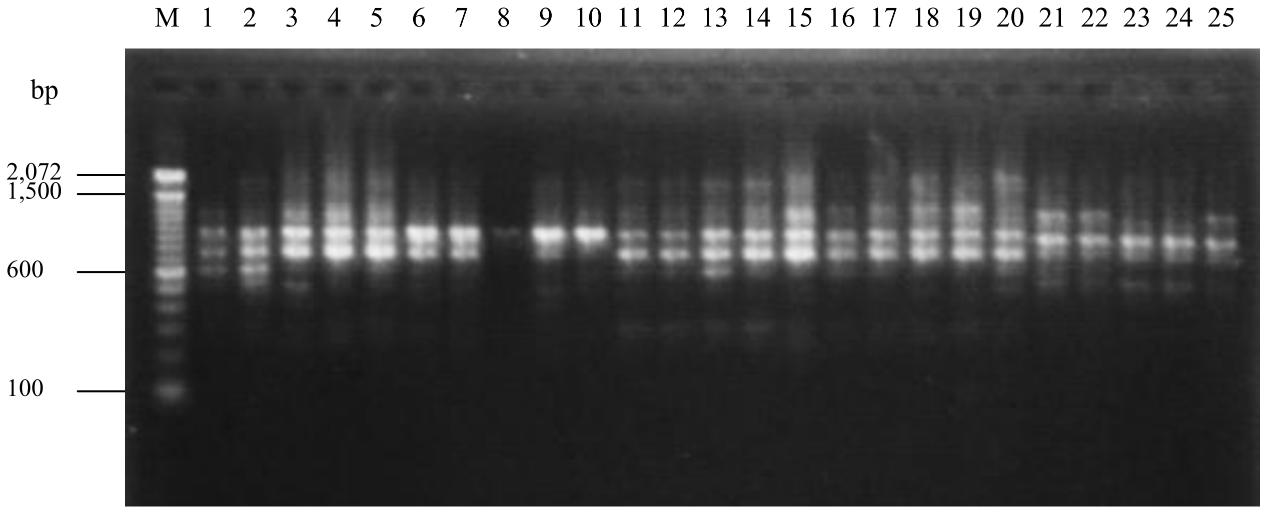
ไพรเมอร์ A08


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 4.5 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A08

M = 100bp DNA ladder
1-5 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี
6-10 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดจันทบุรี
11-15 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี
16-20 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
21-25 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศมาเลเซีย

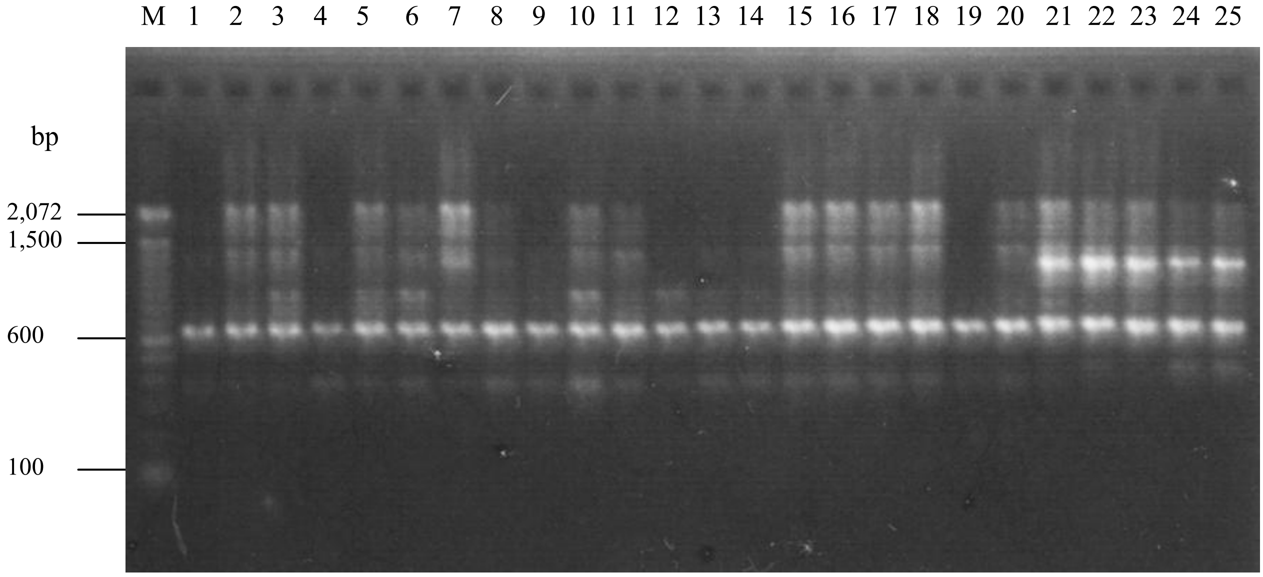
ไพรเมอร์ A09


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 4.6 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A09

M = 100bp DNA ladder
1-5 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี
6-10 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดจันทบุรี
11-15 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี
16-20 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
21-25 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศมาเลเซีย

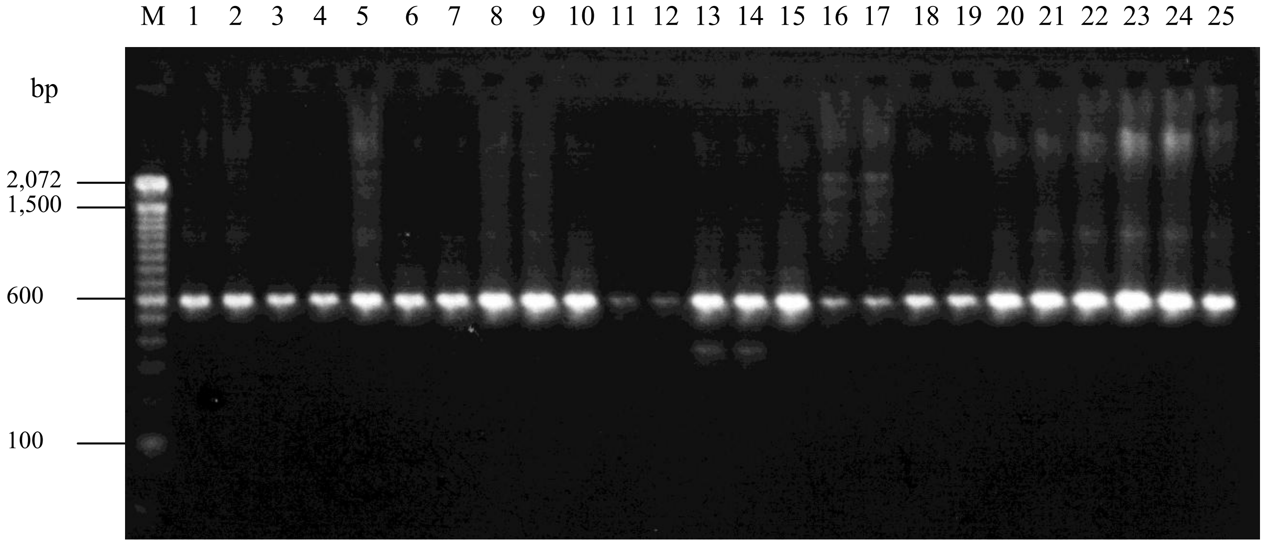
ไพรเมอร์ A13


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 4.7 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A13

M = 100bp DNA ladder
1-5 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี
6-10 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดจันทบุรี
11-15 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี
16-20 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
21-25 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศมาเลเซีย

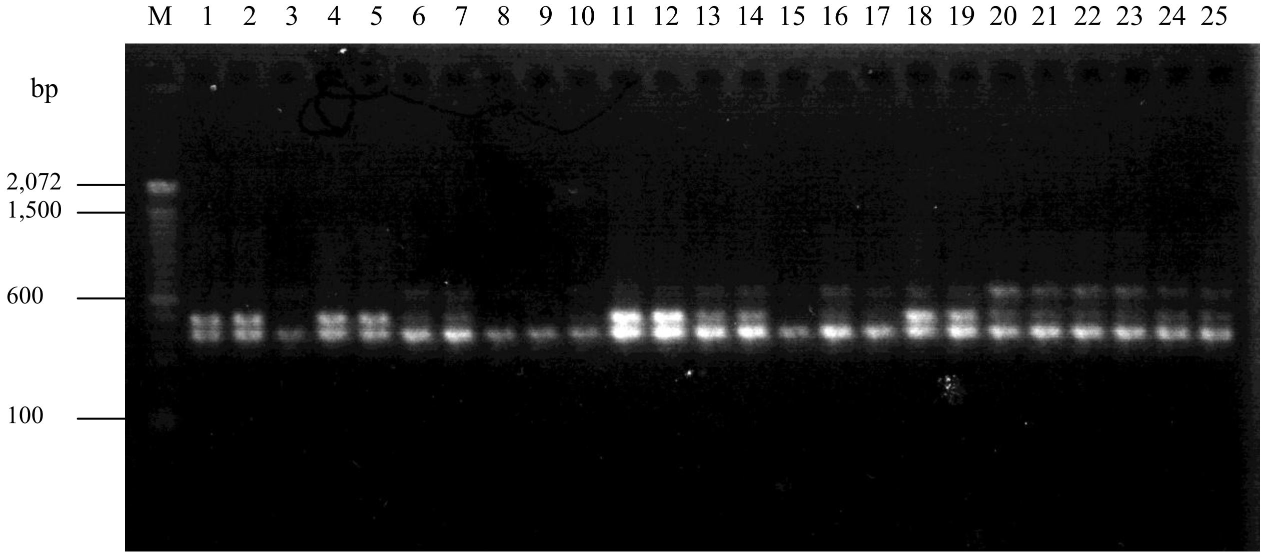
ไพรเมอร์ A18


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 4.8 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A18

M = 100bp DNA ladder
1-5 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี
6-10 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดจันทบุรี
11-15 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี
16-20 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
21-25 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศมาเลเซีย

ไพรเมอร์ B01


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 4.9 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ B01

M = 100bp DNA ladder
1-5 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี
6-10 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดจันทบุรี
11-15 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี
16-20 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
21-25 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศมาเลเซีย

ไพรเมอร์ C06

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

bp

2,072
1,500

ไม่แสดงผล

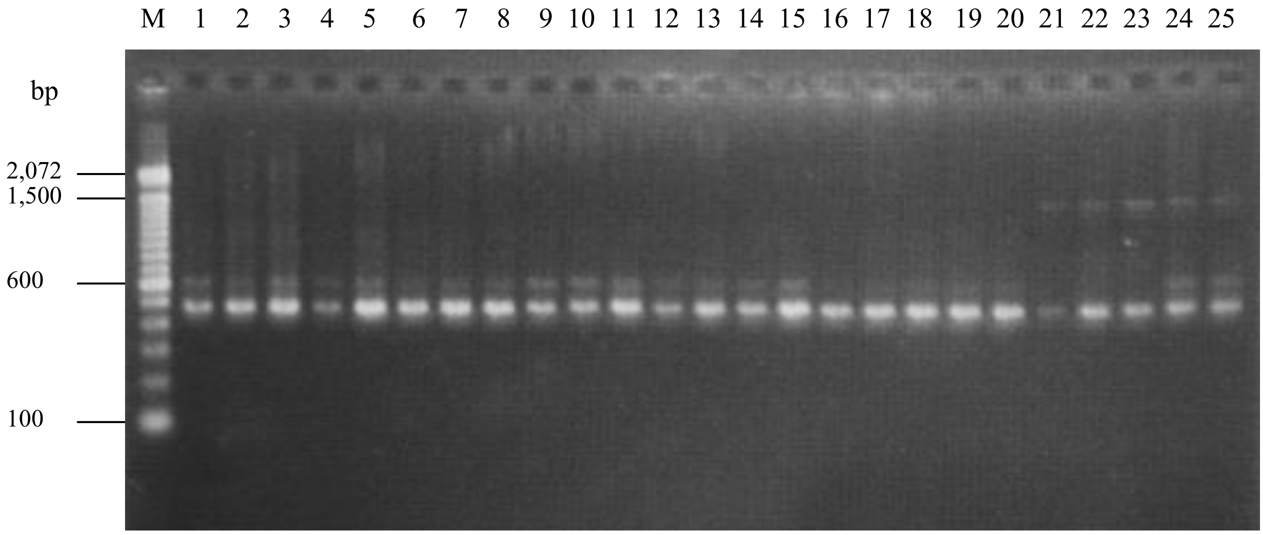
600

100

ภาพที่ 4.10 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ C06

M = 100bp DNA ladder
1-5 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี
6-10 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดจันทบุรี
11-15 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี
16-20 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
21-25 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศมาเลเซีย

ไพรเมอร์ H07



ภาพที่ 4.11 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ H07

M = 100bp DNA ladder
1-5 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี
6-10 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดจันทบุรี
11-15 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี
16-20 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
21-25 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศมาเลเซีย

ตารางที่ 4.2 จำนวนตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ ที่เพิ่มปริมาณได้ในแต่ละไพรเมอร์ และขนาดของคู่เบสจากทุกไพรเมอร์กับหมากจองทุกแหล่ง

ไพร์เมอร์	ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอ	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	ค่าเฉลี่ยจำนวนแถบดีเอ็นเอ	ขนาด (bp)
A02	9	102	11.33	350-1,900
A03	9	120	13.33	300-1,500
A08	13	119	9.15	250-1,300
A09	12	109	9.08	300-1,800
A13	9	138	15.33	250-2,072
A18	11	112	10.18	300-2,072
B01	6	86	14.33	400-1,200
C06	5	63	12.60	400-2,072
H07	7	77	11.00	500-2,072
รวม	81	926	11.43	
ค่าเฉลี่ย	9	102.89	11.43	

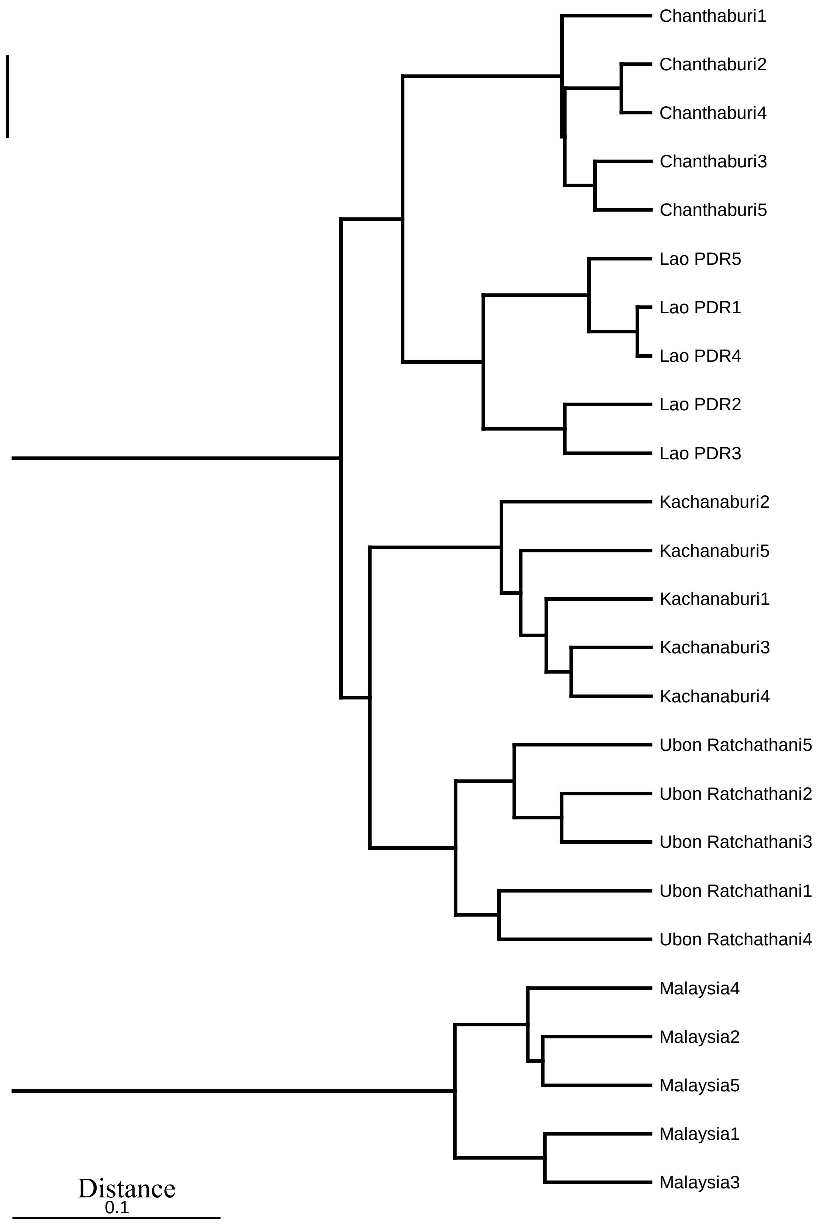
ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ของ polymorphic bands ภายในหมากจองแต่ละแหล่ง

ตัวอย่างหมากจอง	จำนวนของ monomorphic/polymorphic bands ภายในหมากจองแต่ละแหล่ง	เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands
จ. อุบลราชธานี	26/22	45.83
จ. จันทบุรี	30/11	26.82
จ. กาญจนบุรี	28/18	39.13
ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว	29/15	34.09
ประเทศมาเลเซีย	26/20	43.48

4.5 ผลการวิเคราะห์ผลของ RAPD และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ผลของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหมากจองจาก 5 แหล่ง คือ หมากจองเก็บรวบรวมจาก จ.อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี ประเทศลาวและประเทศมาเลเซีย โดยการนำมาหาค่าดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index, S) โดยสร้าง dendrogram จัดแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ตามวิธี UPGMA ของ Nei และ Li (1979) พบว่าจาก dendrogram แบ่งกลุ่มความสัมพันธ์เป็น 3กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างหมากจองที่เก็บจาก จ.อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี และ ประเทศลาว และกลุ่มที่ 2 คือ ตัวอย่างหมากจองที่เก็บจากประเทศมาเลเซีย (ภาพที่ 4.12)

สำหรับค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance, D) ภายในกลุ่มตัวอย่างหมากจองที่เก็บรวบรวมจาก จ.อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี ประเทศลาวและประเทศมาเลเซีย แต่ละแหล่ง พบว่ามีค่า D อยู่ในช่วง 0.74-0.91, 0.62-0.97, 0.63-0.92, 0.55-0.99 และ 0.25-0.90 ตามลำดับ สำหรับค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวตัวอย่าง (ตารางที่ 4.4) มีค่า D อยู่ระหว่าง 0.25–0.99 ถือว่ามีระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในระดับค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับค่า D = 1.00 คือ ระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุด



ภาพที่ 4.12 Dendrogram ของค่าดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index) ระหว่างกลุ่มประชากรหมากจอง ตามวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA

ตารางที่ 4.4 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างกลุ่มประชากรของหมากจอง โดยนำค่า S มาคำนวณหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม

	Ub1	Ub2	Ub3	Ub4	Ub5	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ka1	Ka2	Ka3	Ka4	Ka5	Lao1	Lao2	Lao3	Lao4	Lao5	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5
Ubon Ratchathani1	0.00																								
Ubon Ratchathani2	0.85	0.00																							
Ubon Ratchathani3	0.76	0.91	0.00																						
Ubon Ratchathani4	0.85	0.74	0.78	0.00																					
Ubon Ratchathani5	0.86	0.84	0.90	0.86	0.00																				
Chanthaburi1	0.70	0.81	0.77	0.63	0.68	0.00																			
Chanthaburi2	0.71	0.77	0.74	0.65	0.65	0.93	0.00																		
Chanthaburi3	0.68	0.74	0.73	0.67	0.64	0.89	0.93	0.00																	
Chanthaburi4	0.69	0.75	0.71	0.62	0.62	0.90	0.97	0.90	0.00																
Chanthaburi5	0.68	0.79	0.76	0.62	0.68	0.94	0.93	0.95	0.90	0.00															
Kachanaburi1	0.69	0.83	0.81	0.68	0.73	0.73	0.69	0.68	0.69	0.72	0.00														
Kachanaburi2	0.74	0.79	0.76	0.70	0.67	0.75	0.79	0.78	0.76	0.76	0.85	0.00													
Kachanaburi3	0.70	0.84	0.83	0.72	0.74	0.77	0.76	0.75	0.73	0.78	0.91	0.89	0.00												
Kachanaburi4	0.65	0.76	0.75	0.64	0.67	0.77	0.76	0.72	0.76	0.75	0.89	0.83	0.92	0.00											
Kachanaburi5	0.69	0.78	0.74	0.63	0.66	0.78	0.80	0.74	0.80	0.77	0.85	0.85	0.86	0.91	0.00										
Lao PDR1	0.65	0.78	0.80	0.64	0.72	0.79	0.78	0.77	0.76	0.83	0.71	0.69	0.74	0.67	0.68	0.00									
Lao PDR2	0.68	0.66	0.68	0.67	0.75	0.74	0.70	0.69	0.68	0.76	0.58	0.55	0.61	0.61	0.61	0.83	0.00								
Lao PDR3	0.68	0.63	0.65	0.64	0.72	0.71	0.70	0.67	0.68	0.73	0.55	0.55	0.59	0.59	0.61	0.85	0.92	0.00							
Lao PDR4	0.66	0.77	0.78	0.62	0.70	0.81	0.79	0.78	0.77	0.84	0.69	0.70	0.73	0.68	0.69	0.99	0.81	0.86	0.00						
Lao PDR5	0.64	0.78	0.79	0.63	0.71	0.82	0.78	0.79	0.75	0.85	0.70	0.69	0.74	0.68	0.68	0.95	0.88	0.79	0.93	0.00					
Malaysia1	0.39	0.44	0.44	0.37	0.37	0.42	0.42	0.44	0.39	0.43	0.42	0.43	0.42	0.39	0.39	0.47	0.33	0.36	0.48	0.43	0.00				
Malaysia2	0.45	0.37	0.36	0.43	0.43	0.37	0.37	0.39	0.34	0.38	0.37	0.38	0.37	0.35	0.34	0.37	0.39	0.42	0.38	0.36	0.85	0.00			
Malaysia3	0.45	0.49	0.49	0.43	0.43	0.51	0.50	0.52	0.47	0.51	0.47	0.46	0.50	0.50	0.49	0.50	0.42	0.42	0.51	0.49	0.90	0.81	0.00		
Malaysia4	0.41	0.33	0.33	0.39	0.39	0.33	0.33	0.35	0.33	0.34	0.31	0.28	0.34	0.34	0.33	0.36	0.38	0.43	0.37	0.32	0.83	0.89	0.84	0.00	
Malaysia5	0.36	0.28	0.25	0.31	0.31	0.28	0.27	0.30	0.27	0.29	0.28	0.28	0.29	0.26	0.25	0.31	0.30	0.36	0.32	0.26	0.79	0.90	0.75	0.87	0.00

หมายเหตุ Ub1-5 : ประชากรหมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี
Ch1-5 : ประชากรหมากจองจากจังหวัดจันทบุรี
Ka1-5 : ประชากรหมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี
Lao1-5 : ประชากรหมากจองจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
Ma1-5 : ประชากรหมากจองจากประเทศมาเลเซีย

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของหมากจองที่เก็บรวบรวมจาก 5 พื้นที่ ได้แก่ จ. อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี ประเทศสปป. ลาว และประเทศมาเลเซีย โดยสกัดดีเอ็นเอจากใบหมากจองจาก 4 พื้นที่ คือ จ. อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี และประเทศสปป. ลาว ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างต้นหมากจองได้ ส่วนตัวอย่างหมากจองของประเทศมาเลเซียไม่สามารถหาต้นหมากจองได้จึงใช้ส่วนของเอมบริโอของผลหมากจองแทนโดยการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., Germany) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างใบและเอมบริโอของหมากจองจากทุกพื้นที่ ให้แถบของดีเอ็นเอตรงกับแถบของ λ DNA/Hind III marker ที่ขนาด 23,130 bp (ภาพที่ 4.2) และดีเอ็นเอที่สกัดได้สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ได้

ผลการคัดเลือกไพร์เมอร์ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างหมากจองทั้ง 5 พื้นที่ รวม 25 ตัวอย่าง พบว่ามีไพรเมอร์ 9 ชนิด คือ A02, A03, A08, A09, A13, B01, C06 และ H07 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ให้แถบดีเอ็นเอคงที่และสามารถทำซ้ำได้ เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมากจอง พบว่า จำนวนและตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์แต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด 926 แถบ มีแถบดีเอ็นเอ 81 ตำแหน่ง เฉลี่ย 9 ตำแหน่งต่อไพรเมอร์ และขนาดของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 250-2,072 คู่เบส (ตารางที่ 4.2)

การตรวจสอบเพื่อทำให้เห็นความแตกต่างในระดับพันธุกรรมของพืช โดยใช้เทคนิค RAPD เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการบ่งชี้และจัดจำแนกพืชหลายชนิด ได้แก่ มะละกอ (Stiles *et al*., 1993) แอปเปิล (Koller *et al*., 1995) มังคุด (มะลิวรรณ, 2542) และโกโก้ (Lerceteau *et al*., 1997) เมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands ภายในหมากจองจากแหล่งที่เก็บรวบรวมจาก จ. อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี ประเทศลาว และประเทศมาเลเซีย ที่เกิดจากไพรเมอร์ทั้งหมด เท่ากับ 45.83, 26.82, 39.13, 34.09 และ 43.48 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ซึ่งพบว่าหมากจองจากทุกแหล่งมีเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands ใกล้เคียงกัน โดยที่หมากจองจากจ. จันทบุรี มี เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands ต่ำที่สุด

การวิเคราะห์ผลของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหมากจองจาก 5 แหล่งดังกล่าว โดยการนำมาหาค่าดัชนีความคล้ายคลึง และค่าระยะทางพันธุกรรมภายในประชากร โดยสร้าง dendrogram จัดแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ตามวิธี UPGMA ของ Nei และ Li (1979) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์เป็น 2 กลุ่ม คือ คือ กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างหมากจองที่เก็บจาก จ. อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี และ ประเทศลาว ซึ่งมีความใกล้ชิดกันมากกว่ากลุ่มที่ 2 คือ ตัวอย่างหมากจองที่เก็บจากประเทศมาเลเซีย (ภาพที่ 4.12) สำหรับค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance, D) ภายในกลุ่มตัวอย่างหมากจองที่เก็บรวบรวมจาก จ.อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี ประเทศลาวและประเทศมาเลเซีย แต่ละแหล่ง พบว่ามีค่า D อยู่ในช่วง 0.74-0.91, 0.62-0.97, 0.63-0.92, 0.55-0.99 และ 0.25-0.90 ตามลำดับ และพบว่าตัวอย่างจาก จ. อุบลราชธานี มีค่า D อยู่ในช่วง 0.74-0.91 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด สำหรับค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวตัวอย่าง (ตารางที่ 4.4) มีค่า D อยู่ระหว่าง 0.25–0.99 ถือว่ามีระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในระดับค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับค่า D = 1.00 คือ ระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุด

เทคนิค RAPD ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม เพื่อตรวจสอบความแตกต่างในระดับพันธุกรรมของพืช และนำไปใช้ประโยชน์ในการบ่งชี้และจัดจำแนกพืชหลายชนิด การศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกใช้เทคนิค RAPD เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย เหมาะสำหรับพืชที่มีข้อมูลพื้นฐานน้อย อย่างไรก็ตามเทคนิค RAPD จะมีข้อเสียในเรื่องของ reproducibility เนื่องจากบางครั้งขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม แต่สามารถแก้ไขได้โดยการควบคุมสภาวะที่ใช้ในการทำการทดลอง (Powell *et al.*, 1995) การคัดเลือก primer (Mailer *et al.*, 1994) และการเลือกนับแถบดีเอ็นเอ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเท่านั้น หากจะมีการอนุรักษ์หรือปรับปรุงพันธุ์ควรมีการศึกษาตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งอื่นที่ห่างออกไปเพิ่มเติมจากประเทศเพื่อนบ้าน เช่น กัมพูชา พม่า นอกจากนี้ควรจะศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบในการคัดเลือกพันธุ์ และควรเลือกเทคนิคที่ได้ผลแม่นยำ และให้ข้อมูลได้ละเอียดยิ่งขึ้น

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

5.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบและเอมบริโอของหมากจอง มีขนาด ประมาณ 23,130 bp มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 190–230 ng/µl สามารถให้ดีเอ็นที่มีปริมาณและคุณภาพดีพอที่จะนำไปใช้ในเทคนิค RAPD

5.2 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการศึกษาด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ตัวอย่างที่เก็บจาก จ. อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี ประเทศสปป.ลาว และประเทศมาเลเซีย รวมทั้งหมด 25 ตัวอย่าง และไพรเมอร์ จำนวน 9 ชนิด คือ A02, A03, A08, A09, A13, A18 C06, B01 และ H07 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด 926 แถบ มีแถบดีเอ็นเอ 81 ตำแหน่ง เฉลี่ย 9 ตำแหน่งต่อไพรเมอร์ และขนาดของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 250-2,072 คู่เบส

5.3 เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands ภายในของหมากจองจากแหล่งที่เก็บรวบรวมจาก จ. อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี ประเทศลาว และประเทศมาเลเซีย ที่เกิดจากไพรเมอร์ทั้งหมด เท่ากับ 45.83, 26.82, 39.13, 34.09 และ 43.48 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ซึ่งหมากจองจากจ. จันทบุรี มีเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands ต่ำที่สุด

5.4 การวิเคราะห์ผลของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD โดยการนำมาหาค่าดัชนีความคล้ายคลึงและค่าระยะทางพันธุกรรม สามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างหมากจองที่เก็บจาก จ. อุบลราชธานี จ. จันทบุรี จ. กาญจนบุรี และ ประเทศลาว และกลุ่มที่ 2 คือ ตัวอย่างหมากจองที่เก็บจากประเทศมาเลเซีย

เอกสารอ้างอิง

เต็ม สมิตินันทน์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ : หอพรรณไม้ กรมป่าไม้.

มะลิวรรณ นาคขุนทด. 2542. การศึกษาอนุกรมวิธานของพืชสกุลมังคุดบางชนิดโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Caetano-Anolles G., Bassam B.J. and Gresshoff P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. BIO/TECHNOLOGY. 9 : 553-557.

Dallwitz, M.J. 1980. A general system for coding taxonomic descriptions. Taxon. 29 : 41-46.

Dallwitz, M.J., Paine, T.A. and Zurcher, E.J. 1993. User's Guide to the DELTA System: General System for Processing Taxonomic Descriptions; 4th edition. (http://biodiversity.uno.edu/delta.)

Damasco, O.P., Adkins, S.W., Godwin, I.D. and Smith, M.K. 1998. Use of SCAR-base marker for the early detection of dwaf off-types in micropropagated Cavendish bananas. Acta hortic. 416 : 157-164.

Damasco, O.P., Graham, G.C., Henry, R.J., Adkins, S.W., Smith, M.K. and Godwin, I.D. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. Plant cell rep. 16 : 118-123.

Das AB., Mukherjee AK. and Das P. 2001. Molecular phylogeny of Heritiera Aiton (Sterculiacear), a tree mangrove : variations in RAPD markers and nuclear DNA content. Botanical J. of the Linnean Society. 136 : 221-229.

FAOSTATDatabase.[Online]Available:http://apps.fao.org./page/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&servlet=1&language=EN&hostname=apps.fao.org&version=default. 6. March 2001.

Faure, S., Noyer, J.L., Horry, J.p., Bakry, F., Lanaud, C. and Gonzalez de Leon, D. 1993. A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*musa acuminate*). Theor. Appl. Genet. 87 : 517-526.

Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L. 1985. Hypervariable "minisatallite" regions in human DNA. Naature. 314 : 67-73.

Jobin-Décor, M.P., Graham, G.C., Henry, R.J. and Drew, R.A. 1997. RAPD and isozyme analysis of genetic relationships between *Carica papaya* and wild relatives. Genet. Resour. Crop evol. 44 : 471-477.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Koller, B.A., McDermott J.M. and Gessler C. 1992. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor. Appl. genet. 85 : 901-904.

Lee, C.T. 1999. Effects of logging on the genetic diversity of *Scaphium macropodum* and *Parkia speciosa*. M.Sc. Thesis, Universiti Kebangsaan, Malysia, Bangi, Malaysia.

Lerceteau, E.T. 1997. Evalution of extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 95 : 10-19.

Magdalita, P.M., Drew, R.A., Adkins, S.W. and Godwin, I.D. 1997. Morphological, molecular and cytological analyses of *Carica papaya* x *C. cauliflora* interspecific hybrids. Theor. Appl. Gent. 95 : 224-229.

Magdalita, P.M., Godwin, I.D., Adkins, S.W. and Drew, R.A. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA markers for a *Carica* interspecific hybrid. Acta hortic. 461 : 133-140.

Mailer, R.J., Scarth, R. and Fristensky, B. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. Tag Theoretical and Applied Genetics. 87(6) : 697-704.

Manshardt, R.M. and Wenslaff, T.F. 1989. Interspecific hybridization of papaya with other *Carica* specie. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 114(4) : 689-694.

Manshardt, R.M. 1992. Papaya. In : F.A. Hammerschlag and R.E. Lizt (eds), Biotechnology of perennial fruit crops. Biotechnology in Agriculture No. 8. C.A.B. International, Wallingford. 489-511.

Nei, M. and Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclerses. Proc. Natl. Acad. Sci. 76(10) : 5269-5273.

Pavlicek A., Hrda S, Flegr J. 1999. FreeTree-Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus Frenkelia. Folia Biologica (Praha). 45 : 97-99 (http://www.natur.cuni.cz/~freetree.html)

Powell, W., Orozco-Castillo, C., Chalmers, K.J., Provan, J. and Waugh, R. 1995. Polymerase chain reaction-based assays for the characterisation of plant genetic resources. Electrophoresis. 16 : 1726-1730.

Sharon, D., Hillel, J., Vainstein, A. and Lavi, U. 1992. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of *Carica papaya* and *Carica* species. Euphytica. 62 : 119-126.

Smith, L.W., Aitken, E.A. and Godwin, I.D. 1998. Potential for the use of molecular markers in improvement of *Musa* for disease resistance. Acta hortic. 461 : 149-155.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Somsri, S., Flecher, R.J., Drew, R.A., Jobin, M., Lawson, W. and Graham, M.W. 1998. Developing molecular markers for sex prediction in papaya (*Carica papaya*). Acta hortic. 461 : 141-148.

Sondur, S.N., Manshardt, R.M. and Stiles, J.I. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. genet. 93 : 547-553.

Stiles, J.I., Lemme, C., Sondur, S., Morshidi, M.B. and Manshardt, R. 1993. Using ramdomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivar. Theor. appl. Genet. 85 : 697-701.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M. and van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M. 1995. AFLP : a new technique for DNA Fingerprinting. Nucleic acids res. 23(21) : 4407-4414.

Vuylsteke, D.R., Crouch, J.H., Pellegrineschi, A. and Thottappilly, G. 1998. The biotechnology case history for *Musa*. Acta hortic. 461 : 75-86

Wickneswari, R., Lee, C.T., Norwi, M., and Boyle, T.J.B. 1997. Immediate Effects of Logging on the Genetic Diversity of Five Tropical Rainforest Species in a Ridge Forrest in Peninsular Malaysia. Paper presented at Wrap-up Workshop of the CIFOR-IPGRI Impact of Disturbance Project, Banglore, India, 18-22 August 1997.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorhisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids_res. 18 : 6531-6535.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อุปกรณ์

- Autoclave (ALP Co., L TD, Japan)
- Water bath (Contherm Scientific LTD, New Zealand)
- 713 pH Meter (Metrohm, Switzerland)
- เครื่อง PCR (Thermo Hybaid Px2 Thermal Cycler, Franklin,MA)
- Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus (Gibco BRL, Scotland)
- Hot plate stirrer (HS115, HL Instrument, Thailand)
- Gel documentation (BioDoc-It System, Ultra-Violet Products, UK)
- Microwave oven (Sharp Carousel, Thailand)
- Ultraviolet Crosslinkers (Ultra-Violet Products, UK)
- UV/VIS spectrometer Lambda EZ 201 (Perkin Elmer Ltd., England)
- เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler AE 200, Diethelm & Co,. LTD., Thailand)
- Bio Vortex SLV1 (Seoulin Bioscience, Korea)
- mortar and pestal
- ตู้เย็น (Hitachi, Thailand)
- ตู้แช่แข็ง (Sanyo, Thailand)

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมากจอง

- ชุด DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., Germany)
- PCR master mix, PCR buffer และ Nuclease Free Water (Promega, U.S.A.)
- Random primers (Qiagen, Germany and Operon, Germany)
- Agarose gene pure (Fluka Chemika-Bio Chemika, Switzerland.)
- Lambda DNA marker (BioLabs, Inc., New England)
- 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, U.S.A.)
- 10x Loading buffer : 10mM Tris-HCl (pH 7.5) และ 1M EDTA (pH 7.5)

1.3 Random primers ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Random primers ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

Primer	Seq 5’ to 3’	MW
OPA-01	CAGGCCCTTC	2964
OPA-02	TGCCGAGCTG	3044
OPA-03	AGTCAGCCAC	2997
OPA-04	AATCGGGCTG	3068
OPA-05	AGGGGTCTTG	3099
OPA-06	GGTCCCTGAC	3004
OPA-07	GAAACGGGTG	3117
OPA-08	GTGACGTAGG	3108
OPA-09	GGGTAACGCC	3053
OPA-10	GTGATCGCAG	3068
OPA-11	CAATCGCCGT	2988
OPA-12	TCGGCGATAG	3068
OPA-13	CAGCACCCAC	2942
OPA-14	TCTGTGCTGG	3050
OPA-15	TTCCGAACCC	2948
OPA-16	AGCCAGCGAA	3046
OPA-17	GACCGCTTGT	3019
OPA-18	AGGTGACCGT	3068
OPA-19	CAAACGTCGG	3037
OPA-20	GTTGCGATCC	3019
OPB-01	GTTTCGCTCC	2970
OPC-06	GAACGGACTC	3037
OPH-07	CTGCATCGTG	3019
OPU-03	CTATGCCGAC	2987
OPU-06	ACCTTTGCGG	3019
OPU-11	AGACCCAGAG	3046

หมายเหตุ : ไพรเมอร์ จากบริษัท Qiagen, Germany and Operon ประเทศเยอรมัน

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Random primers ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (ต่อ)

Primer	Seq 5’ to 3’	MERS
RP3	TGCTGGCTCCC	11
RP4	TGCTGGTTCCC	11
RP5	TGCTGGTTACC	11
RP6	TGCTGGTTTCC	11
RP7	ATACAGGGGTT	11
RP8	ATACAGGGATT	11
RP9	ATCGTTACCG	10
RP10	ATAGCAAGCG	10
RP11	ATGCAGTAGC	10
RP12	ATGCAGTAGCC	11
RP13	TACGTCATCGC	11
RP14	ATGCTAAGCG	10
RP15	AGTCCTAAGCG	11
RP17	ATAGGATGGC	10
RP18	GATCGTTACG	10
RP19	GGTAGACGAGT	11
RP20	CTGAGGAACTG	11
RP21	TAGCACCTTCC	11
RP22	CTTCGGATAGG	11
RP23	TAGGCAAGTGG	11
RP24	CCTTGATGACC	11
RP25	TAGGAAGCATC	11
RP26	TCCGACTCTAC	11

1.4 การเตรียมสารเคมีใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมากจอง

1.4.1 50x TAE ปริมาณ 500 ml

ประกอบด้วย Tris base	121 g
1mM EDTA (pH 8.0)	25 ml
Glacial acetic acid	28.5 ml
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ	500 ml

1.4.2 10x blue juice loading buffer ปริมาณ	10 ml
ประกอบด้วย 10mM Tris-HCl (pH 7.5)	200 µl
1M EDTA (pH 7.5)	100 µl
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ	10 ml

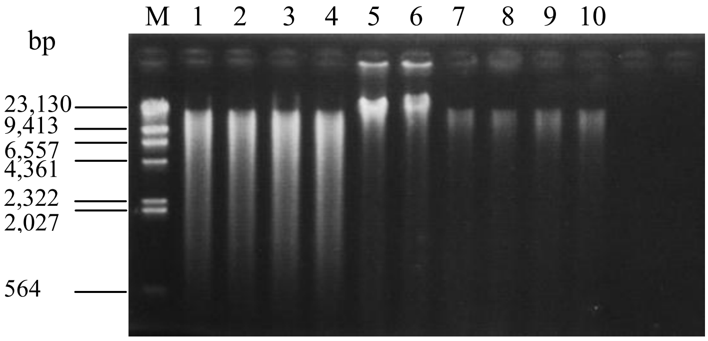
1.4.3 Ethidium bromide (10 mg/ml) ปริมาณ		100 ml

ละลาย EtBr 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 ml คนจนกว่าจะละลาย เก็บในขวดสีชาหรือภาชนะที่ห่อด้วย aluminum foil

1.4.4 100 bp DNA Ladder ปริมาณ		100 µl
ประกอบด้วย	10x blue juice loading buffer	20 µl
	1 M NaCl	2 µl
	100 bp DNA Ladder	10 µl
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ		100 µl

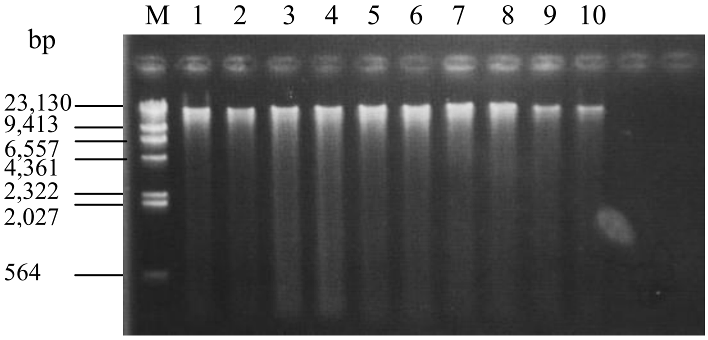
ภาคผนวก ข

รูปแบบของ Genomic DNA


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
23,130
9,413
6,557
4,361
2,322
2,027
564

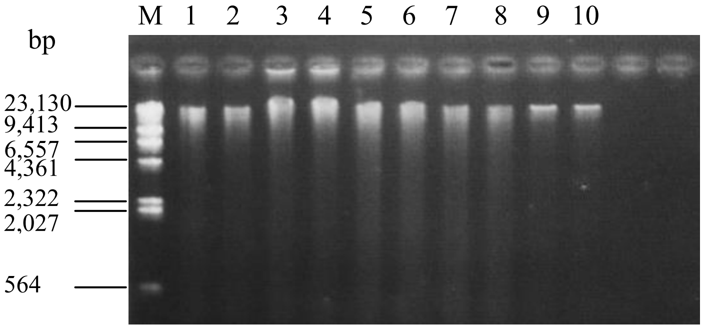
ภาพที่ 1 รูปแบบของ Genomic DNA ของตัวอย่างหมากจอง จังหวัดอุบลราชธานี

M = λ DNA/*Hind* III marker
1-2 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
23,130
9,413
6,557
4,361
2,322
2,027
564

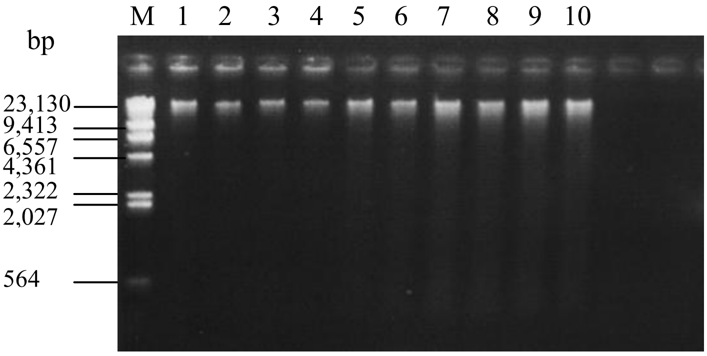
ภาพที่ 2 รูปแบบของ Genomic DNA ของตัวอย่างหมากจอง จังหวัดจันทบุรี

M = λ DNA/*Hind* III marker
1-2 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
23,130
9,413
6,557
4,361
2,322
2,027
564

ภาพที่ 3 รูปแบบของ Genomic DNA ของตัวอย่างหมากจอง จังหวัดกาญจนบุรี

M = λ DNA/*Hind* III marker
1-2 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
23,130
9,413
6,557
4,361
2,322
2,027
564

ภาพที่ 4 รูปแบบของ Genomic DNA ของตัวอย่างหมากจองประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (สปป.ลาว)

M = λ DNA/*Hind* III marker

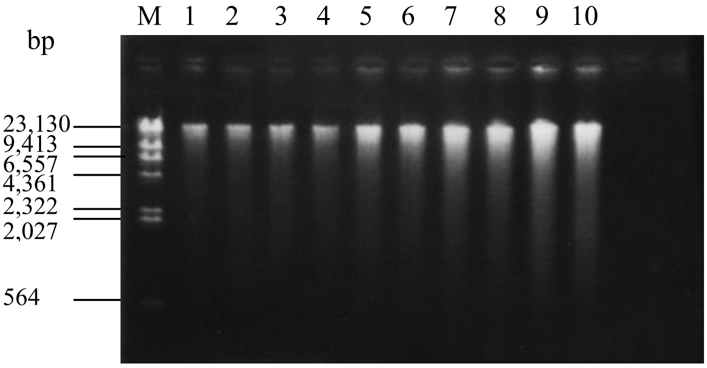
1-2 = หมากจองจากประเทศสปป.ลาว ตัวอย่างที่ 1

3-4 = หมากจองจากประเทศสปป.ลาว ตัวอย่างที่ 2

5-6 = หมากจองจากประเทศสปป.ลาว ตัวอย่างที่ 3

7-8 = หมากจองจากประเทศสปป.ลาว ตัวอย่างที่ 4

9-10 = หมากจองจากประเทศสปป.ลาว ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
23,130
9,413
6,557
4,361
2,322
2,027
564

ภาพที่ 5 รูปแบบของ Genomic DNA ของตัวอย่างหมากจองประเทศมาเลเซีย

M = λ DNA/*Hind* III marker

1-2 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 1

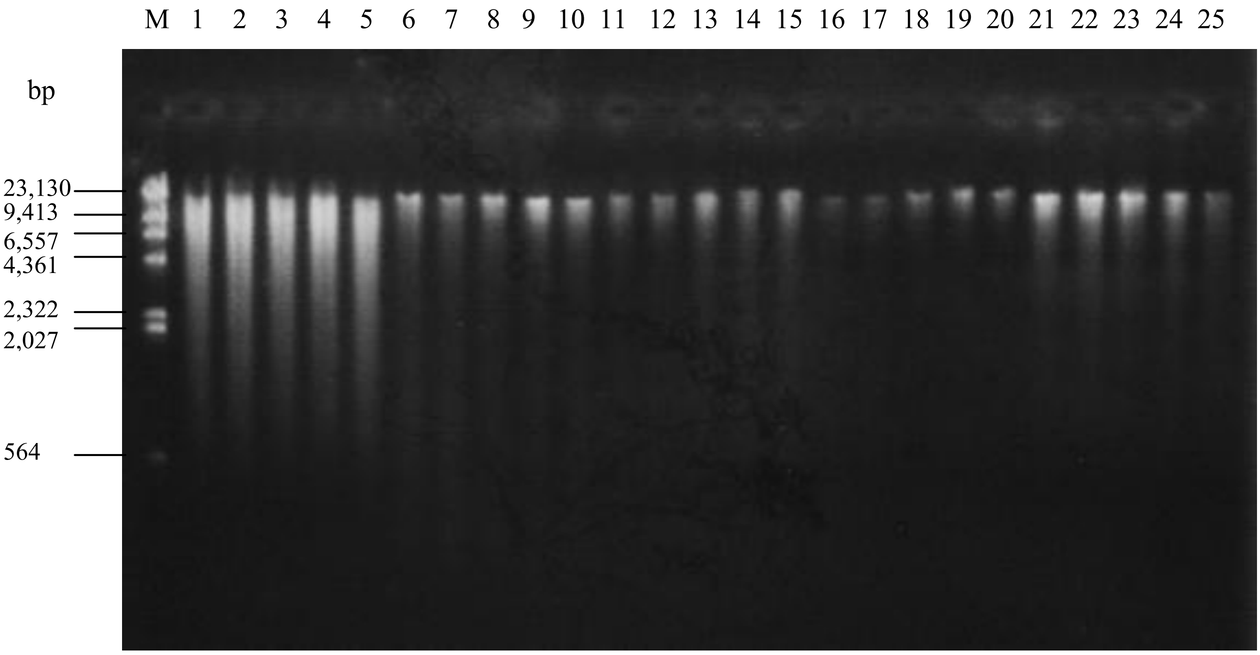
3-4 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 2

5-6 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 3

7-8 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 4

9-10 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 5

รูป Genomic DNA ของตัวอย่างหมากจองทั้งหมด


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
bp
23,130
9,413
6,557
4,361
2,322
2,027
564

ภาพที่ 6 รูป Genomic DNA ของตัวอย่างหมากจองทั้งหมด

M = λ DNA/*Hind* III marker

1-5 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี

6-10 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดจันทบุรี

11-15 = ตัวอย่างหมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี

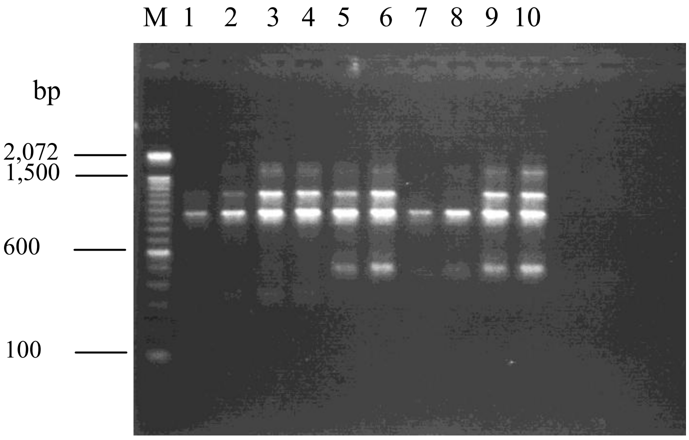
16-20 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว

21-25 = ตัวอย่างหมากจองจากประเทศมาเลเซีย

ภาคผนวก ค

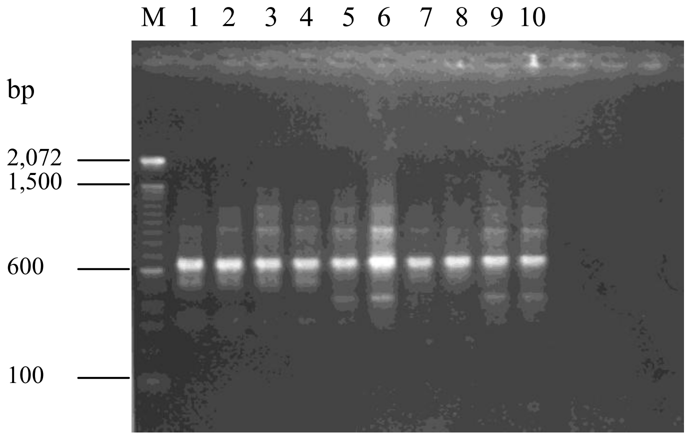
รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD

ตัวอย่างหมากจอง จังหวัดอุบลราชธานี



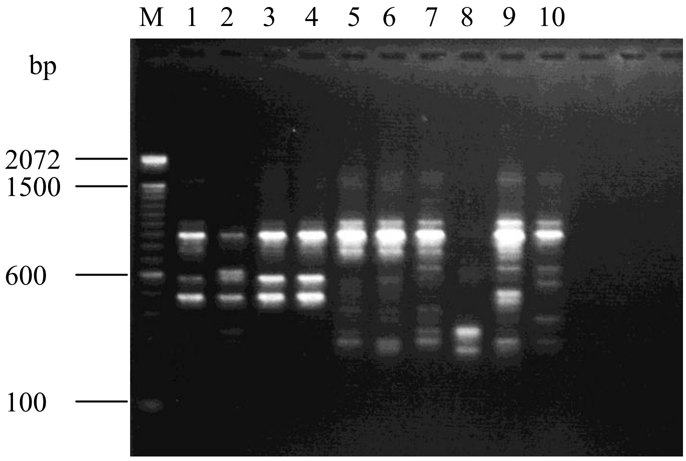
ภาพที่ 1 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A02

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 5



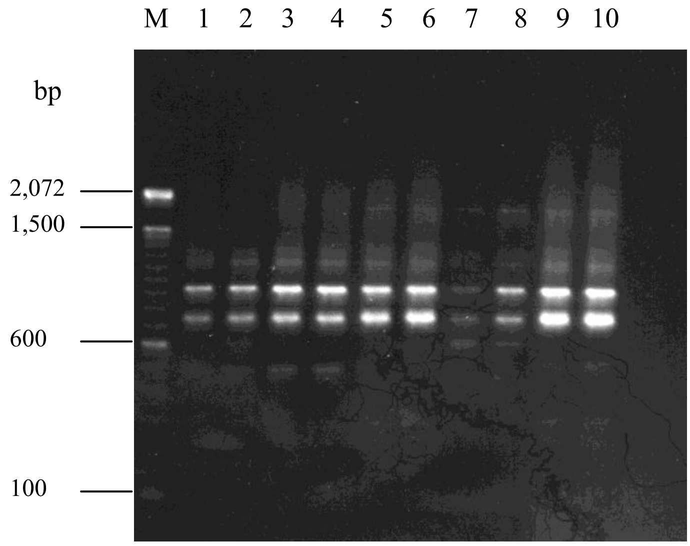
ภาพที่ 2 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A03

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 5



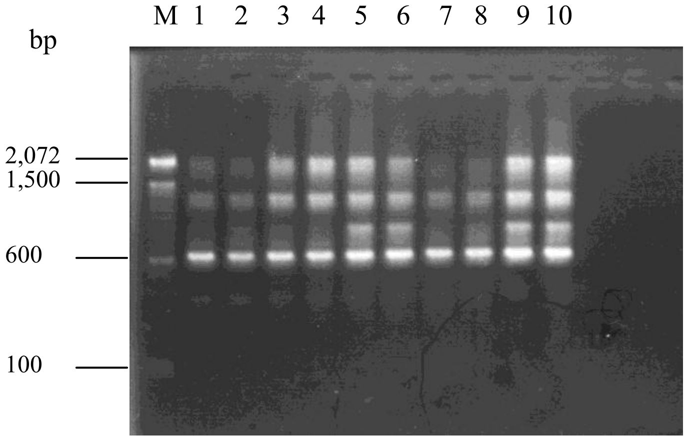
ภาพที่ 3 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A08

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
2,072
1,500
600
100

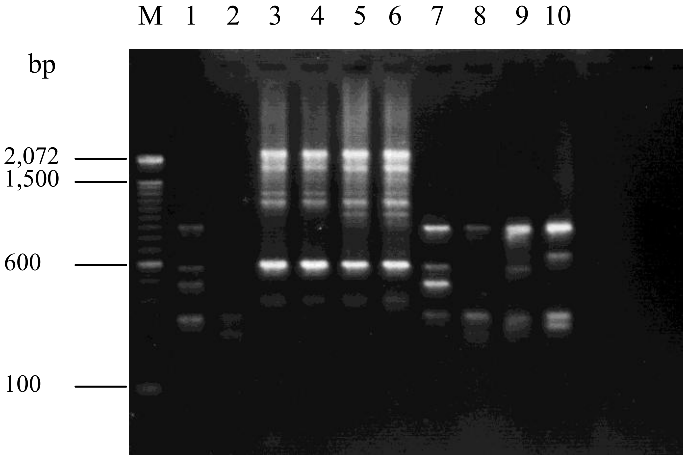
ภาพที่ 4 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A09

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
2,072
1,500
600
100

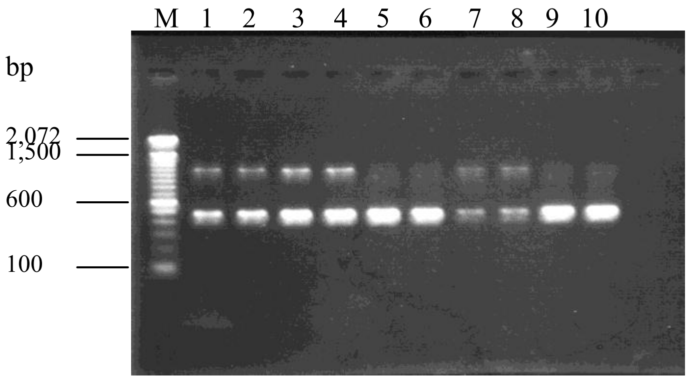
ภาพที่ 5 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A13

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
2,072
1,500
600
100

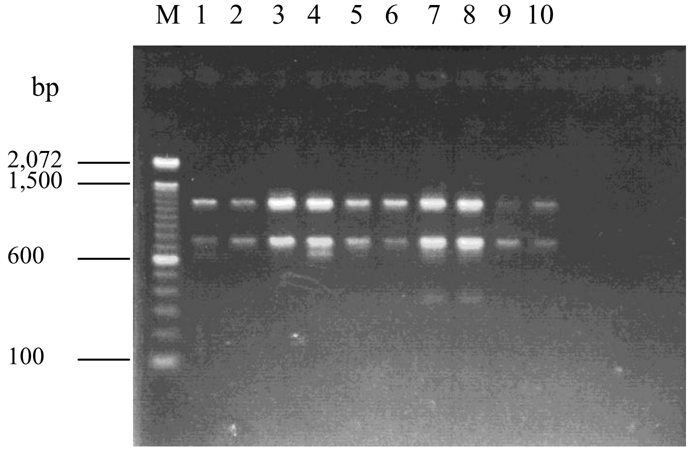
ภาพที่ 6 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A18

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
2,072
1,500
600
100

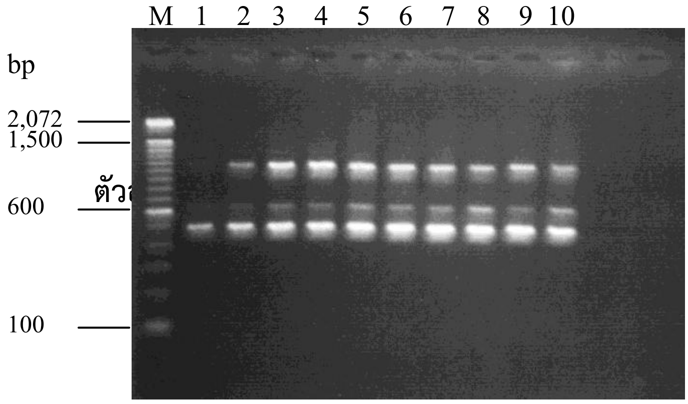
ภาพที่ 7 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ B01

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
2,072
1,500
600
100

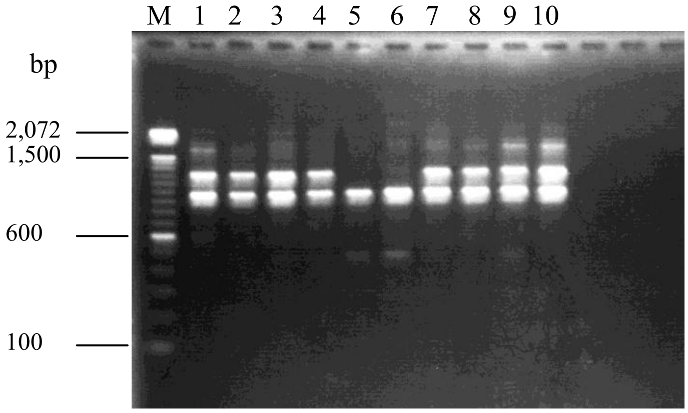
ภาพที่ 8 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ C06

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
2,072
1,500
600
100

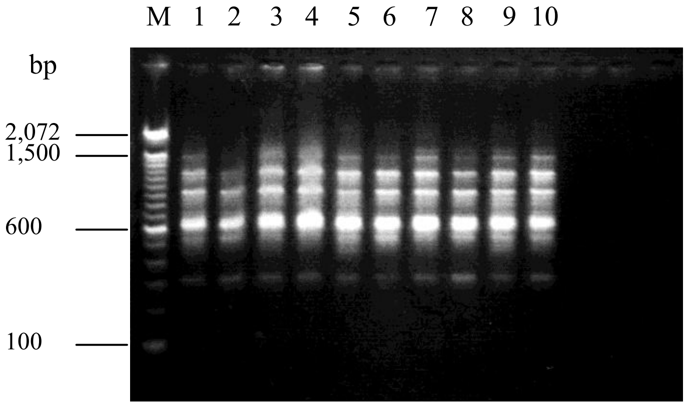
ภาพที่ 9 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ H07

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

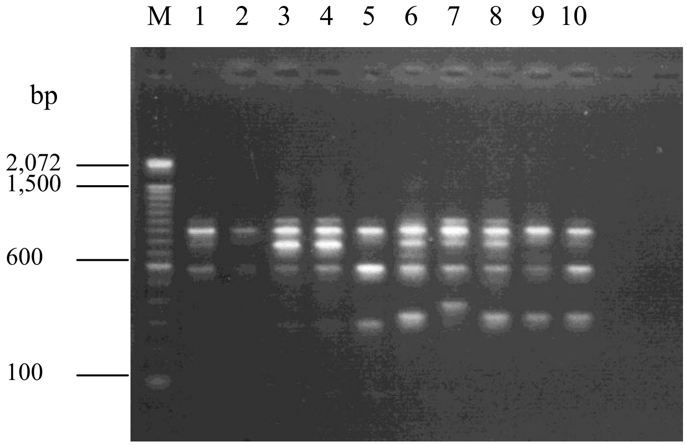
ภาพที่ 10 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A02

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

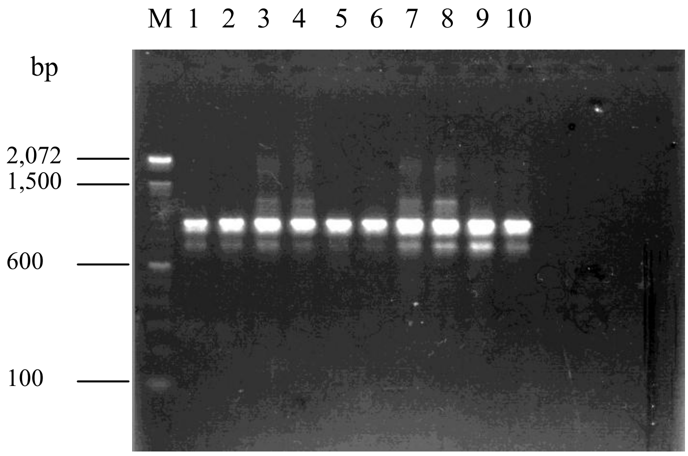
ภาพที่11 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A03

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

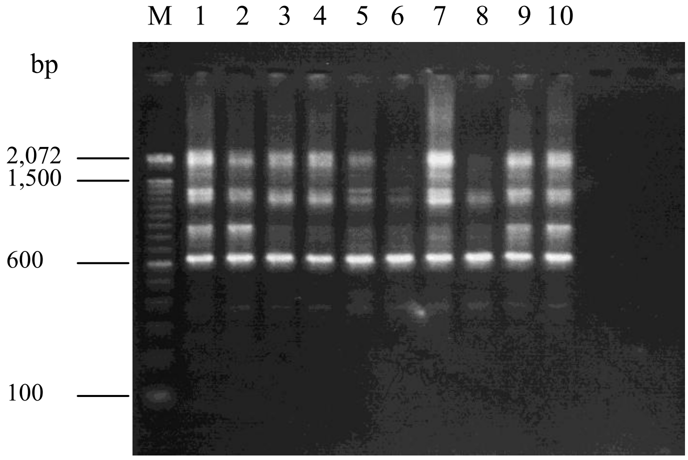
ภาพที่ 12 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A08

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

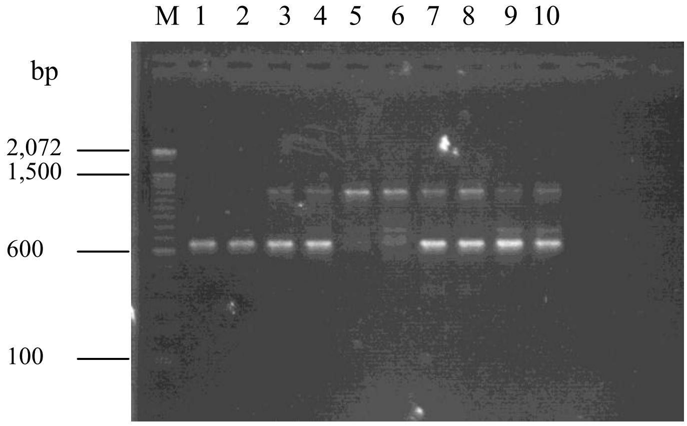
ภาพที่ 13 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A09

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

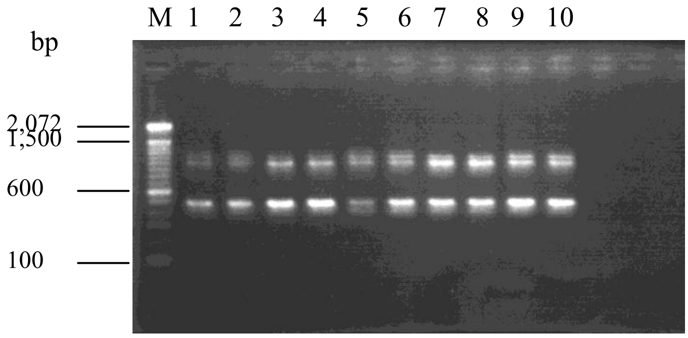
ภาพที่ 14 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A13

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

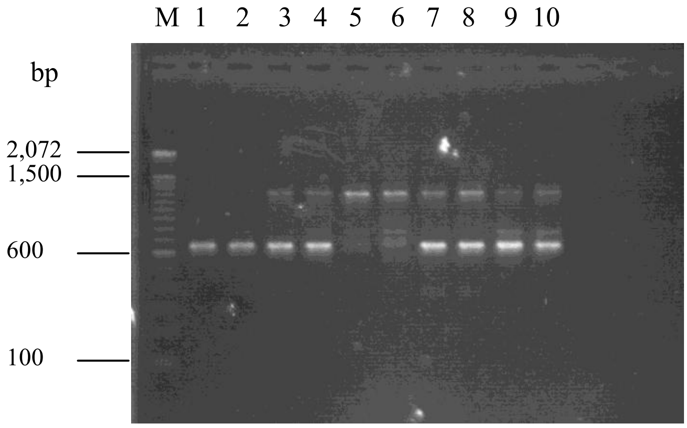
ภาพที่ 17 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ C06

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

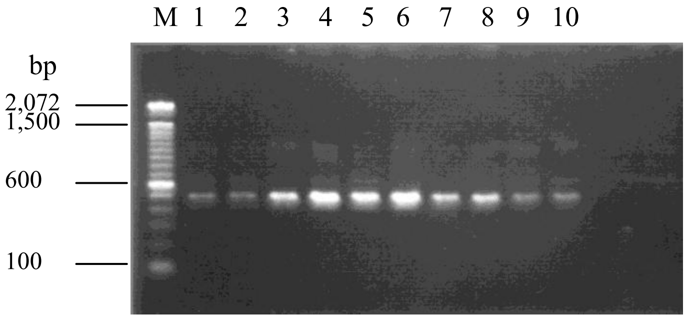
ภาพที่ 16 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ B01

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 17 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ C06

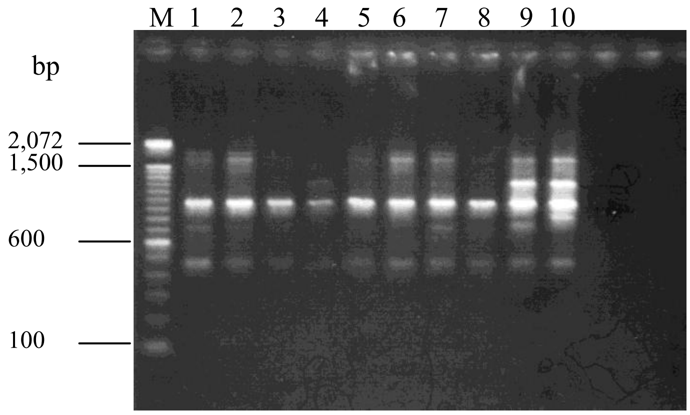
M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 18 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ H07

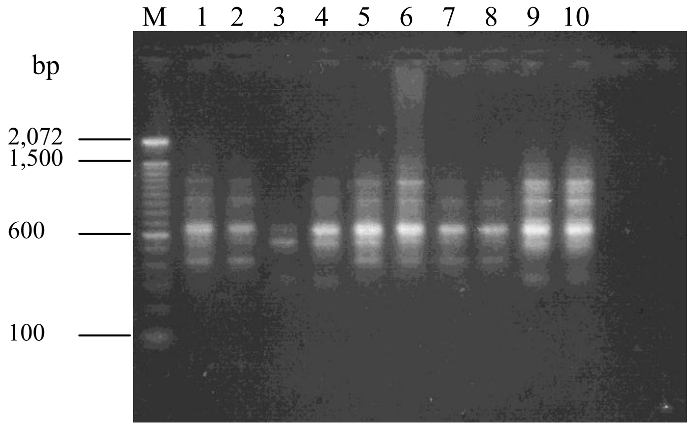
M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 5

ตัวอย่างหมากจอง จังหวัดกาญจนบุรี


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
2,072
1,500
600
100

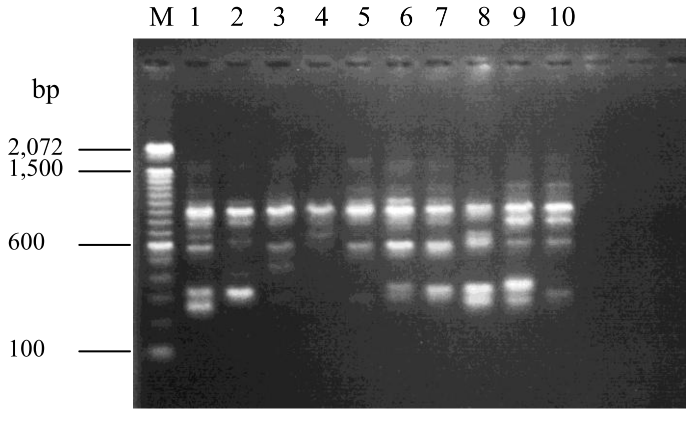
ภาพที่ 19 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A02

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
2,072
1,500
600
100

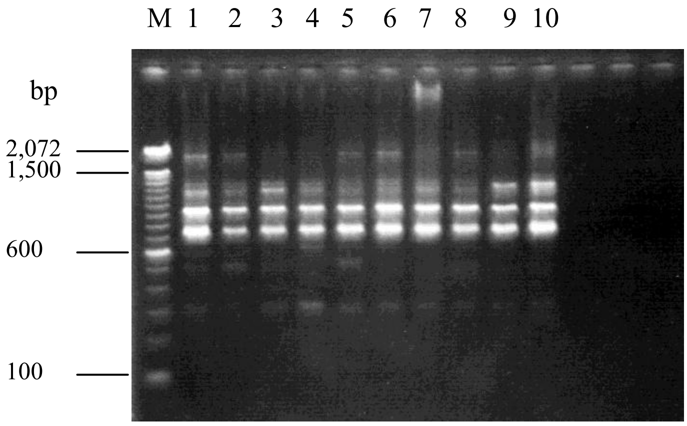
ภาพที่ 20 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A03

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
2,072
1,500
600
100

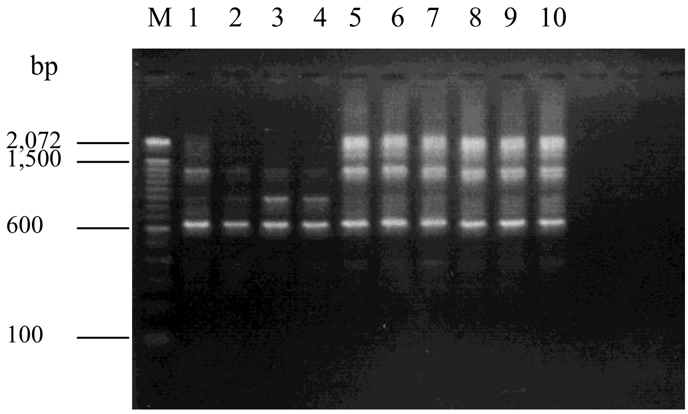
ภาพที่ 21 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A08

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

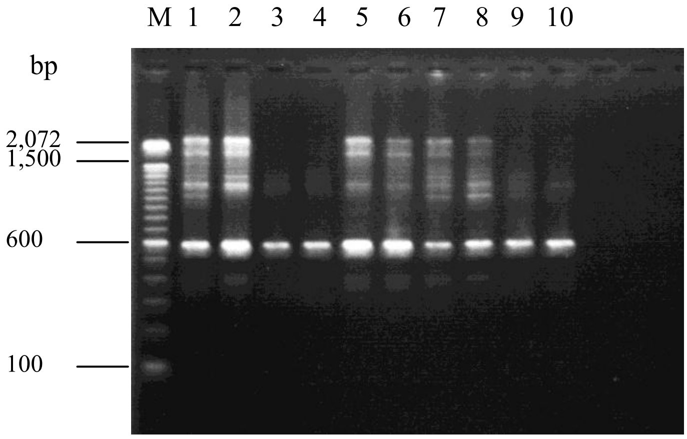
ภาพที่ 22 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A09

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

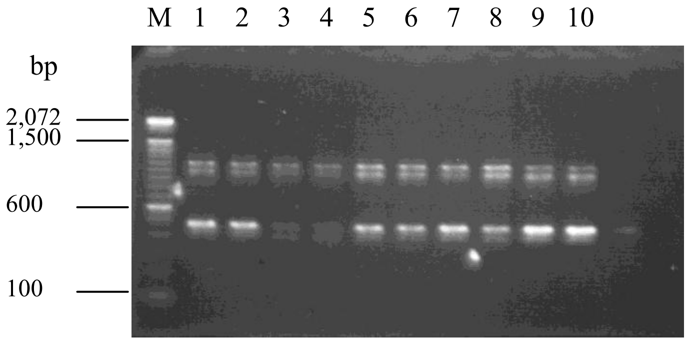
ภาพที่ 23 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A13

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

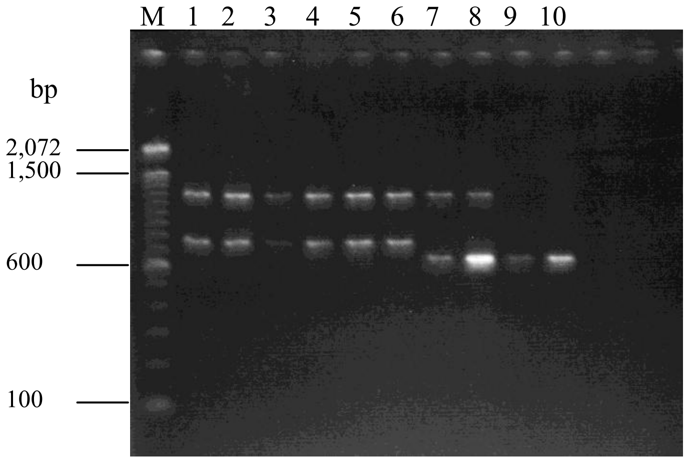
ภาพที่ 24 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A18

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

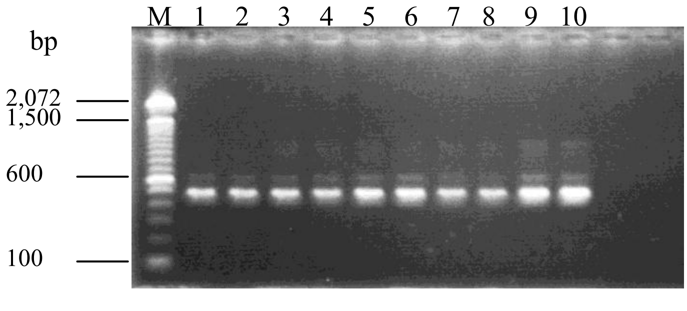
ภาพที่ 25 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ B01

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 26 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ C06

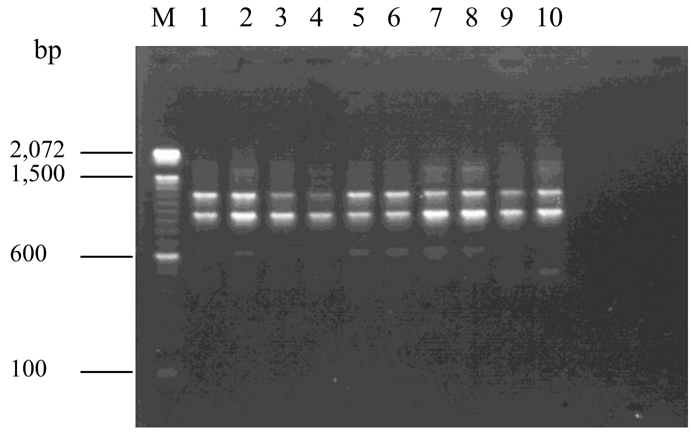
M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 27 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ H07

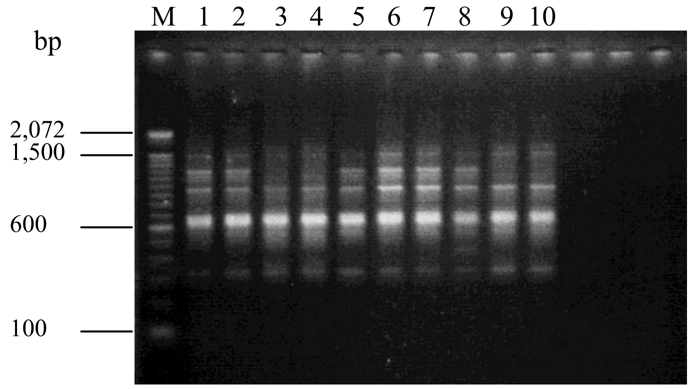
M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากจังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ 5

ตัวอย่างหมากจอง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

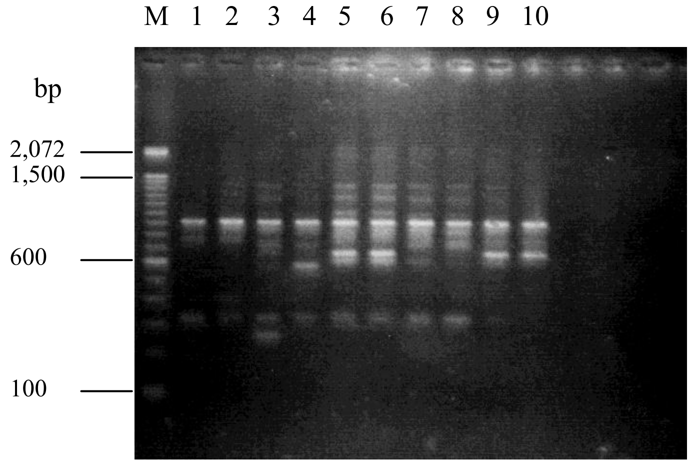
ภาพที่ 28 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A02

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

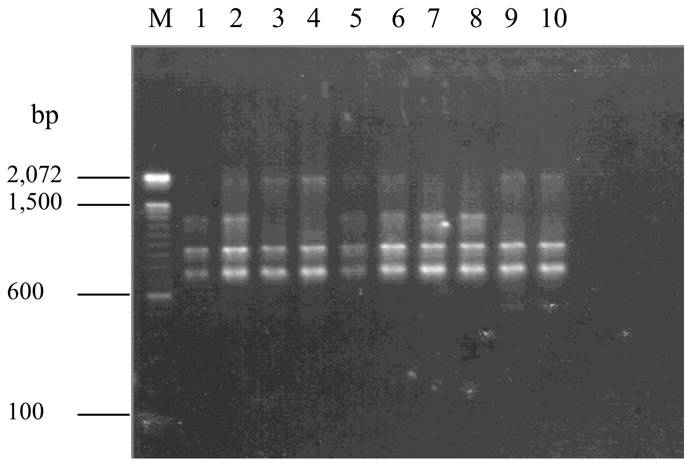
ภาพที่ 29 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A03

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

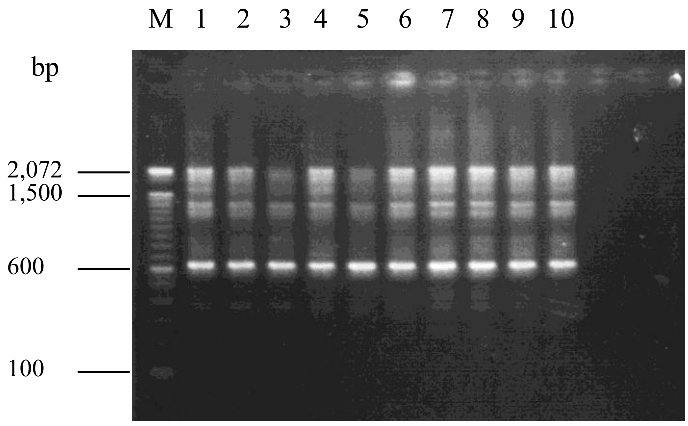
ภาพที่ 30 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A08

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
2,072
1,500
600
100

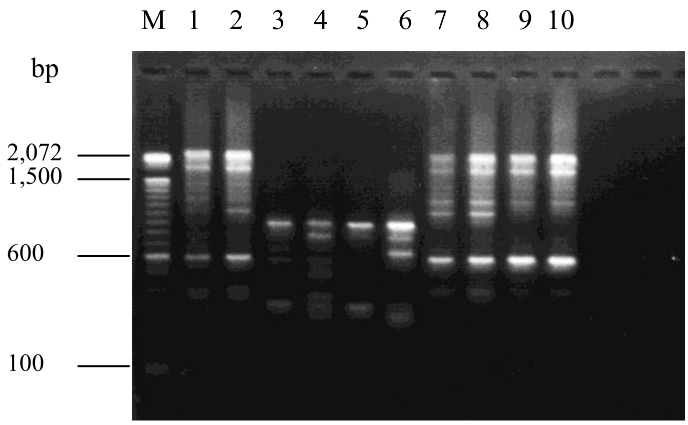
ภาพที่ 31 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A09

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
2,072
1,500
600
100

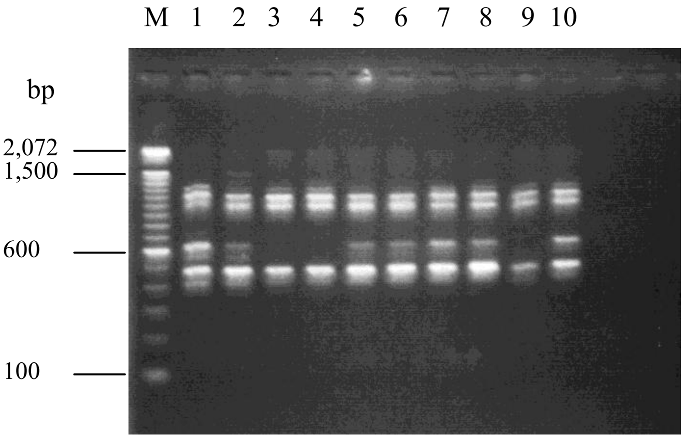
ภาพที่ 32 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A13

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 5


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
bp
2,072
1,500
600
100

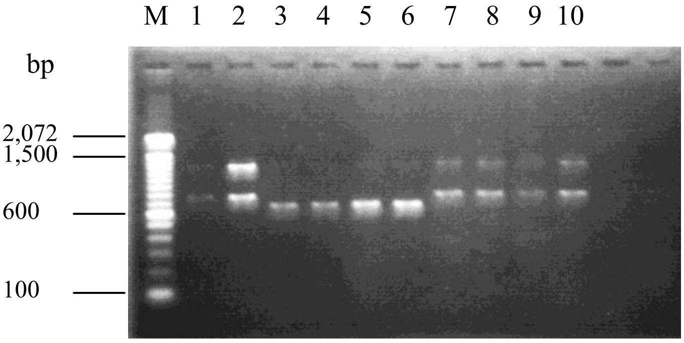
ภาพที่33 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A18

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

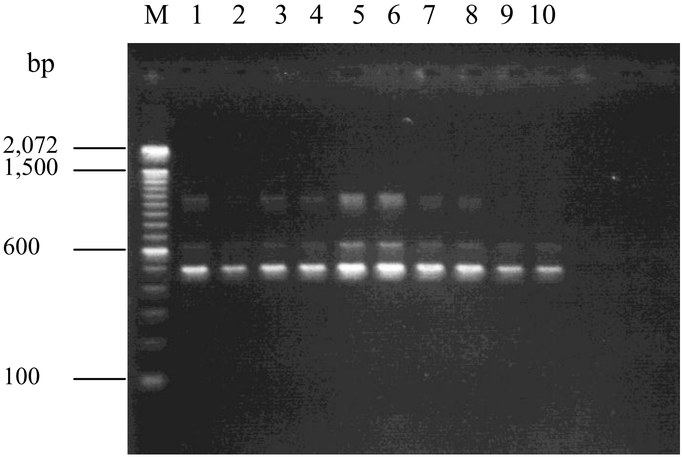
ภาพที่ 34 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ B01

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 35 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ C06

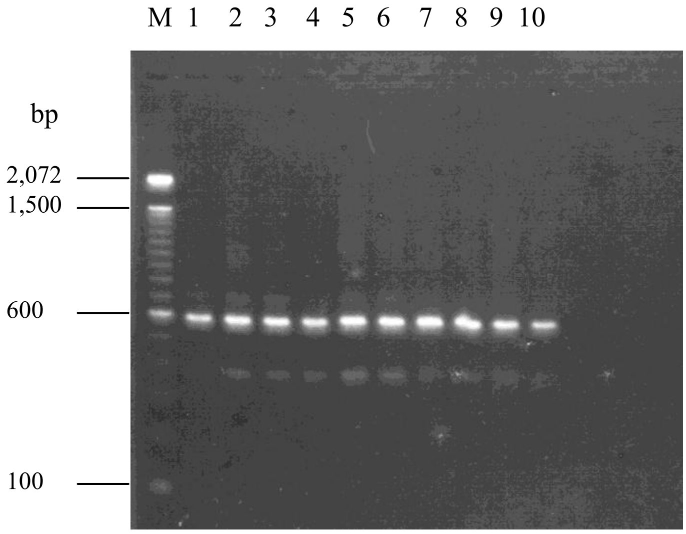
M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 36 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ H07

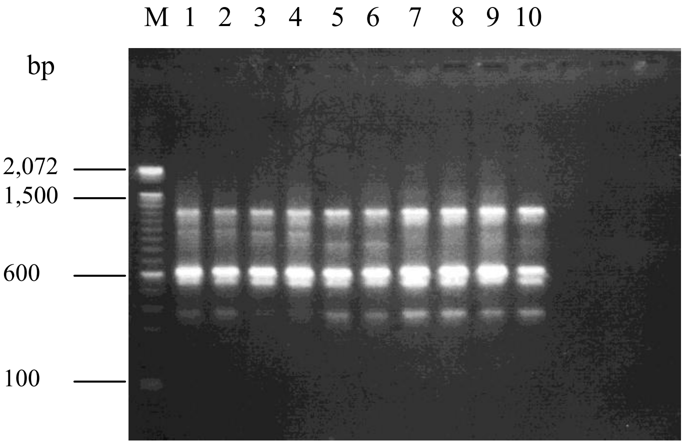
M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศ สปป. ลาว ตัวอย่างที่ 5

ตัวอย่างหมากจอง ประเทศมาเลเซีย


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

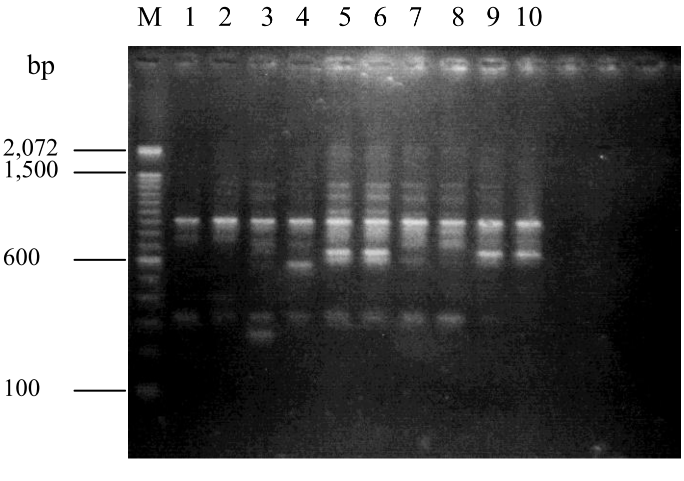
ภาพที่ 37 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A02

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

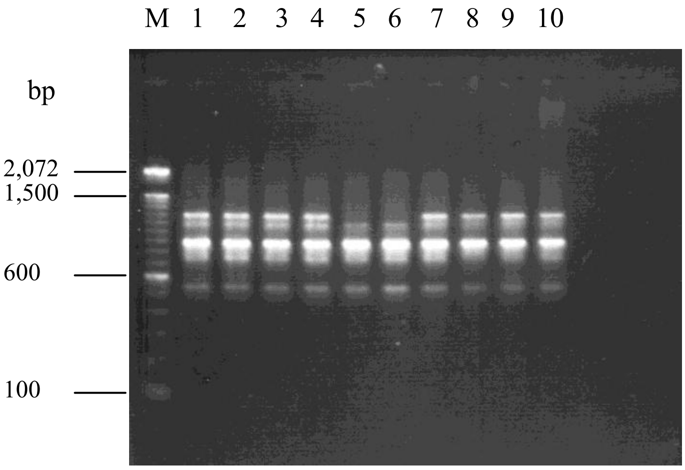
ภาพที่ 38 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A03

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

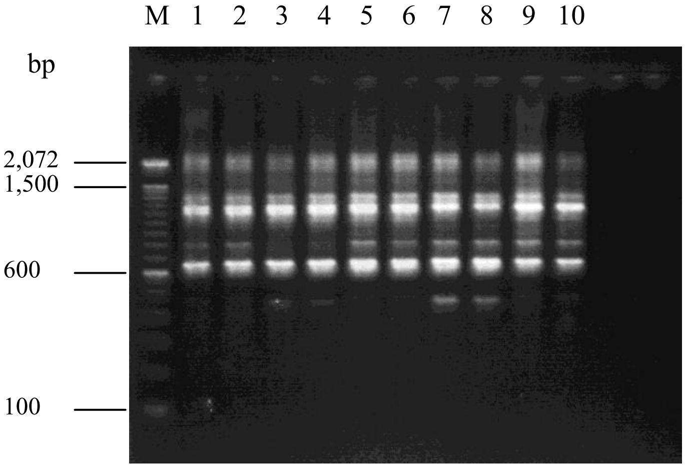
ภาพที่ 39 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A08

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

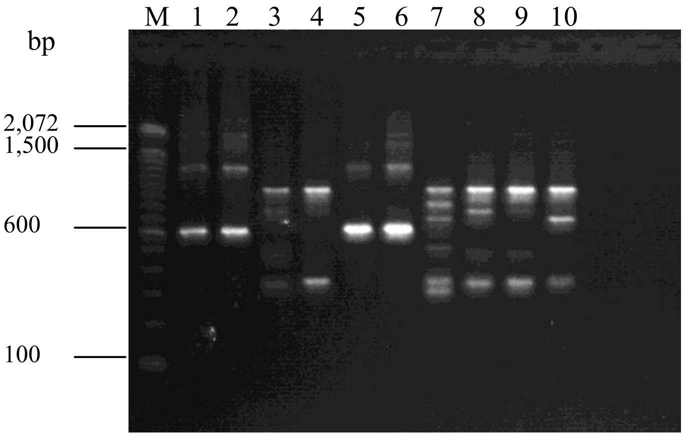
ภาพที่ 40 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A09

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

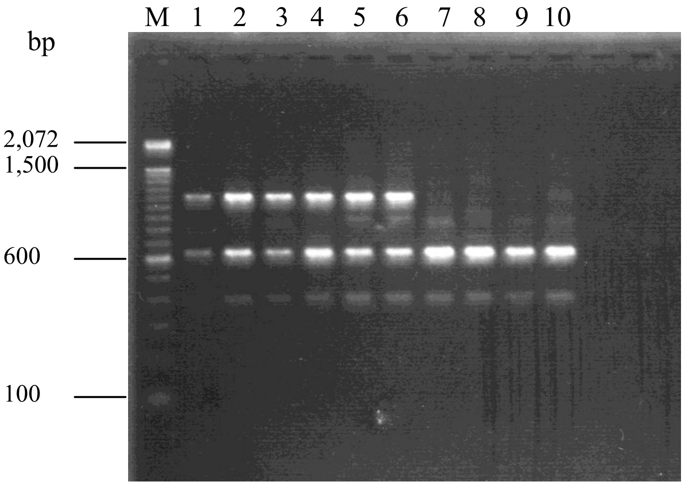
ภาพที่ 41 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A13

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

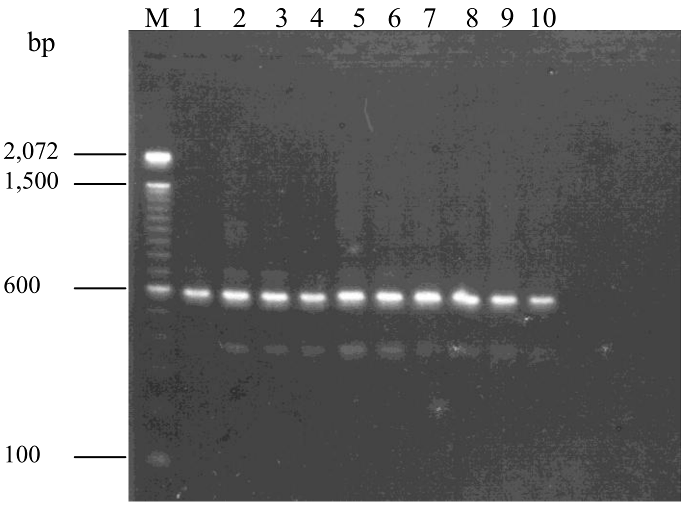
ภาพที่ 42 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A18

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

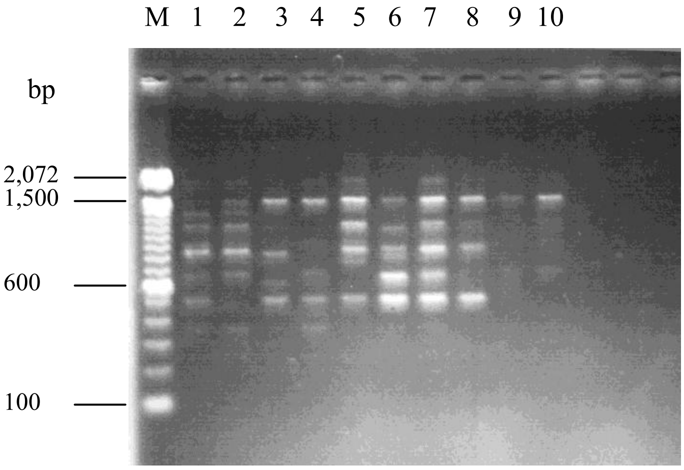
ภาพที่ 43 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ B01

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 44 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ C06

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 5


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
2,072
1,500
600
100

ภาพที่ 45 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ H07

M = 100bp DNA ladder
1-2 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 1
3-4 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 2
5-6 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 3
7-8 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 4
9-10 = หมากจองจากประเทศมาเลเซีย ตัวอย่างที่ 5

ภาคผนวก ง

จำนวนและตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นแต่ละไพรเมอร์ในทุกตัวอย่างของหมากจอง

ไพรเมอร์ A02

Primer	ตัวอย่าง / ขนาด	Ub1	Ub2	Ub3	Ub4	Ub5	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ka1	Ka2	Ka3	Ka4	Ka5	Lao1	Lao2	Lao3	Lao4	Lao5	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5
A02	1900	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	1800	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	1200	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	600	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	500	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	350	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	ตำแหน่งแถบ ดีเอ็นเอรวม : 9	จำนวนแถบดีเอ็นเอ็นที่เกิดขึ้นทั้งหมด : 102																								

ไพรเมอร์ A03

Primer	ตัวอย่าง / ขนาด	Ub1	Ub2	Ub3	Ub4	Ub5	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ka1	Ka2	Ka3	Ka4	Ka5	Lao1	Lao2	Lao3	Lao4	Lao5	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5
A03	1500	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	550	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	400	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	300	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	ตำแหน่งแถบ ดีเอ็นเอรวม : 9	จำนวนแถบดีเอ็นเอ็นที่เกิดขึ้นทั้งหมด : 120																								

ไพรเมอร์ A08

Primer	ตัวอย่าง ขนาด	Ub1	Ub2	Ub3	Ub4	Ub5	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ka1	Ka2	Ka3	Ka4	Ka5	Lao1	Lao2	Lao3	Lao4	Lao5	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5
A08	1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	800	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	750	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
	500	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	350	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	320	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ตำแหน่งแถบ ดีเอ็นเอรวม : 12	จำนวนแถบดีเอ็นเอ็นที่เกิดขึ้นทั้งหมด : 119																								

ไพรเมอร์ A09

Primer	ตัวอย่าง ขนาด	Ub1	Ub2	Ub3	Ub4	Ub5	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ka1	Ka2	Ka3	Ka4	Ka5	Lao1	Lao2	Lao3	Lao4	Lao5	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5
A09	1800	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	1250	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
	1150	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	600	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	500	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ตำแหน่งแถบ ดีเอ็นเอรวม : 12	จำนวนแถบดีเอ็นเอ็นที่เกิดขึ้นทั้งหมด : 109																								

ไพรเมอร์ A13

Primer	ตัวอย่าง ขนาด	Ub1	Ub2	Ub3	Ub4	Ub5	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ka1	Ka2	Ka3	Ka4	Ka5	Lao1	Lao2	Lao3	Lao4	Lao5	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5
A13	2072	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1200	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	250	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอรวม : 9	จำนวนแถบดีเอ็นเอ็นที่เกิดขึ้นทั้งหมด : 138																								

ไพรเมอร์ A18

Primer	ตัวอย่าง ขนาด	Ub1	Ub2	Ub3	Ub4	Ub5	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ka1	Ka2	Ka3	Ka4	Ka5	Lao1	Lao2	Lao3	Lao4	Lao5	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5
A18	2072	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
	1800	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
	1300	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1200	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
	900	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
	800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
	500	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	400	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	300	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
	ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอรวม : 11	จำนวนแถบดีเอ็นเอ็นที่เกิดขึ้นทั้งหมด : 112																								

ไพรเมอร์ B01

Primer	ตัวอย่าง ขนาด	Ub1	Ub2	Ub3	Ub4	Ub5	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ka1	Ka2	Ka3	Ka4	Ka5	Lao1	Lao2	Lao3	Lao4	Lao5	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5
B01	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
	450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอรวม : 6	จำนวนแถบดีเอ็นเอ็นที่เกิดขึ้นทั้งหมด : 86																								

ไพรเมอร์ C06

Primer	ตัวอย่าง ขนาด	Ub1	Ub2	Ub3	Ub4	Ub5	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ka1	Ka2	Ka3	Ka4	Ka5	Lao1	Lao2	Lao3	Lao4	Lao5	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5
C06	2072	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	750	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	650	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอรวม : 5	จำนวนแถบดีเอ็นเอ็นที่เกิดขึ้นทั้งหมด : 63																								

ไพรเมอร์ H07

Primer	ตัวอย่าง ขนาด	Ub1	Ub2	Ub3	Ub4	Ub5	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ka1	Ka2	Ka3	Ka4	Ka5	Lao1	Lao2	Lao3	Lao4	Lao5	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5
H07	2072	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
	1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	1100	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	1000	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
	650	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
	ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอรวม : 7	จำนวนแถบดีเอ็นเอ็นที่เกิดขึ้นทั้งหมด : 77																								