บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ตัวอย่างใบสมุนไพรจำนวน 48 ตัวอย่าง สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอ โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการสร้าง phylogenetic tree จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้แก่โปรแกรม NTSYS pc version 2.0 (Rohlf, 1998)

2. การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร

2.1 เก็บตัวอย่างใบของพืชสมุนไพรในเขตห้ามล่าสัตว์ป่าซับลังกา ตามเส้นทางศึกษาธรรมชาติตามแนวทางเดินป่าไปน้ำตกผาผึ้งจำนวนทั้งหมด 48 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพืชสมุนไพรป่าซับลังกาตามแนวทางเดินป่าไปน้ำตกผาผึ้ง

ลำดับ	ชื่อ	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	เฟิร์นปีกนก	*Pteris semipinnata L.*
3	มะปราง	*Pteris semipinnata* L.
4	มะปราง	*Pteris semipinnata* L.
5	ฟักข้าว	*Momordica cochinchinensis* Spreng.
6	ฟักข้าว	*Momordica cochinchinensis* Spreng.
7	มะฝ่อ	*Trewia nudiflora* L.
8	มวกขาว	*Xylinbaria minutiflora* Pierre.
9	มวกขาว	*Xylinbaria minutiflora* Pierre.
10.	ตาว	*Arenga pinnata* (Wurmb) Merr
11.	กำแพงเจ็ดชั้น	*Salacia chinensis* L.
12.	พญาไฟ	*Piper chaba* Hunt
13	กระพี้จั่น	*Millettia brandisiana* Kurz
14.	เข็มป่า	*lxora cibdela* Craib

ลำดับ	ชื่อ	ชื่อวิทยาศาสตร์
15.	เถากระไดลิง	*Bauhinia bracteata* (Graham ex Benth.) Baker
16.	หญ้าไฟป่า	*Elephantopus scaber* Linn.
17.	มะดูก	*Siphonodon celastrineus* Griff.
18.	หางไรแดง	*Derris elliptica* (Roxb.) Benth.
19.	ว่านขันหมาก	*Aglaonema modestum*
20.	กระเบียน	*Hydnocarpus ilicifolius* King
21.	กระตังใบ	*Leea indica* Merr.
22.	ยางนา	*Dipterocarpus alatus* Roxb.ex G.Don
23.	ปลู่	*Alangium salviifolium (L.f.)Wang., subsp. hexapetalum (Lam.)Wang*
24	พระเจ้า 5 พระองค์	Dra-Contomelon Dao
25	กระเบา	*Hydnocarpus wrayi* King
26.	ข่อยหยอง	*Streblus ilicifolius* (Vidal) Corner
27.	ตะเคียนทอง	*Hopea odorata* Roxb.
29.	ราชพฤกษ์	*Cassia fistula*
30.	อโศกน้ำ	*Saraca indica* Linn.
31.	หญ้าน้ำดับไฟ	*Lindenbergia philippensis* (cham.) Benth
32.	ชิงชี่	*Capparis micracantha* DC
33.	เถาวัลย์น้ำ	*Cissus repanda* Vahl
34.	หูกวางป่า	*Terminalia catappa* L.
35.	ชะพลู	*Piper sarmentosum* Roxb
36.	ดีหมี	*Cleidion spiciflorum (Burm.f) Merr.*
37.	คนทา	*Harrisonia perforata* Merr.
38.	แดงดง	*Xylia xylocarpa* Taub
39	แดงดง	*Xylia xylocarpa* Taub
40.	คนทา	*Harrisonia perforata* Merr.
41.	ตีนนก	*Vitex pinnata* L. f.
42.	ย่านาง	*Tiliacora triandra* Diels

ลำดับ	ชื่อ	ชื่อวิทยาศาสตร์
43.	นางแย้ม	*Clerodendron fragrans* Vent.
44.	มะเขือพวง	*Solanum Torvum* Sw.
45.	ชะแป้ง	*Callicarpa arborea* Roxb
46.	กำแพงเจ็ดชั้น	*Salacia chinensis* L.
47.	พญาไฟ	*Piper chaba* Hunt
48.	ม้าแม่กล่ำ	*Polygala crotalarioides*

3. การเตรียมดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างพืชมาสกัด DNA โดยใช้วิธีที่ประยุกต์จาก agrawal และคณะ (1992) ดังนี้

1). นำใบอ่อนของสมุนไพรประมาณ 2 กรัม มาตัดก้านใบออกแล้วตัดแผ่นใบเป็นชิ้นเล็กๆ บดในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด

2). นำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี Extraction buffer 800 ไมโครลิตร และ 2-mercaptoethanol 70 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ

3). นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที กลับหลอดไปมา ทุกๆ 10 นาที

5). นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

6). ใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายที่อยู่ส่วนบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติมสารละลาย chorofrom isoamyl 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำกัน 2 ครั้ง

7). นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและ chlorofrom ออกจากกัน

8). ใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายที่อยู่ส่วนบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่เติม isopropanol ที่แช่เย็น 2 ใน 3 เท่าของปริมาตรของสารละลายทั้งหมดที่มีอยู่

9). นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

10). นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

11). เทส่วนใสทิ้ง เติม Alcohol 70% 200 ไมโครลิตร

12). นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที

13). เทสารละลายออก ปล่อยไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที หรือ

จนกว่าไม่มีกลิ่น Alcohol

14). ละลายตะกอน DNA โดยการเติม TE buffer

15). ใส่ RNase A 3 ไมโครลิตร บ่มไว้ข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส

16). นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

17). ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 7-13

18). เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ต่อไป

3.1 การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอ

3.1.1 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่า optical density (OD) ซึ่งเป็นค่าการดูดแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร และช่วงคลื่น 280 นาโนเมตรโดยใช้ spectrophotometer สูตรในการคำนวณมีดังนี้

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (μg/ml) = OD_{260} x 50μg/ml x dilution factor

การวัดค่าการดูดแสงของดีเอ็นเอจะวัดที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{280}) ด้วยเพื่อใช้ในการคำนวณอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ถ้าค่า OD_{260} / OD_{280} อยู่ระหว่าง 1.7-1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้บริสุทธิ์ถ้าอัตราส่วนสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอเจือปน

3.1.2 แยกขนาดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอร่วมกับ เอธิเดียมโบรไมด์มีวิธีการดังนี้

เตรียมอะกาโรสเจล 0.8% โดยชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม ใส่ TAE buffer 100 มิลลิลิตร (4.84 g Tris-base, 1.15 ml glacial acetic acid, 2 ml 0.5 M EDTA pH 8.0) ละลายผงอะกาโรสโดยใช้ความร้อนต้มจนเดือด เพื่อให้อะกาโรสหลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปล่อยให้สารละลาสมุนไพระกาโรสเย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงในพิมพ์ให้เจลมีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศวางหวีเสียบลงที่ปลายด้านบนของแผ่นเจล ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง แล้วดึงหวีออกจะได้ช่องสำหรับใส่ตัวอย่างสารละลาย

ดีเอ็นเอ นำเจลออกจากถาดแล้วนำไปใส่ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส ให้ด้านที่มีช่องอยู่ใกล้ขั้วลบ และเติม TAE buffer ให้ท่วมแผ่นเจลพอสมควร ผิวเจลควรอยู่ใต้สารละลายประมาณ 1-2 มิลลิเมตร จากนั้นผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วนดีเอ็นเอ 5 ต่อโหลดดิงบัฟเฟอร์ 1 แล้วนำไปใส่ในช่องตรงร่องหวีด้วยไมโครปิเปตและ ใส่สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb DNA ladder marker) ที่ทราบขนาดและ ความเข้มข้น เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอลงในช่องหวีเช่นกัน ปิดฝาเครื่องและเปิดกระแสไฟฟ้าให้วิ่งผ่าน จากขั้วลบไปขั้วบวกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ปิดกระแสไฟฟ้า เมื่อสีของโหลดดิงบัฟเฟอร์เคลื่อนที่ไปได้ระยะทางที่ต้องการใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide 0.5 μg/ml) ประมาณ 10 นาทีแล้วนำแผ่นเจลไปล้างด้วยน้ำประปาประมาณ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้ UV transilluminator บันทึกภาพโดยใช้กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์ที่มีแผ่นกรองแสงสีแดงอยู่ด้วย เปรียบเทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี

3.2.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter

นำสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรของสารในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ (100 ng/μl) 2.50 ไมโครลิตร 5X Reaction buffer 5.0 ไมโครลิตร *Eco*RI (10U/μl) 0.25 ไมโครลิตร *Mse*I (5U/μl) 0.25 ไมโครลิตร รวมปริมาตรทั้งหมด 25.00 ไมโครลิตร นำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (1X reaction buffer ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate และ 50 mM potassium acetate) จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาเติมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter ซึ่งประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ 25 ไมโครลิตร *Eco*RI adapter (5 pmole/μl) 1 ไมโครลิตร *Mse*I adapter (25 pmole/μl) 2 ไมโครลิตร 5x T4 ligase buffer 10 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (1U/μl) 1 ไมโครลิตรน้ำกลั่น 11 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร นำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและบ่มต่อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ลำดับเบสของ adapter แต่ละชนิดมีดังนี้

*Eco*RI adapter 5′ -CTCGTAGACTGCGTACC-3′
3′-CATCTGACGCATGGTTAA-5′
*Mse*I adapter 5′ -GACGATGAGTCCTGAG-3′
3′-TACTCAGGACTCAT-5′

3.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์มี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกคือ preselective amplification ขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัวที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้และมีความเฉพาะในชั้นหนึ่งก่อน ไพรเมอร์ที่ใช้มีดังนี้

*Eco*RI primer +1 (E-A) 5′ -GACTGCGTACCAATTCA-3′
*Mse*I primer +1 (M-C) 5′-GATGAGTCCTGAGTAAC-3′

สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร primer E-A (5 pmole/μl) 1 ไมโครลิตร primer M-C (5 pmole/μl) 1 ไมโครลิตร dNTP mix (2mM) 2.5 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50mM) 0.75 ไมโครลิตร *Taq* polymerase (5 U/μl) 0.1 ไมโคร ลิตร น้ำกลั่น 15.15 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมแล้วเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาคือ

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที } ทำซ้ำ 20 รอบ
Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

เมื่อพีซีอาร์ในขั้น preselective amplification แล้ว แบ่งสารละลายดีเอ็นเอมาทำให้เจือจาง 20 เท่าด้วยสารละลาย TE สำหรับเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณขั้นต่อไป ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้นที่สองคือ selective amplification ขั้นตอนนี้จะเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ เพื่อให้เกิดการคัดเลือกการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วน คู่ผสมของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่คัดเลือกแล้ว มีจำนวน 11 คู่ ดังนี้

M-CAC / E-AAC
M-CTT / E-AGC

M-CAA / E-AAC

M-CTC / E-ACC

M-CAC / E-AGG

M-CTT / E-ACA

M-CAT / E-AAC

M-CTC / E-AAC

M-CAC / E-ACG

M-CTT / E-AGG

M-CTC / E-AGG

สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านขั้น preselective amplification 5 ไมโครลิตร primer E-ANN (5 pmole/μl) 1 ไมโครลิตร primer M-CNN (5 pmole/μl) 1 ไมโครลิตร dNTP mix (2mM) 2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50mM) 0.6 ไมโครลิตร *Taq* polymerase (5 U/μl) 0.1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 8.3 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยโปรแกรม touch down ซึ่งใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาคือ

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 1 รอบ

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

โดยจะลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และทำปฏิกิริยาต่อคือ

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที } 23 รอบ

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

จากนั้นนำดีเอ็นที่ผ่านขั้นตอน selective amplification แล้วไปวิเคราะห์

3.2.3 การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel

3.2.3.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกระจก กระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกระต่าย เช็ดให้ทั่วด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองโดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่คงที่ ใช้เทปกาวติดกระจก 3 ด้านเพื่อกันไม่ให้เจลรั่วซึม

3.2.3.2 การเตรียม polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ มีส่วนผสมประกอบด้วย 30% acrylamide (acrylamide : bisacrylamide 19:1) 6 มิลลิลิตร ยูเรีย (7.5 โมลาร์) 13.5 กรัม น้ำกลั่น 7.5 มิลลิลิตร 10% APS (ammonium persulfate) 300 ไมโครลิตร TEMED (N, N ,N′,N′- tetramethylenediamine) 15 ไมโครลิตร สำหรับวิธีการเตรียมโดยผสม acrylamide บัฟเฟอร์ TBE น้ำ และยูเรียในบีกเกอร์เขย่าเบา ๆ ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ให้ยูเรียละลายหมด รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณอุณหภูมิห้อง แล้วเติม 10% APS (ชั่งใน tube 1.5 หุ้มด้วย foil เวลาใช้เติมน้ำกลั่น 200 µl) และ TEMED เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ใส่หวีลงไปด้านบน วางกระจกให้ด้านบนเอียงทำมุมกับแนวระดับประมาณ 30 องศา เพื่อป้องกันการไหลซึมของเจล ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง ถ้าจะปล่อยเจลไว้ข้ามคืน ควรใช้แผ่นใส่อาหารปิดด้านบนของเจลไว้เพื่อให้มีความชื้น

3.2.3.3 นำดีเอ็นที่ผ่านขั้นตอน selective amplification ไปแยกขนาดโดย electrophoresis และย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ดัดแปลงจากวิธีของ Benbouza *et al.* (2006) โดยมีขั้นตอนคือ

1) นำกระจกที่มีเจลติดอยู่ แช่ใน fixatieves (95% เอทานอล 33 มิลลิลิตร กรดอะซิติกเข้มข้น 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 265.5 มิลลิลิตร: เตรียมแล้วแช่ใน 4 องศา) 5 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า

2) เตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$ 0.38 กรัม เติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และฟอร์มาลดีไฮด์ 0.4 มิลลิลิตร) นำกระจกมาแช่เป็นเวลา 5-7 นาทีเขย่าเบาๆ อย่างต่อเนื่อง

3) นำกระจกมาจุ่มในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปใส่ในสารละลาย developer (น้ำ 250 มิลลิลิตร, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม และฟอร์มาลดีไฮด์ 0.6 มิลลิลิตร) เขย่าจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน

4) แช่กระจกใน fixatives (เตรียมแล้วแช่ใน 4 องศา) 2 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

4. การวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี และเทคนิคเอสอาร์เอพีของทั้งสองการทดลองมาวิเคราะห์หาความหลากหลาย โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างถ้ามีแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์ “1” ถ้าไม่มีแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์ “0” แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างโดยใช้โปรแกรม NTSYS pc version 2.0e (Rohlf, 1997) จากนั้นคำนวณหาดัชนีความเหมือนและจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี unweighted pair group method of average (UPGMA) แสดงผลในรูปแบบของ phylogenetic tree และหาค่า Bootstrap ด้วยโปรแกรม PUAP* pc Version 4 (Swofford, 2002)

5. สูตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

1). สูตรในการคำนวณหาดัชนีความเหมือนของ Nei and Lei (1979) คือ

$$S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i+N_j)$$

เมื่อ S_{ij} = ดัชนีความเหมือนทางทางพันธุกรรม
N_i = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันทั้งตัวอย่างที่ i และ j
N_j = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะที่ตัวอย่าง j

2). สูตรในการคำนวณหาค่า Polymorphic Information Content: PIC (Ott, 1991) คือ

$$H = 1 - \sum P_i^2$$

เมื่อ P_i = ความถี่ของแอลลีล (allele) ที่ i ซึ่ง P_i ประกอบด้วย P_A และ P_P

P_A = ความถี่ของแอลลีลที่ไม่ปรากฏ (absent allele)

P_P = ความถี่ของแอลลีลที่ปรากฏ (present allele) ณ ตำแหน่งเดียวกัน

สถานที่ทำการศึกษา

ห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ระยะเวลาในการศึกษา

เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 – กันยายน 2552