

## ภาคผนวก

### การเตรียม buffer และสารละลายเข้มข้น

#### 1. Extraction buffer

- 1.1 4% (w/v) CTAB
- 1.2 1% (w/v) PVPP
- 1.3 100mM Tris-HCl pH 8.0
- 1.4 1.4M NaCl
- 1.5 20mM EDTA
- 1.6 dH<sub>2</sub>O (น้ำกลั่นที่ผ่านการ autoclave เสร็จแล้ว)
- 1.7 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol

ผสมสาร 1.1-1.6 เข้าด้วยกันปั่นด้วย magnetic stirrer จนแน่ใจว่าสารละลายผสมกัน ก่อนนำไปใช้เติม 2-mercaptoethanol ลงไป เนื่องจากสารละลายนี้สามารถระเหยได้

#### 2. 50X Tris acetate buffer (50X TAE buffer)

- |                         |          |
|-------------------------|----------|
| 2.1 Tris base           | 242 g    |
| 2.2 glacial acetic acid | 57.1 ml. |
| 2.3 0.5M EDTA pH 8.0    | 100 ml.  |

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml. นำไป autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 3. 5X Tris borate buffer (50X TBE buffer)

- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| 3.1 Tris base         | 54 g     |
| 3.2 boric acid        | 27.5 ml. |
| 3.3 0.5mM EDTA pH 8.0 | 20 ml    |

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml. นำไป autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 4. Loading buffer

4.1 0.25% (w/v) bromophenol blue

4.2 0.25% (w/v) xylene cyanol FF

4.3 40% (w/v) sucrose

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกันแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ตามต้องการด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไป autoclave เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

#### 5. DNA sequencing stop solution

5.1 98% (v/v) formamide

5.2 10mM EDTA

5.3 0.001% (w/v) bromophenol blue

5.4 0.001% (w/v) xylene cyanol FF

ผสมสารทั้งสี่ชนิดเข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรให้ได้ตามต้องการด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไป autoclave เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

#### 6. 40% polyacrylamide (19:1)

6.1 acrylamide 38 g

6.2 bis-acrylamide 2 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ autoclave แล้วให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 ml. ข้อควรระวังเวลาเตรียมสารละลาย polyacrylamide เป็นอันตรายต่อระบบประสาท (neurotoxin) ทั้งที่ยังเป็นผง และเมื่อเป็นสารละลาย ในการเตรียมทุกครั้งควรใช้ผ้าปิดจมูก และสวมถุงมือ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

#### 7. 4.5% polyacrylamide

7.1 40% polyacrylamide 11.25 ml.

7.2 7M urea 42 g.

7.3 5x TBE 20 ml.

ผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนเพื่อให้ urea ละลายได้ดี ใช้ dH<sub>2</sub>O ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml. เมื่อละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำสารละลายมากรองก่อนปล่อยให้หายร้อนก่อน (สารละลายนี้โดนแสงแล้วทำปฏิกิริยาทำให้เสื่อมสภาพเร็ว) เก็บเข้าที่อุณหภูมิ 4°C (ควรสวมถุงมือทุกครั้งเตรียมสารละลาย)

## 8. 10% Ammonium persulfate (APS)

8.1 APS 1 g.

8.2 ผสมกับน้ำกลั่นเพื่อปรับให้ได้ปริมาตร 10 ml. ผสมให้เข้า เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

## 9. 0.5% Acetic acid / 95% ethanol alcohol (EtOH)

9.1 acetic acid 0.250 ml.

9.2 ปรับปริมาตรด้วย 95% EtOH ให้เป็น 50 ml. เก็บในอุณหภูมิ 4°C

## 10. Fixer/Stop solution

10.1 acetic acid 50 ml.

10.2 น้ำกลั่น 450 ml.

## 11. Silver staining solution

11.1 silver nitrate 0.5 g

11.2 37% formaldehyde 0.75 ml.

11.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 500 ml. เก็บในที่มืดและควรเตรียมใหม่เสมอก่อนใช้

## 12. Developer solution

12.1 sodium carbonate 15 g.

12.2 37% formaldehyde 0.75 ml.

12.3 sodium thiosulfate 0.4 ml (จาก stock 10 mg/ml.)

ผสมให้เข้ากันเป็นสารละลาย เสร็จแล้วใส่แช่เย็นไว้ก่อนใช้ให้อุณหภูมิประมาณ 10°C และควรเตรียมใหม่เสมอก่อนใช้

ตาราง 1 แสดงการให้คะแนน polymorphic bands โดยการใช้เทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 9 พันธุ์

| รายชื่อพันธุ์ลำไย | การให้คะแนน polymorphic bands |                      |                           |
|-------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------------|
|                   | OPAK10                        | OPAK14               | OPAK10                    |
| เพชรสาร           | 001100111101000101001         | 010110110101011110   | 00010100011111000010010   |
| พวงทอง            | 000001000101000010100         | 10000000010011000000 | 0001010010010010000110000 |
| ปิงปอง            | 001100111010100101001         | 01010011100100110    | 1000010000001110100001001 |
| เบ๊วยเขียว        | 001010000101000010100         | 0000101000100010000  | 00010110000101001100010   |
| แห้ว              | 000001000101000010110         | 0000110001000100000  | 0000100010001001010010    |
| สีชมพู            | 100010000101010010110         | 0000110001001100000  | 000101001001001001110010  |
| ฮกเกี้ยน          | 010100100101001001001         | 0011100010000000000  | 00001000000101001000100   |
| เวียงนาม          | 001001000101000101001         | 01011111101100010    | 10001001011011011101010   |
| ถิ่นจ้            | 001001000101000010111         | 000011001000000001   | 01010110001101101010010   |

1 = สัญลักษณ์แทนการปรากฏแถบดีเอ็นเอ

0 = สัญลักษณ์แทนการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ตาราง 1 (ต่อ) แสดงการใช้คะแนน polymorphic bands โดยการใช้เทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 9 พันธุ์

| รายชื่อพันธุ์ลำไย | การใช้คะแนน polymorphic bands |                         |                           |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------|---------------------------|
|                   | OPD20                         | OPG13                   | OPH13                     |
| เพชรสาคร          | 1101100101000001              | 01001001001001011100000 | 0000101000100010010101110 |
| พวงทอง            | 1001101010000010              | 0100100100000010000100  | 000010100010001001010110  |
| ปิงปอง            | 010110100010101               | 0000000001001010000000  | 0000101000010101000001    |
| เป็ดเขียว         | 110111011000010               | 01001001100000011000101 | 010010100010001001010010  |
| แก้ว              | 110111000000010               | 01001001100010010000100 | 000010100010001001010000  |
| สีชมพู            | 111111010101010               | 10000101110000100001010 | 01010101011010010010010   |
| ฮกเกี้ยน          | 110111011001010               | 00110011000100011001000 | 11010101010001000100110   |
| เวียดนาม          | 1101110100000101              | 00010001101001011110100 | 1010101010100101010110    |
| ถิ่นเจ้า          | 1101111010000010              | 01001000101000011000101 | 0100101000100010001001010 |

1 = สัญลักษณ์แทนการปรากฏแถบดีเอ็นเอ

0 = สัญลักษณ์แทนการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ตาราง 2 แสดงการให้คะแนน polymorphic bands โดยการใช้เทคนิค AFLP กับลำไย 9 พันธุ์

| รายชื่อพันธุ์ลำไย | การให้คะแนน polymorphic bands |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------------|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                   | E+ACT/M+CAT                   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| เพชรสาคร          | 0                             | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| พวงทอง            | 0                             | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ปิงปอง            | 0                             | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| เบญจเทวี          | 0                             | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| แก้ว              | 0                             | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| สีชมพู            | 0                             | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| ฮกเกี้ยน          | 0                             | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| เวียงนาม          | 0                             | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| ลิ้นจี่           | 0                             | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |

1 = สัญลักษณแทนการปรากฏแถบดีเอ็นเอ

0 = สัญลักษณแทนการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ



ตาราง 3 (ต่อ) แสดงการให้คะแนน polymorphic bands โดยการใช้เทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 20 พันธุ์

| รายชื่อพันธุ์ลำไย | การให้คะแนน polymorphic bands |                           |                          |                 |                     |                     |                     |                     |
|-------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                   | OPW09                         | OPW06                     | OPX01                    | OPX15           | OPT15               |                     |                     |                     |
| คอ                | 10110001000010111000          | 0000110000100010000011000 | 110101110110110000101101 | 110110000101101 | 1010001000000110001 | 1010001000000110001 | 1010001000000110001 | 1010001000000110001 |
| ลิ้นหนู           | 10100001000010111000          | 000011000010001000011000  | 100101010110110100001101 | 110110100001101 | 1010001000000110001 | 1010001000000110001 | 1010001000000110001 | 1010001000000110001 |
| เม็ดบัวขาว        | 0011001010000001011           | 00101000110001100011000   | 000000000110110001001101 | 110110001001101 | 1100001000000110001 | 1100001000000110001 | 1100001000000110001 | 1100001000000110001 |
| พวงทอง            | 10100101100100110010          | 000011000010111000011011  | 110111110001010101111    | 110110100101111 | 1010001000000110001 | 1010001000000110001 | 1010001000000110001 | 1010001000000110001 |
| คอเขียดราย 13     | 1011001000010111000           | 000011000010001000011000  | 11010101000100000001101  | 100000000101101 | 10100000000011000   | 10100000000011000   | 10100000000011000   | 10100000000011000   |
| นรภิรมย์          | 00100010001001101100          | 00001100001000100010000   | 11111110100010100011000  | 100010001101001 | 1000000000011000    | 1000000000011000    | 1000000000011000    | 1000000000011000    |
| คอน่าน            | 0011001000010111000           | 000011000010001000011000  | 10010011001001000011000  | 10011000101101  | 1010000000011000    | 1010000000011000    | 1010000000011000    | 1010000000011000    |
| กะทิก             | 0111001010000001011           | 0000110000101000011000    | 100011000101000011000    | 110111010001101 | 110001100000011000  | 110001100000011000  | 110001100000011000  | 110001100000011000  |
| ถันดี             | 0010001000000001011           | 00001100001000100011000   | 00000000011011100001101  | 11011100001101  | 100001000000011000  | 100001000000011000  | 100001000000011000  | 100001000000011000  |
| พวงทอง 05         | 10100101100100110010          | 00001100001110100111011   | 110111110001010010111    | 110110100101111 | 111001000000011000  | 111001000000011000  | 111001000000011000  | 111001000000011000  |
| แห้ว              | 0010100100000110000           | 00010000110001000011000   | 000000010010000001101    | 10011000011101  | 11100000000011000   | 11100000000011000   | 11100000000011000   | 11100000000011000   |
| เพชรสาร           | 01100010001001101100          | 000010000010001100010000  | 11101010000100010001101  | 110101000101001 | 1000000000011000    | 1000000000011000    | 1000000000011000    | 1000000000011000    |
| คอหังรังวัด 46    | 0010110100001011000           | 000011000010001000011000  | 11101011000100010001101  | 11011000011100  | 11100000000011000   | 11100000000011000   | 11100000000011000   | 11100000000011000   |
| คอลำพูน 01        | 1011001000010101000           | 00001100001000100011000   | 1001011100100010001101   | 110110000101101 | 10100000000011000   | 10100000000011000   | 10100000000011000   | 10100000000011000   |
| คอนครพนม          | 0011001000010101000           | 000011000010001000011000  | 1001001100100010001101   | 1001000101101   | 10100000000011000   | 10100000000011000   | 10100000000011000   | 10100000000011000   |
| คอหลวง            | 00101101000010111000          | 000011000010001000011000  | 1001001000100010001101   | 1001000101101   | 10100000000011000   | 10100000000011000   | 10100000000011000   | 10100000000011000   |
| บึงป่อง           | 0100000001001001100           | 01100001001000100010100   | 111001010010001000101    | 1101000100101   | 1000000000011000    | 1000000000011000    | 1000000000011000    | 1000000000011000    |
| สากก้น            | 0010001000001111000           | 000011000110001000010000  | 11110101000100010001101  | 110100010001101 | 1010000000011000    | 1010000000011000    | 1010000000011000    | 1010000000011000    |
| คอสุพน            | 10101101000010111000          | 00001100001111001000011   | 1001001100100010001101   | 11011100011101  | 1010000000011000    | 1010000000011000    | 1010000000011000    | 1010000000011000    |
| เขียดนาม          | 0110000100101111000           | 10100000010011100011000   | 10110111000100010001101  | 110100010001101 | 100011000000011000  | 100011000000011000  | 100011000000011000  | 100011000000011000  |

1 = สัญลักษณ์แทนการปรากฏแถบสีเข้ม

0 = สัญลักษณ์แทนการไม่ปรากฏแถบสีเข้ม

## ประวัติผู้เขียน

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อ              | นางสาวเจนจิรา มาหา                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| วัน เดือน ปี      | 7 ตุลาคม พ.ศ. 2516                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| ประวัติการศึกษา   | สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนนารีนุกูล<br>จ. อุบลราชธานี ปีการศึกษา 2531<br>สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนลือคำหาญวารินชำราบ<br>จ. อุบลราชธานี ปีการศึกษา 2534<br>สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)<br>สาขาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรและอุตสาหกรรมเทคโนโลยี<br>สถาบันราชภัฏอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี ปีการศึกษา 2538 |
| ประวัติการทำงาน   | - การฝึกงานในระดับปริญญาตรี สถานีทดลองหม่อนไหม<br>กรมวิชาการเกษตร กิ่งอำเภอ สว่างวีระวงศ์ จ. อุบลราชธานี<br>- สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ กรป. กลาง อ. โพนยางคำ จ. สกลนคร                                                                                                                                                                                  |
| ประวัติในการทำงาน | - ตำแหน่งนักเกษตร กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ กองส่งเสริมพืชสวน<br>กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์<br>- ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย หน่วย DNA fingerprinting<br>ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีทางการเกษตร มหาวิทยาลัย<br>เกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม                                                                             |
| ทุนการศึกษา       | โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากร<br>ชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) 2542-2543                                                                                                                                                                                                                                                  |
| ที่อยู่           | 203 ถ.วารินฯ-พิบูลฯ ต. วารินชำราบ อ. วารินชำราบ<br>จ. อุบลราชธานี 34190<br>โทร. (045) 321673                                                                                                                                                                                                                                                         |