

ผลงานฉบับเต็ม

ของ

นางสาว สุภาพ สุนทรนนท์

ตำแหน่งนักวิชาการเกษตร 7ว

ตำแหน่งเลขที่ 1032

กลุ่มวิจัยพัฒนารณาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร 8ว

ตำแหน่งเลขที่ 1032

กลุ่มวิจัยพัฒนารณาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลงานฉบับเต็ม

ของ

นางสาว สุภาพ สุนทรนนท์

ตำแหน่งนักวิชาการเกษตร 7ว

ตำแหน่งเลขที่ 1032

กลุ่มวิจัยพัฒนารานาการเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ



ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร 8ว

ตำแหน่งเลขที่ 1032

กลุ่มวิจัยพัฒนารานาการเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมในระดับ DNA ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า*

Molecular Characterization of commercial *Dendrobium* sp. Using RAPD and ISSR markers

สุภาพ สุนทรนนท์¹

จงวัฒนา พุ่มหิรัญ²

กลุ่มงานวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมในระดับ DNA ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า ได้ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี ทำการทดลองศึกษากล้วยไม้ที่ปลูกในเขตกรุงเทพฯ และจังหวัดใกล้เคียงเช่น ปทุมธานี นนทบุรี สมุทรสาคร นครปฐม ราชบุรี และกาญจนบุรี เป็นต้น จำนวน 70 พันธุ์ โดยนำตัวอย่างใบกล้วยไม้ (ใบตำแหน่งที่ 3-4 จากยอด) มาสกัด DNA และทำการแยกความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Touch Down PCR ใช้ RAPD marker 13 primer และ ISSR marker 2 primer จากการศึกษาผลปรากฏว่าสามารถตรวจพบแถบ DNA ทั้งหมด 286 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic band) 269 ตำแหน่ง และตำแหน่งที่เหมือนกัน (monomorphic band) 17 ตำแหน่ง เมื่อนำรูปแบบของ DNA มาเปรียบเทียบกันพบว่า กล้วยไม้ 70 พันธุ์ที่ทำการศึกษามีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันทุกพันธุ์ และเมื่อนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้ Nie and Li Similarity Coefficient และสร้าง Dendrogram เพื่อแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) ผลปรากฏว่า ที่ระดับความใกล้ชิด 60% สามารถแบ่งออกได้ทั้งหมด 4 กลุ่มใหญ่ โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยพันธุ์ต่างๆ ที่จัดแบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆ อีกหลายกลุ่มตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมตั้งแต่ระดับประมาณ 60-97% แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้สกุลหวายที่ปลูกเป็นการค้าในประเทศไทยมีฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ และผลการจัดกลุ่มสอดคล้องกับข้อมูลประวัติการพัฒนางกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลูกผสม

* เป็นกิจกรรมภายใต้การจัดทำฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* Sw.) ที่มีการค้าในประเทศไทย

¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

² สถาบันวิจัยพืชสวน

คำนำ

ประเทศไทยจัดเป็นแหล่งพันธุกรรมของกล้วยไม้ที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และมีระบบนิเวศวิทยาที่อุดมสมบูรณ์ ทำให้เป็นแหล่งกำเนิดของกล้วยไม้มากกว่า 800 ชนิด ในแต่ละชนิดยังมีความหลากหลายทั้งในแง่ของพันธุ์และสายพันธุ์ ซึ่งมีทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และเกิดจากการผสมข้ามโดยมนุษย์ ทำให้เกิดพันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีลักษณะดีตามความต้องการของตลาดมากมาย อย่างไรก็ตามในอดีตการตั้งชื่อพันธุ์ ไม่มีหลักเกณฑ์ที่แน่นอน เช่น มีการตั้งชื่อพันธุ์ตามสถานที่ปลูก ชื่อผู้ผสมบ้าง หรือชื่อผู้นำเข้าบ้าง เป็นต้น โดยไม่มีการตรวจสอบว่ามีความเหมือนหรือต่างจากของเดิมหรือไม่ ทำให้เกิดความสับสนเพราะบางพันธุ์มีลักษณะรูปลักษณ์ภายนอกเหมือนกันแต่ชื่อต่างกัน ในขณะที่บางพันธุ์มีชื่อเหมือนกัน แต่ลักษณะต้น ใบและดอกต่างกันไป ในกรณีเช่นนี้การจำแนกพันธุ์โดยพิจารณาจากรูปร่างพรรณาสัณฐานภายนอกเพียงอย่างเดียวอาจเกิดข้อผิดพลาดได้ จำเป็นต้องพิจารณาจากลักษณะทางพันธุกรรมอื่นๆประกอบด้วย เช่น ลักษณะลายพิมพ์ DNA ซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถถ่ายทอดจากบรรพบุรุษไปยังลูกหลานได้ โดยไม่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมและเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถพิสูจน์ได้

DNA เป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ซึ่งมีข้อมูลทางพันธุกรรมบรรจุอยู่ในรูปของการเรียงลำดับเบส (Base) 4 ชนิด คือ Adenine (A) Cytocine (C) Guanine (G) และ Thymine (T) ซึ่งการแสดงออกข้อมูลพันธุกรรมเหล่านี้ เกิดขึ้นในลักษณะของการสร้างโปรตีน ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการต่าง ๆ ในเซลล์ เพื่อการดำรงชีวิต การพัฒนาของเซลล์และเนื้อเยื่อเนื้อเยื่อต่าง ๆ ให้เกิดเป็นลักษณะปรากฏตามสายพันธุ์ แต่การที่สิ่งมีชีวิตหรือพืชแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกันนั้น เป็นผลมาจากจำนวนและการเรียงลำดับของเบส (A,C,G,T) บนสาย DNA แตกต่างกัน ซึ่งเป็นความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด/พันธุ์ ที่คล้ายคลึงกับนักอาชญาวิทยาใช้ลายพิมพ์นิ้วมือในการบ่งบอกความจำเพาะของบุคคล จึงทำให้มีการบัญญัติศัพท์การเรียงลำดับของเบสบนสาย DNA ว่า DNA Fingerprint

จากความรู้ดังกล่าวข้างต้น นักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาวิธีการทางชีวโมเลกุลกันอย่างกว้างขวาง เพื่อศึกษาลักษณะรูปแบบการเรียงตัวของ DNA และนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิด/พันธุ์พืช ซึ่งในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมาได้มีใช้ลายพิมพ์ DNA ในการจำแนกชนิด/พันธุ์อย่างได้ผลในพืชหลายชนิด ตัวอย่างเช่น การจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของ Pear (*Pyrus communis*) (Monte-Corvo et al., 2001) Citrus sp. (Fang, 1998) *Geranium* sp. (Starman and Abbitt, 1997) Pawpaw (*Asimina triloba*) (Huang et al., 2003) และ *Heliconia* sp. (Kumar et al., 1998) เป็นต้น

ปัจจุบันการนำทรัพยากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมไปใช้ประโยชน์ เป็นเรื่องที่ตระหนักกันดีทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศที่พัฒนาแล้วได้พยายามที่จะนำพันธุ์พืชต่าง ๆ จากประเทศที่ด้อยกว่าไปใช้ประโยชน์ในแง่ต่างๆมากมาย และที่ผ่านมามีหลายกรณีที่มีการนำทรัพยากร และภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศหนึ่งไปพัฒนาแล้วครอบครองข้อมูลใหม่โดยการจดสิทธิบัตร ทำให้ประเทศที่เป็นแหล่งกำเนิดของทรัพยากรและภูมิปัญญาดังกล่าวไม่ได้รับความเป็นธรรม

จากประเด็นดังกล่าวประเทศไทยจึงได้ตราพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืชออกบังคับใช้ในปี 2542 โดยมีเหตุผลว่าประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายของพันธุ์พืชตามธรรมชาติ โดยเฉพาะพืชพรรณไม้เมืองร้อน ทั้งยังมีพืชพันธุ์ที่คัดเลือกและผสมพันธุ์โดยเกษตรกรและนักวิชาการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งพันธุ์ต่างๆ เหล่านี้ควรจะได้รับ การคุ้มครองสิทธิประโยชน์ เพื่อประโยชน์ของประเทศชาติและเป็นแรงจูงใจให้เกษตรกรหรือนักปรับปรุงพันธุ์ทำการวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชใหม่ๆ เพิ่มขึ้น

กล้วยไม้สกุลหวาย นับเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่ถูกจัดให้เป็น Product champion และเป็นหนึ่งในพืชที่ได้ประกาศให้มีการจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ ซึ่งจะเป็นการคุ้มครองผลงานของนักปรับปรุงพันธุ์ของไทย กรมวิชาการเกษตรซึ่งเป็นหน่วยงานหลักที่รับผิดชอบโดยตรงในการจดทะเบียนพันธุ์พืชตามพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542 จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาสายพันธุ์ DNA และจัดทำเอกลักษณ์ประจำพันธุ์กล้วยไม้พันธุ์การค้า สำหรับใช้ตรวจสอบความซ้ำซ้อนหรือลักษณะที่มีความคล้ายกันมากและเป็นหลักฐานอ้างอิงในการจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

วิธีดำเนินงาน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ

- 1.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบปรับอุณหภูมิขึ้นลงต่อเนื่อง (Thermocycler) Perkin Elmer, Gene Amp PCR 9700
- 1.2 เครื่องมือบันทึกภาพ DNA ได้แก่ เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator) กล้อง CCD และเครื่องพิมพ์ผลแบบ Thermal printer
- 1.3 เครื่องมือแยกขนาด DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าแบบแนวนอน (Gel electrophoresis) พร้อมเครื่องกระจายกระแสตรง (Power supply)
- 1.4 เครื่องมือวิเคราะห์ DNA (Image Analyser) พร้อมโปรแกรมวิเคราะห์
- 1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดความเร็วสูงชนิดรักษาอุณหภูมิ
- 1.6 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง
- 1.7 ตู้บ่มรักษาอุณหภูมิที่ 30-37 °C แบบเขย่าได้ (Incubator shaker)
- 1.8 อุปกรณ์ในการเตรียมตัวอย่าง ได้แก่ โกร่งบดยา กระตักน้ำแข็ง ถังใส่ไนโตรเจนเหลว หลอดสำหรับปั่นแยกตะกอนขนาด 1.5, 10 และ 50 ml ปิเปตดูดสารชนิดปรับปริมาตรได้ ขนาด 0.5 -1 ml
- 1.9 กระดาษพิมพ์ผล DNA ชนิด High glossy printing paper

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า ได้แก่ Tris-base, Glycine, Boric acid, Loading dye, DNA marker ขนาด 1 Kb

2.2 สารเคมีในการปรับความเป็นกรด-ด่าง ได้แก่ Hydrochloric acid, Sodium hydroxide, Acetic acid

2.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการสกัดไอโซไซม์และDNA ได้แก่ PVP-10T, 2-Mercaptoethanol, Cetyltrimethylammonium bromide, Chloroform, Isoamyl alcohol, Absolute ethanol, Ethylene diamine tetraacetate (EDTA), Tris-HCl, Isopropanol

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการย้อมDNA ได้แก่ Ethidium bromide

2.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Agarose gel ได้แก่ Agarose powder

2.6 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ได้แก่ Taq DNA polymerase, Magnesium chloride, dNTPs

2.7 ชนิดของโมเลกุลเครื่องหมาย เป็นชนิด Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) primer 13 หมายเลข (A03, A13, B01, C02, C05, C13, C19, C20, E07, G10, G13, P2672, P2674) และ Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) primer 2 หมายเลข (ISSR11, ISSR25)

วิธีการ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. การสกัด DNA ทำการสกัดตามวิธีของ Li and Midmore (1999) ที่ดัดแปลงเล็กน้อย โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1 นำตัวอย่างใบ มาล้างด้วยน้ำสะอาด ตามด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้แห้ง นำไปตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งน้ำหนักประมาณ 2 กรัม

1.2 นำตัวอย่างใบที่ชั่งแล้ว มาบดให้ละเอียดกับไนโตรเจนเหลวในโถรงบดยา ตักผงละเอียด ประมาณ 0.1 g ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml เติมสารสกัด (extraction buffer : 100mM Tris HCL, pH8.0; 20mM EDTA; 1.4M NaCl; 2%(w/v) CTAB and 0.2% mercaptoethanol (v/v) ลงไป 500 μ l เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้ม (incubate) ที่ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนด นำไปปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

1.3 ดูดส่วนใสข้างบน(supernatant) ออกมาใส่หลอดใหม่ เติมสารละลาย chloroform : isoamyl (24:1) ลงไปในปริมาตรที่เท่ากับ supernatant เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

1.4 ดูดส่วนใสข้างบน(supernatant) ออกมาใส่หลอดใหม่ ระเหย chloroform : isoamyl โดยนำหลอดไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55° C ประมาณ 30 นาที แล้วเติมสารละลาย isopropanol ที่เย็นจัดลงในหลอด 1 เท่าของปริมาตรของ supernatant แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ -20° C 1 ชั่วโมง เมื่อครบ

กำหนดนำหลอดมาพลิกกลับไปมาเบาๆ จนกระทั่งสังเกตเห็นสาย DNA แขนงลอยอยู่ในสารละลาย ตกตะกอน DNA โดยนำหลอดไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

1.4 เทน้ำใสส่วนบนออก แล้วล้างตะกอน DNA ที่เกาะติดอยู่ข้างๆ หรือที่ก้นหลอดด้วย 70% ice-cold ethyl alcohol 3 ครั้ง

1.5 นำตะกอน DNA มาผึ่งให้แห้ง โดยการคว่ำหลอดไว้บนกระดาษซับ (Tissue paper)

1.6 ละลายตะกอน DNA ด้วยสารละลาย TE+RNase A 50 ul

1.7 ตรวจสอบปริมาณ DNA เบื้องต้น ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ DNA 10 ul + loading dye solution 2 ul ใส agarose gel 0.8%

1.8 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 260 และ 280 nm โดยใช้ DNA 10 ul + น้ำ 990 ul

2. การสังเคราะห์ DNA

นำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase(PCR) โดยในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 15 ul ในหลอด PCR ขนาด 0.2 ml ประกอบด้วย 1X PCR Buffer (Fermentas), 1.5mM $MgCl_2$, 150mM dNTP, 1.3uM Primer, 1unit Tag DNA Polymerase(Fermentas), Formamide 1.1% และ 25ng DNA template

2.2 เมื่อผสมสารเคมีให้เข้ากันแล้ว นำหลอด PCR ไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง PCR Thermal cycler (Perkin Elmer, Gene Amp PCR 9700) โดยมี condition ดังนี้

94 °C	5 : 00 นาที	1 รอบ
94 °C	0 : 30 นาที	5 รอบแต่ละรอบอุณหภูมิลดลง 1°C
52 °C	1 : 00 นาที	
72 °C	1 : 00 นาที	
94 °C	0 : 30 นาที	
48 °C	1 : 00 นาที	30 รอบ
72 °C	1 : 00 นาที	
72 °C	5 : 00 นาที	
4 °C	Hold	1 รอบ

นำผลผลิต PCR ไปแยกขนาด DNA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 X TBE buffer กระแสไฟ 100 Volt ประมาณ 2 ชม. หรือจนกระทั่งสีของ loading dye ห่างจากปลาย gel ประมาณ 1 ซม. นำแผ่น gel ไปตรวจดูแถบ DNA ด้วยเครื่อง UV- Transilluminater พร้อมบันทึกภาพเก็บไว้

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่บันทึกภาพไว้ ไปวิเคราะห์หาความแตกต่างและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ระหว่างกล้วยไม้ 70 พันธุ์ ด้วย Image analysis system, Bio-1D++ version 99.03 (Bioprofil, Vilber Lourmat, France)

เวลาและสถานที่

พฤศจิกายน 2545- พฤศจิกายน 2547 ณ ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยพืชสวน จันทบุรี จ. จันทบุรี

ผลการทดลองและวิจารณ์

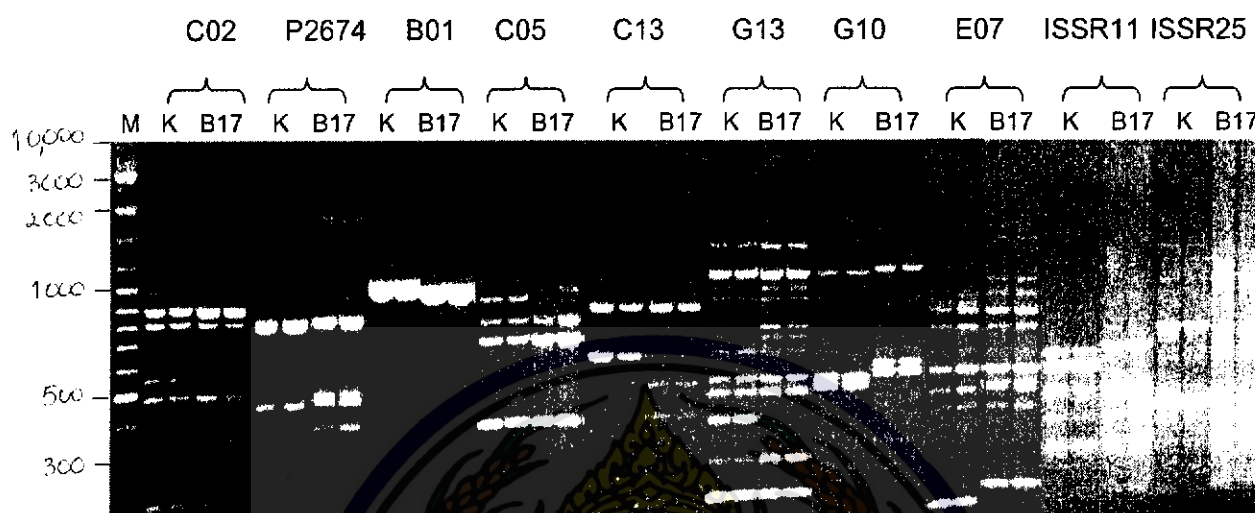
การสกัด DNA จากใบกล้วยไม้

ในการศึกษาเบื้องต้น เพื่อตรวจสอบอายุใบและวิธีสกัด DNA ที่เหมาะสม ได้ทำการสกัด DNA จากใบอายุต่างๆ กัน คือ ใบอ่อน (ใบยอด) ใบเพสลาด (ใบที่โตเต็มที่ แต่แผ่นใบยังไม่แข็งมาก ใบ ตำแหน่งที่ 3-4 จากใบยอด) และใบแก่ (ใบที่ 1-2 จากโคน) ด้วยวิธี Microprep (Fullon et. al. 1995) และวิธีของ Li and Midmore (1999) จากการทดลองปรากฏว่า อายุใบไม่มีผลต่อปริมาณและคุณภาพ ของ DNA แต่ใบแก่จะบดยากกว่าเนื่องใบค่อนข้างแข็ง สำหรับวิธีการสกัดพบว่า DNA ที่สกัดจากใบ เพสลาดตามวิธีของ Li and Midmore (1999) ได้ปริมาณ DNA เฉลี่ย 30.2 ug/ml และ อัตราส่วนของ ค่า Optical density $OD_{260/280} = 1.77-1.86$ ในขณะที่สกัดด้วยวิธี Microprep ให้ปริมาณ DNA เฉลี่ย 22.5 ug/ml และ อัตราส่วนของค่า Optical density $OD_{260/280} = 1.60-1.9$

การคัดเลือก primer

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชโดยทั่วไป วิธีการที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนก ความแตกต่างทางพันธุกรรมได้แก่ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) และ Inter Simple Sequent Repeat (ISSR) เป็นต้น ซึ่ง ข้อดีของวิธีเหล่านี้ คือ ไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสของพืชที่ต้องการศึกษา และสามารถจับกับ DNA เป้าหมายได้หลายตำแหน่ง ในการทดลองนี้เลือกใช้ primer ที่มีขนาดความยาวแตกต่างกันจำนวน 276 หมายเลขซึ่งประกอบด้วย RAPD primer ที่มีความยาวขนาด 10 เบส 176 หมายเลข และ ISSR primer primer ขนาด 17 เบส 100 หมายเลข ทดลองกับกล้วยไม้หวายพันธุ์ บอม17 หรือ โซเนีย17 (ดอกสีแดง) และพันธุ์ขาวสนาน (ดอกสีขาว) เป็นต้นแบบ โดยนำ DNA ของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์มาสังเคราะห์กับ primer โดยการเพิ่มปริมาณเอ็นเอด้วยวิธี Touch down PCR ผลการทดลองปรากฏว่า มีเพียง 15 หมายเลข เท่านั้นที่สามารถสังเคราะห์แถบ DNA ที่ชัดเจนและแสดงแถบ DNA ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน (polymorphic band) ระหว่างพันธุ์ (ภาพที่ 1) ซึ่งจากแถบ DNA ที่แยกได้บนแผ่น gel มีขนาดความยาว แตกต่างกัน จึงทำให้แถบที่ปรากฏมีการเรียงตัวในตำแหน่งที่แตกต่างกัน แสดงความจำเพาะของแต่ละ

พันธุ์ และสามารถนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ จึงคัดเลือก primer 15 หมายเลข มาทดลองกับกล้วยไม้ทั้ง 70 พันธุ์



ภาพที่ 1 ลักษณะรูปแบบ DNA ของกล้วยไม้หวายพันธุ์ ชาวสวน (K) และ พันธุ์ บอม 17 หรือ โซเนีย 17 (B17) ที่สังเคราะห์โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR กับ primer C02, P2674, B01, C05, C13, G13, G10, E07, ISSR11 และ ISSR25 แถวซ้ายสุด (M) เป็นโมเลกุลมาตรฐาน (molecular marker) ขนาด 1 kb

ลักษณะรูปแบบ DNA ของกล้วยไม้สกุลหวาย

เมื่อนำ primer ทั้ง 15 หมายเลข ที่คัดเลือกไว้มาทดลองกับกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ต่างๆ รวม 70 พันธุ์ ผลปรากฏว่า สามารถตรวจสอบแถบ DNA (DNA fragment) ได้ทั้งหมด 286 แถบ ซึ่งมีขนาดของ DNA ระหว่าง 190-2894 base pair (bp) คิดเฉลี่ยได้ 19 ตำแหน่งต่อ primer ในจำนวนนี้มีแถบ DNA ที่อยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน (polymorphic) 269 ตำแหน่ง คิดเป็น 94.06% และมีแถบที่ปรากฏอยู่ในตำแหน่งเดียวกันทุกพันธุ์ (monomorphic) 17 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 5.94% (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่า พันธุ์ในกลุ่มที่ทำการศึกษามีลักษณะรูปแบบการเรียงตัวของ DNA หลากหลายแตกต่างกันและสามารถใช้จำแนกพันธุ์มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันมากๆ ซึ่งหากไม่ชำนาญอาจเข้าใจว่าเป็นพันธุ์เดียวกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบจากลักษณะลายพิมพ์ DNA จะเห็นความแตกต่างได้ชัดเจน เช่น พันธุ์ลูกผสมพันธุ์ชาวสวนกับขาว 5N ขาวยูกับขาวคิลก (ภาพที่ 2) ซึ่งผลงานดังกล่าวคล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Xiang *et al.* (2003) ที่พบว่าการวิเคราะห์ DNA กล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ AFLP marker สามารถจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมที่นิยมในตลาดสิงคโปร์ได้ แต่มีข้อแตกต่างที่วิธีการของ Xiang *et al.* (2003) ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ ในขณะที่ผลการทดลองครั้งนี้นอกจากจะจำแนกความแตกต่างของพันธุ์ลูกผสมแล้ว ยังสามารถจำแนกพันธุ์ที่มาจาก

การกลายพันธุ์ เช่น พันธุ์แดงวาสนา กับ แสงอรุณ และ พันธุ์แดงสุวรรณกับเคหวาน เป็นต้น (ภาพที่ 3) การวิเคราะห์ DNA ด้วยวิธี Touch down PCR ที่ใช้ในการทดลองนี้ สามารถจำแนกพันธุ์ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก ๆ แม้กระทั่งพันธุ์ที่กลายมาจากพันธุ์เดิมได้ อาจจะเนื่องจากวิธีนี้ใช้ Annealing temperature (อุณหภูมิในการจับระหว่าง DNA ดั้งเดิมหรือ DNA template กับ primer) ที่สูงในรอบแรกๆ และค่อยๆ ลดอุณหภูมิลงทีละ 1 องศาในรอบต่อมา จนกระทั่งถึงอุณหภูมิที่ต้องการทำปฏิกิริยาจริงๆ ทำให้ในรอบแรกๆ primer จะจับกับ DNA เป้าหมายได้เฉพาะตำแหน่งที่ถูกต้องจริงๆ เท่านั้น ในรอบต่อมาแม้ว่าจะลดอุณหภูมิลง แต่ผลผลิตที่ถูกต้องจะเพิ่มมากขึ้นหลายเท่า และมีมากกว่า DNA อื่น จึงหลีกเลี่ยงการที่ primer จะจับกับ DNA อื่นที่ไม่ใช่ DNA เป้าหมาย และการที่อุณหภูมิค่อยๆ ลดลงทีละ 1 องศาในรอบต่อไปจะช่วยให้ primer มีโอกาสจับกับ DNA เป้าหมายในตำแหน่งอื่นๆ ได้มากขึ้น เป็นการเพิ่มโอกาสในการตรวจพบความแตกต่างของตำแหน่งแถบ DNA ที่ปรากฏในแต่ละพันธุ์

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

เมื่อนำแถบ DNA ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดมาประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Nei and Li Similarity Coefficient และสร้าง Dendrogram ด้วย Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average (UPGMA) เพื่อแบ่งกลุ่มตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ผลปรากฏว่า กลุ่มพันธุ์ที่ทำการศึกษา 70 พันธุ์ ที่ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในระดับ 60 % สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ (ภาพที่ 4) โดยแต่ละกลุ่มยังประกอบด้วยกลุ่มย่อยที่มีพันธุ์ต่างๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด ประกอบไปด้วย 2 กลุ่มย่อยที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับประมาณ 65 % ในกลุ่มย่อยแรกยังแยกออกเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้อีก 4 กลุ่มที่ประกอบไปด้วยพันธุ์ต่างๆ 31 พันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมในระดับตั้งแต่ 68 – 93 % เป็นกลุ่มที่เป็นพันธุ์ลูกผสม ซึ่งได้แก่พันธุ์ เอริกา ชากระ ขาวบลิซซิง สุริย์พริช กิมหลงพิงค์ นาซาบีท ขาว 5N นิวรรธนี ขาวสนาน วิโรจน์ 5N อรุณไวท์ MS ลายสยาม ไวพาสู ควินพิงค์ อินทวงศ์ จอห์นนี่ไวท์ ขาวคลิก ขาวยูกิ ซีพีไวท์ ลิซ่า ขาวเลอร์เวีย ขาวประวิทย์ ยุพดีวรรณ แดงเฉลิมศรี ชิดชม แดงสะอาด เซ็นเซชั่น นอลเพอร์เฟิล สมินเรด ซาบิน ขาว 4N จากประวัติเท่าที่สามารถสืบค้นได้ (ภาคผนวกที่ 2) พบว่าพันธุ์ในกลุ่มนี้มีพ่อหรือแม่ในกลุ่มเดียวกันหรือพ่อแม่เป็นลูกผสม ที่มาจากพ่อแม่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น ชากระ เป็นลูกผสม แจ็คเกอร์โนโทมัส X ทอมมี่เดิร์ก นาซาบีทเป็นลูก ชากระ X แอนนา เป็นต้น สำหรับกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบไปด้วยพันธุ์ต่างๆ 26 พันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมในระดับตั้งแต่ 68 – 97 % ได้แก่พันธุ์ เขียวสกุล ใจแดง แดงพิริยา มิสทิน สัราญเรต มิสเวลด์ แดงจรี บอม 17 (ไซเนีย 17) แดงสุวรรณ เคแดง LR โบตัน แสงอรุณ ชมพูเอมอร แดงสิรินทร์ แดงสุภาพ บอม 17 ชมพู (ไซเนีย 17 ชมพู) บอม 17 แดง 17 (ไซเนีย 17 แดง) เคหวาน บอมกัลยา (ไซเนียกัลยา) แดงวาสนา มิสลิงคอปร์ แอนนา AS ทับทิมสยาม กระทิงแดง พันธุ์ในกลุ่มนี้เท่าที่ทราบประวัติส่วนใหญ่เกิดจากการ

กลายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น เอียสกุล กลายพันธุ์มาจาก โจแดง ส้มวาญเรต กลายพันธุ์มาจากเอียสกุล แดงพริยา แดงสุวัฒน์ เคแดง กลายพันธุ์มาจากเคหวาน เป็นต้น

กลุ่มที่ 2 มีเพียงพันธุ์เดียวคือ ชาร์มมิ่งไวท์ ซึ่งไม่ทราบประวัติทางพันธุกรรม เป็นหวายที่มีลำกล้วยเป็นรูปไข่ กลีบใบมีลักษณะเป็นรูปวงรี ดอกเป็นดอกแบบกึ่งฟอร์มกลม สีพื้นดอกสีขาว ปากสี purple violet

กลุ่มที่ 3 มี 2 พันธุ์ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 61 % ได้แก่พันธุ์บุรณะเจด และชาแนล ซึ่งเป็นหวายที่มีลักษณะฟอร์มดอกกึ่งฟอร์มกลมทั้งคู่ แต่บุรณะเจดนี้มีกลีบดอกกว้าง สีพื้นดอกเหลืองอมเขียว เป็นลูกผสมระหว่าง บางกอกกรีนกับบุรณะแพลนซี ส่วน ชาแนล มีกลีบดอกแคบ สีพื้นดอกขาว ไม่ทราบประวัติพ่อแม่

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่เป็นลูกผสมทั้งหมด (ภาคผนวก 2) สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับ 60% โดยกลุ่มย่อยแรกประกอบไปด้วยพันธุ์ต่างๆทั้งหมด 3 พันธุ์ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมประมาณ 73 % ได้แก่พันธุ์ ซีชาร์ ชมพูเฉลิมพร และแจคเกอร์นคอนเลริต ซึ่งทั้ง 3 พันธุ์มีลักษณะดอกเป็นฟอร์มกลีบแคบเหมือนกัน สำหรับกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยพันธุ์ต่างๆ 7 พันธุ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในระดับ 60-77 % ซึ่งแยกได้อีก 4 กลุ่มย่อยๆ โดยกลุ่มย่อยแรกประกอบด้วยพันธุ์ลูบัตเตอร์ฟราย หมี่ใหญ่แพนด้า รินนภา ไดมอนด์สตาร์ ซึ่งมีลักษณะดอกเป็นแบบฟอร์มกลม อีก 3 กลุ่มย่อยที่เหลือประกอบไปด้วยกลุ่มละพันธุ์คือ ไดมอนด์สตาร์ ฟาติมา และปอมมาดัวร์ (มาตาม) ซึ่งไดมอนด์สตาร์ และปอมมาดัวร์ (มาตาม) มีลักษณะดอกแบบกึ่งฟอร์ม ส่วนฟาติมา มีฟอร์มดอกเป็นแบบฟอร์มกลีบแคบ

แม้ว่ากล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 70 พันธุ์ มีลักษณะรูปแบบการเรียงตัวของDNAหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันทุกพันธุ์ (ภาคผนวก1) แต่เมื่อทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมปรากฏว่า บางพันธุ์มีพันธุกรรมใกล้ชิดกันมากถึง 97% ส่วนพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมน้อยที่สุดในกลุ่มพบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกันถึง 60% ซึ่งให้เห็นว่ากล้วยไม้สกุลหวายที่ปลูกเป็นการค้าในประเทศไทยมีฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่าพันธุ์กล้วยไม้ที่ปลูกเลี้ยงได้ปัจจุบันมากกว่า 90% เป็นลูกผสมที่เกิดจากพ่อแม่ที่เป็นลูกผสมของพ่อแม่ต้นกำเนิดในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนั้นลูกผสมที่ได้ยังผสมกลับไปยังพ่อแม่เดิม หรือนำมาผสมระหว่างลูกผสมด้วยกัน และบางพันธุ์ก็เกิดจากการกลายพันธุ์มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาคผนวก 2)

สรุป

1. การวิเคราะห์DNAด้วยวิธี Touchdown PCR ร่วมกับ RAPD และ ISSR markers พบว่าสามารถจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ทุกพันธุ์ ทั้งพันธุ์ลูกผสมและพันธุ์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์

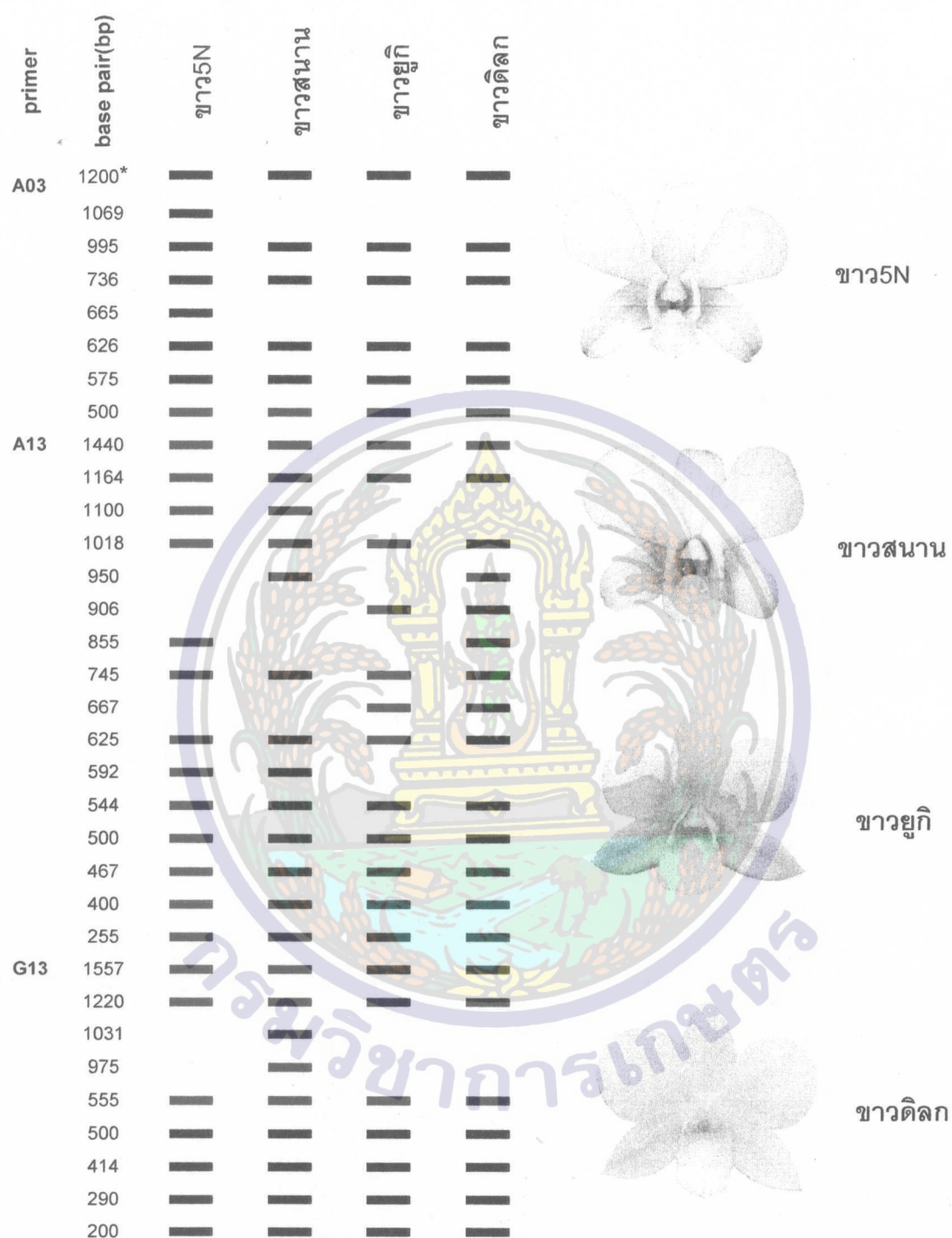
2. พันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายที่มีการค้าในประเทศไทยมีฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ หากจะสร้างพันธุ์ที่มีลักษณะแปลกใหม่ควรจะต้องมีนำเข้าพันธุ์จากต่างประเทศเพิ่มเติม
3. ผลของการจัดกลุ่มตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรม มีความสอดคล้องกับประวัติการพัฒนาพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

- Fang, D. 1998 Phylogenetic Relationships among Selected *Citrus* Germplasm Accessions Revealed by Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. J. Amer. Soc.Hort. Sci. 123(4): 612-617.
- Fulton, T.M., J. Chunwongse, and S.D. Tanksley. 1995. Micropep protocol for extraction of DNA from tomato and herbaceous plants. Plant Molecular Biology Reporter. 13(3): 207-209.
- Huang, H.,D.R. Lane, and T.L. Kubisiak. 2003. Molecular Characterization of Cultivated Pawpaw (*Asimina triloba*) using RAPD Markers. J. Amer. Soc.Hort.Sci. 128(1) 85-93.
- Kumar, P.P., J.C.K. Yau, and C.J Goh. 1998. Genetic Analyses of *Heliconia* Species and Cultivars with Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123 (1) : 91-97.
- Li. M. and D.J. Midmore. 1999. Estimating the Genetic Relationships of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis* (Burm.f.) Hensch) Cultivated in Australia, using Random Amplified Polymorphic DNAs(RAPD). J. of Hort. Sci. & Biotechnology, 74(2) 224-231.
- Monte-Corvo, L., L. Goulao, and C. Oliveira. 2001. ISSR analysis of Cultivars of Pear and Suitability of Molecular Markers for Clone Discrimination. J. Amer. Soc.Hort. Sci. 126(5): 517-522.
- Nei, M. and Li, W. H. 1979. Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonuclease. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America. 76, 5269-73.
- Starman, T.W. and S. Abbitt. 1997. Evaluating Genetic Relationships of geranium Using Arbitrary Signatures from Amplification Profiles. Hort. Science 32 (7): 1288-1291.
- Xiang, N., Y. Hong, and L.T.Lam-Chan. 2003. Genetic Analysis of Tropical Orchid Hybrids (*Dendrobium*) with Fluorescence Amplified Fragment-length Polymorphism (AFLP). J. Amer. Soc.Hort.Sci. 128(5) 731-735.

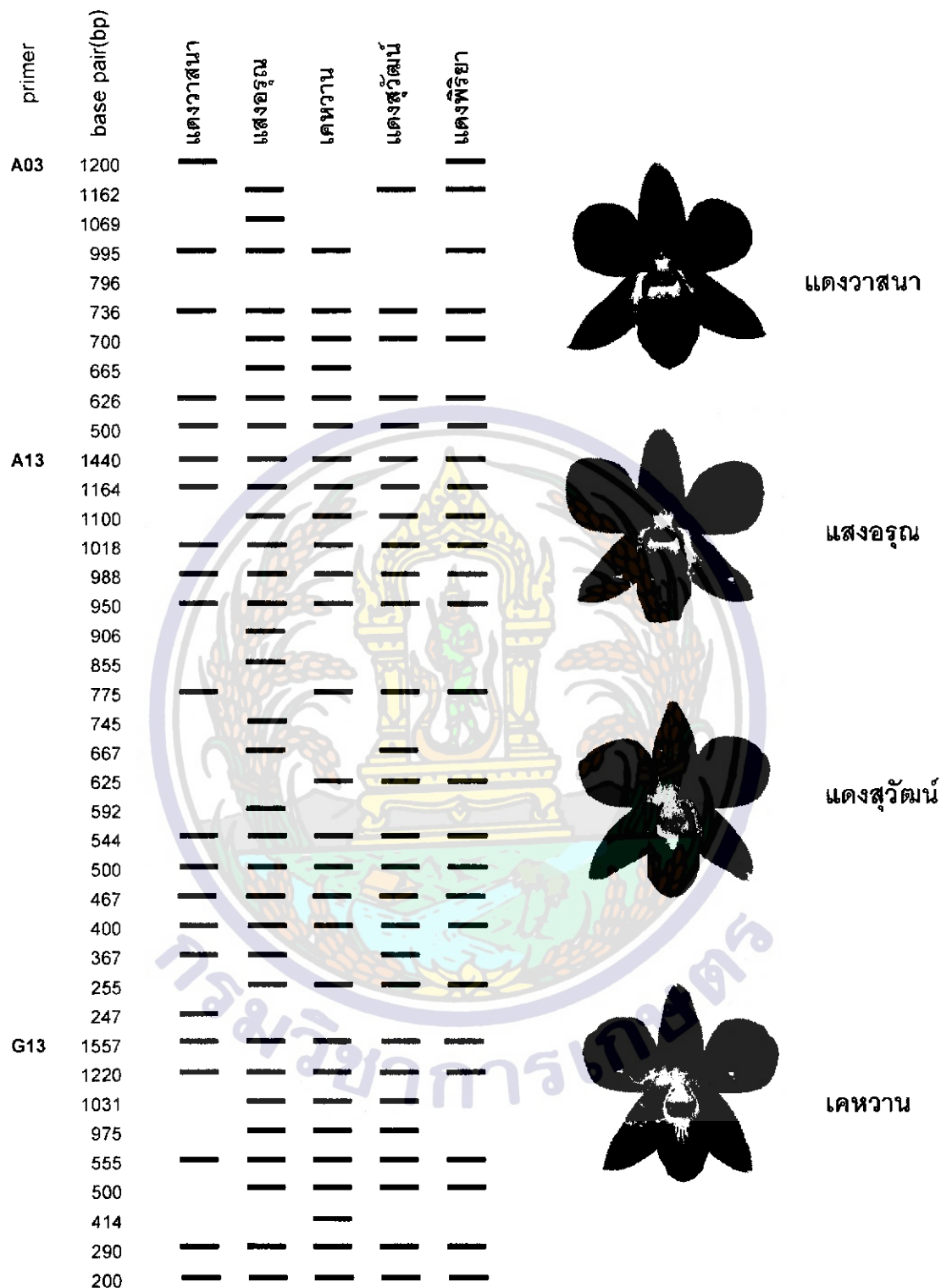
ตารางที่ 1 ชื่อ primer ลำดับนิวคลีโอไทด์ (base) และจำนวนแถบ DNA ที่สังเคราะห์ได้จากกล้วยไม้สกุล
หวายพันธุ์การค้า 70 พันธุ์

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ Primer 5'.....3'	Total Fragments no.	Polymorphic Fragments no.	Monomorphic Fragments no.
A03	AGT-CAG-CCA-C	12	10	2
A13	CGA-CAC-CCA-C	22	20	2
B01	CCG-TCG-GTA-G	18	18	0
C02	GTG-AGG-CGT-C	21	20	1
C05	GAT-GAC-CGC-C	18	15	3
C13	AAG-CCT-CGT-C	21	21	0
C19	GTT-GCC-AGC-C	15	14	1
C20	ACT-TCG-CCA-C	20	19	1
E07	AGA-TGC-AGC-C	23	22	1
G10	AGG-GCC-GTC-T	27	25	2
G13	CTC-TCC-GCC-A	12	10	2
P2672	AAG-GCG-CGA-ACG	15	14	1
P2674	GAG-CTC-CCG-ACA	18	17	1
ISSR11	GAG-AGA-GAG-AGA-GAG-AC	21	21	0
ISSR25	ACA-CAC-ACA-CAC-ACA-CT	23	23	0
Total		286	269	17

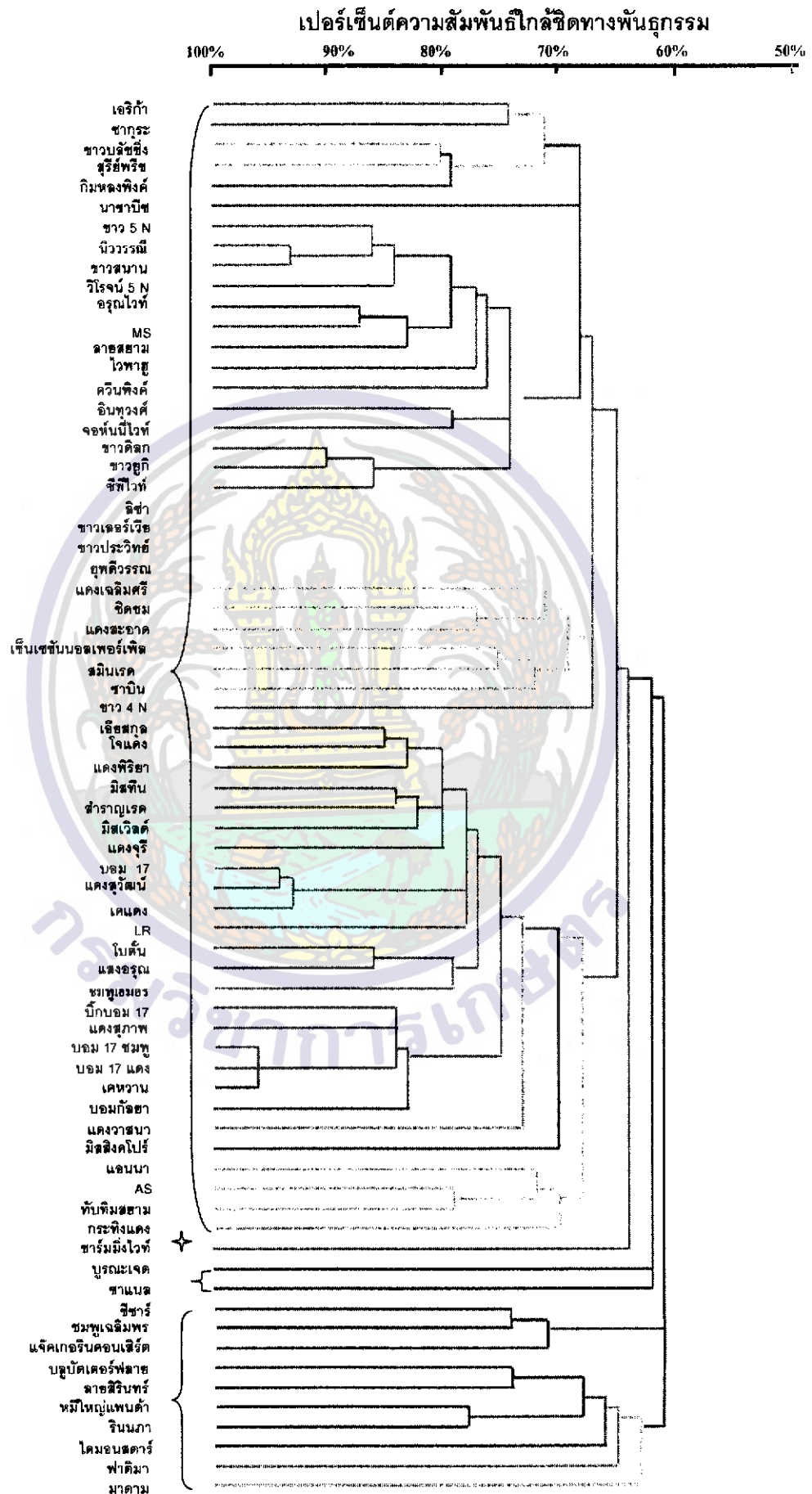


ภาพที่ 2 ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่ได้จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ หมายเลข A03, A13 และ G13 เปรียบเทียบกับภาพดอกกล้วยไม้ที่มีลักษณะคล้ายกันของพันธุ์ลูกผสม

* ตัวเลขแสดงถึงขนาด โมเลกุลของดีเอ็นเอ



ภาพที่ 3 ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่ได้จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ หมายเลข A03, A13 และ G13 เปรียบเทียบกับภาพดอกกล้วยไม้พันธุ์ที่มีลักษณะคล้ายกันของพันธุ์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ * ตัวเลขแสดงถึงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ



ภาพที่ 4 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยไม้ 70 พันธุ์

ภาคผนวก 1 ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 70 พันธุ์ที่สังเคราะห์จากโพรมีเตอร์ A03

ชื่อพันธุ์	ขนาด DNA(bp)											
	1200	1162	1069	995	796	736	700	665	626	576	562	500
ขาวสนาน	—			—					—	—		—
แอนนา	—											
ควีนฟิงค์	—			—					—	—		—
ขาวเลอว์เวีย	—								—	—		—
ขาวประวิทย์	—								—	—		—
กระตังแดง	—	—		—					—	—		—
บุรณะเจด	—		—		—				—	—		—
แดงวาสนา	—			—					—	—		—
ไทมอนด์	—	—					—		—	—		—
รินนภา	—			—			—		—	—		—
หมี	—	—		—				—	—	—		—
Bluebutterfly	—			—			—		—	—		—
ลายสีรินทร์	—	—		—			—		—	—		—
ขาวรัชชิ่ง	—								—	—		—
จอห์นนี่ไวท์	—			—					—	—		—
กิมหงษ์ทองคำ	—					—	—		—	—		—
อินทวงศ์	—			—					—	—		—
มาดาม	—								—	—		—
สุริยพิช	—	—		—					—	—		—
แดงจรี	—	—		—					—	—		—
แจ๊คคอมเสิร์ด*	—			—					—	—		—
ผักบุ้ง	—								—	—		—
ชิดชม	—			—					—	—		—
แดงสะอาด	—								—	—		—
ฟาร์ดีมา	—	—		—					—	—		—
ชาแนล	—								—	—		—
เคพวาน	—								—	—		—
บอม17ชมพู	—			—					—	—		—
บอม17แดง	—								—	—		—
ปักบอม17	—	—		—					—	—		—
นิววรรณ	—			—					—	—		—
แดงสุภาพ	—	—							—	—		—
ชากระบะ	—			—					—	—		—
เอริกา	—								—	—		—
บอมกัลดา	—	—							—	—		—
ใจแดง	—	—							—	—		—
ขาว5N	—			—					—	—		—
มีสซิงคโปร์	—			—					—	—		—
ธมิมเรด	—			—					—	—		—
แดงอรุณ	—	—							—	—		—
โบตัน	—	—							—	—		—
ไวบาส	—								—	—		—
ขาว4N	—								—	—		—
นาซ่าบริด	—	—							—	—		—
ชมพูเฉลิมพร	—			—					—	—		—
แดงเฉลิมศรี	—			—					—	—		—
บอม17	—								—	—		—
เคแดง	—	—							—	—		—
แดงสุวัฒน์	—	—							—	—		—
ชาร์มมิ่งไวท์	—							—	—	—		—
ซีซ่าร์แดง	—			—					—	—		—
ลิซ่า	—		—						—	—		—
ตำราญเรด	—		—						—	—		—
เซ็นเซชั่น***	—		—						—	—		—
ชาบีบ	—		—						—	—		—
มิสทิน	—			—					—	—		—
มิสเวสต์	—			—					—	—		—
เล็คทูด	—	—							—	—		—
วิโรจน์5N	—			—					—	—		—
ขาวยูกิ	—								—	—		—
ขาวดีดก	—								—	—		—
แดงพิริยา	—								—	—		—
ซีพีไวท์	—			—					—	—		—
ทับทิมสยาม	—							—	—	—		—
อรุณไวท์	—	—							—	—		—
ลายสยาม	—			—					—	—		—
มอร์นิ่งสตาร์	—	—		—					—	—		—
ลอรา	—			—					—	—		—
อลิเซีย	—	—							—	—		—
ชมพูเอมอร	—			—					—	—		—

* แจ๊คเก็ววันคองเสิร์ด

** เซ็นเซชั่นอลเทอร์เนต

ภาคผนวก. 1 (ต่อ) ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดินเลนเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 70 พันธุ์ที่สังเคราะห์จากโพรโมเตอร์ A13

ชื่อพันธุ์	ขนาด DNA(bp)																						
	1440	1290	1164	1100	1018	988	950	906	855	775	745	667	625	592	544	500	467	431	400	367	255	247	
ขาวสวนาน	—																						
แอนนา	—	—						—						—	—	—	—						
ควีนฟิงค์	—																						
ขาวเลอร์เวีย	—	—																					
ขาวประวิทย์	—																						
กระพิงแดง	—																						
บุรณะเจด	—			—																			
แดงวาสนา	—																						
โดมอนด์	—																						
รินนภา																							
หมี	—	—																					
Bluebutterfly	—																						
ดาวยสิริจันทร์																							
ขาวบรัชชิง																							
จอห์นนี่ไวท์	—																						
กิมพลิงฟิงค์	—																						
อินทวงศ์	—																						
มาตาม																							
สุริย์พิช																							
แดงจรั																							
แจ๊คคอนเสิร์ต	—																						
ผักบุ้ง	—																						
ชิดชม	—																						
แดงสะอาด																							
ฟาร์มมา	—	—																					
ชาแนล																							
เคหวาน	—																						
บอม17ชมพู	—																						
บอม17แดง	—																						
บิกบอม17	—																						
นิ่ววรรณ	—																						
แดงสุภาพ	—																						
ชากรุง																							
เอริกา	—																						
บอมกัลยา	—																						
ใจแดง																							
ขาว5N	—																						
มัสติงคโปร	—	—																					
สลิมเรด	—																						
แสงอรุณ	—																						
โบตัน	—																						
ไวบาสู	—																						
ขาว4N	—																						
นาซาบรีด	—																						
ชมพูเจดิมพร	—																						
แดงเฉลิมศรี	—																						
บอม17	—																						
เคแดง	—																						
แดงสุวิวัฒน์	—																						
ชาร์มมิ่งไวท์	—																						
ชีชาร์แดง	—																						
ลิซ่า	—																						
สำราญเรด	—																						
เร็นเชอร์นา**	—																						
ซาปิน																							
มัสติน	—																						
มิสเว็ลด์	—																						
เอ็ชสกุล	—																						
วิโรจน์5N	—																						
ขาวฮูกิ	—																						
ขาวคิลก	—																						
แดงพิริยา	—																						
ซีพีไวท์	—																						
ทับทิมสยาม	—																						
อรุณไวท์	—																						
ลายสยาม	—																						
มอร์นิ่งสตาร์	—																						
ลลว	—																						
อลิเซีย	—																						
ชมพูเอมอร	—																						

¹ แจ็คเกอร์กันคอนเสิร์ต

” เข็มเข้้นนอลเพอร์เพิล

ภาคผนวก 1 (ต่อ) ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 70 พันธุ์ที่สังเคราะห์จากโทรมโนอร์ C05

ชื่อพันธุ์	ขนาด DNA (bp)															
	1740	1237	1095	1031	1006	982	973	951	932	891	822	794	770	715	645	599
ขาวสนาน																
แอนนา																
ควีนพิงค์																
ขาวเลอว์เวีย																
ขาวประวิทย์																
กระพริบแสง																
บุรณเฑาะ																
แดงวาสนา																
โคมอนด์																
รินนภา																
หมี																
Bluebutterfly																
ลายสิรินทร์																
ขาวรัชชิ่ง																
จอห์นบีไวท์																
กิมพลีพิงค์																
อินทวงศ์																
มาตาม																
ดุริยพิศ																
แดงจรี																
แจ๊คคอนเสิร์ต*																
ผักบุ้ง																
ชิดชม																
แดงสะอาด																
ฟ้าร์ติมา																
ชาแนล																
เคหวน																
บอม17ชมพู																
บอม17แดง																
บักบอม17																
นิ่ววรรณิ																
แดงสุภาพ																
ชากระ																
เอริกา																
บอมกัลยา																
โจแดง																
ขาว5N																
มีดสิงคโปร์																
สมันเรด																
แดงอรุณ																
โบคัน																
ไวบาส																
ขาว4N																
นาซ่าบริด																
ชมพูเจดิมพร																
แดงเจดิมศรี																
บอม17																
เคแดง																
แดงสุวิณ																
ชาร์มมิงไวท์																
สีฟ้าร์แดง																
ลิซ่า																
สำราญเรด																
เชิเบเชิชนา**																
ซาบิ																
มิสทิน																
มิสเวลด																
เอียสกูล																
วิโรจน์5N																
ขาวชุก																
ขาวคิลก																
แดงพิริยา																
สีพิไวท์																
ทัปทิมสยาม																
อรุณไวท์																
ลายสยาม																
มอร์นิงสตาร์																
ดอรา																
คิลิเซีย																
ชมพูเอมอร																

* แจ๊คเกอร์คอนเสิร์ต

** เชิเบเชิชนอลเพอร์เฟ็ค

ภาคผนวก 1 (ต่อ) ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 70 พันธุ์ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ C13

ขนาด DNA (bp)

ชื่อพันธุ์	1905	1760	1715	1646	1525	1447	1325	1262	1208	1175	1080	1023	927	825	710	692	670	645	570	553	380
ขาวสนาน																					
แฉกนา																					
ควีนฟิงค์																					
ขาวเออร์เวีย																					
ขาวประวิทย์																					
กระพิงแดง																					
บุรณะเจด																					
แดงวาสนา																					
โคมอนด์																					
รินนภา																					
หมี																					
Bluebutterfly																					
ลายสิรินธร																					
ขาวบริสุทธิ์																					
จอห์นนี่ไวท์																					
กิมหลงทิงค์																					
อินทวงศ์																					
มาดาม																					
สุริยพิรุ																					
แดงจรี																					
แจ๊คคอนเสิร์ต*																					
ผักบุ้ง																					
ชิดชม																					
แดงสะอาด																					
ฟ้าวิคมา																					
ชาแนล																					
เคหวน																					
บอม17ชมพู																					
บอม17แดง																					
บิกบอม17																					
นิ่ววรรณ																					
แดงสุภาพ																					
ชากระบะ																					
เอริก้า																					
บอมกัลลา																					
โจแดง																					
ขาว5N																					
มีตสิงคโปร์																					
สมันเรด																					
แดงอรุณ																					
โบตัน																					
ไวบาส																					
ขาว4N																					
นาซ่าบริด																					
ชมพูเจดิมพร																					
แดงเจดิมศรี																					
บอม17																					
เคแดง																					
แดงสุวิทย์																					
ชาร์มมิงไวท์																					
ชาร์มมิงแดง																					
ลิซ่า																					
ฟ้าราญเรด																					
เซ็นเซชัน**																					
ซาบิ																					
มิสทิ																					
มิสเวียด																					
เอชสกูล																					
ไวโรจน์5N																					
ขาวชุก																					
ขาวดิ๊ก																					
แดงพริษา																					
สตีไวท์																					
ทับทิมสยาม																					
อรุณไวท์																					
ลายสยาม																					
มอร์นิ่งสตาร์																					
ลอร่า																					
อติเชิ																					
ชมพูเอมอร																					

* แจ็คเก็ตคอนเสิร์ต

** เซ็นเซชันนอลเพอร์เฟกต์

ภาคผนวก 1 (ต่อ) ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 70 พันธุ์ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ C19

ชื่อพันธุ์	ขนาด DNA (bp)															
	1362	1330	1244	1077	1017	960	890	822	775	745	706	650	625	605	500	
ชาวสนาม	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
แอนนา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ควีนฟิงค์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชาวเลอร์เวีย	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชาวประวิทย์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
กระตังแดง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
บุรณะเจด	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
แดงวานา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
โคมอนด์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
รินนภา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
หมี	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Bluebutterfly	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ลายสิรินทร์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชาวบรัชชิง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
จอห์นนี่ไวท์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
กิมหลงฟิงค์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
อินทวงศ์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
มาดาม	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
สุริย์พีช	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
แดงจรี	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
แจ๊คคอนเสิร์ต*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
มังกร	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชิดชม	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
แดงสะอาด	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ฟ้าร์ดีมา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชาเบล	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
เคพวาน	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
บอม17ชมพู	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
บอม17แดง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
บิกบอม17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
นิวเวอร์ณี	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
แดงสุภาพ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชากระ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
เอริก้า	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
บอมกัลดา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ใจแดง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชาว5N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
มิสสิงคโปร์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
สมีนเรด	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
แดงอรุณ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
โบตัน	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ไวบาส	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชาว4N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
นาซ่าบริด	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชมพูเจดิมพร	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
แดงเจดิมศรี	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
บอม17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
เคแดง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
แดงสุวัฒน์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชาว์มิงไวท์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ซีชาร์แดง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ลิซ่า	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ฟ้าราญเรด	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
เขินเขินา**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชาบิน	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
มิสทิน	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
มิสเวสต์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
เอ็สสกูล	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
วิโรจน์5N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชาวฮุก	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชาวคิง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
แดงพิธีฮา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ซีพีไวท์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ทับทิมสยาม	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
อรุณไวท์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ลาธสยาม	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
มอร์นิงสตาร์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ลอรา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
อลิเซีย	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ชมพูเอมอร	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

* แจ็คเกอร์คอนเสิร์ต

** เขินเขินนอตเพอร์เฟ็ค

ภาคผนวก 1 (ต่อ) ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 70 พันธุ์ที่ส่งเคราะห์จากโพมเมอร E07

ชื่อพันธุ์	ขนาด DNA (bp)																			
	1770	1616	1461	1300	1200	1115	990	965	934	915	875	800	739	710	682	580	532	502	483	422
ชาวสยาม																				
แอนนา																				
ควีนฟิงค์																				
ชาวเลอริเวีย																				
ชาวประวิทย์																				
กระตังแดง																				
บุรณะเจด																				
แดงวาสนา																				
โคมอนด์																				
รินนภา																				
หมี																				
Bluebutterfly																				
ลายสิรินธร																				
ชาวบริษัช																				
จันทน์บัว																				
กิมหงษ์																				
อินทวงศ์																				
มาดาม																				
สุริยพิศ																				
แดงจรี																				
แจ๊คคอนเสิร์ต*																				
ผกมิ่ง																				
ชิดชม																				
แดงสะอาด																				
พัลร์ติมา																				
ชาแนล																				
เคหวน																				
บอม17ชมพู																				
บอม17แดง																				
บักบอม17																				
นิ่ววรรณ																				
แดงสุภาพ																				
รากระ																				
เอริกา																				
บอมกัลยา																				
ใจแดง																				
ชาว5N																				
มีดสิงคโปร์																				
สมันเรด																				
แดงอรุณ																				
โบตัน																				
ไวบาส																				
ชาว4N																				
นาซ่าบริด																				
ชมพูเฉลิมพร																				
แดงเฉลิมศรี																				
บอม17																				
เคแดง																				
แดงสุวิมล																				
ชาวรมังไวท์																				
สีฟ้าแดง																				
ลิซ่า																				
ส่าราญเรด																				
เซ็นเซชั่น***																				
ราบิน																				
มีดพื้น																				
มีดเวลด																				
เอชสกุล																				
วิโรจน์5N																				
ชาวฮูก																				
ชาวติลก																				
แดงพิริยา																				
สีฟ้าไวท์																				
ทับทิมสยาม																				
อรุณไวท์																				
ลายสคราม																				
มอร์บิงสตาร์																				
ฉอรา																				
อติเชิษ																				
ชมพูเอมอร																				

* แจ๊คเกอร์คอนเสิร์ต

** เซ็นเซชั่นคอนเสิร์ต

ภาคผนวก 1 (ต่อ) ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 70 พันธุ์ที่ส่งเคราะห์จากโพรมีเตอร์ G10

ชื่อพันธุ์	ขนาด DNA (bp)																											
	1990	1930	1870	1782	1665	1469	1376	1330	1166	1132	965	915	861	812	785	752	720	674	649	620	603	580	537	513	500	490	460	
ชาวสวนาน	—								—	—	—				—		—			—			—		—			
แอนนา	—		—						—						—				—	—			—				—	
ควีนฟิงค์	—								—						—								—				—	
ชาวเลอริเวีย	—							—	—	—	—				—				—	—			—		—			
ชาวประวิทย์	—							—	—	—	—				—				—	—			—		—			
กระตังแดง	—		—					—	—						—				—	—			—		—			
บุรณะเจด	—								—		—				—								—	—				
แดงวาสนา	—		—		—				—					—	—		—			—	—		—					
โดมอนต์	—		—					—	—						—								—		—			
รินนภา	—		—		—				—						—					—	—		—		—			
หมี	—								—						—					—			—	—				
Bluebutterfly	—								—			—			—					—			—		—			
ลาซสิรินทร์	—								—			—			—					—			—		—			
ชาวบุรีชิง	—								—		—				—					—			—		—			
จอนันน์ไวท์	—								—	—	—				—					—			—		—			
กิมหล่งฟิงค์	—								—		—				—					—			—		—			
อินทวงศ์	—						—		—						—		—						—		—			
มาดาม	—								—						—				—				—		—			
สุริยพิศ	—								—						—					—			—		—			
แดงจรี	—		—						—						—					—			—		—			
แจ๊คคอนเสิร์ต*	—								—		—		—		—		—			—		—		—		—		
ผกบุ้ง	—								—	—	—				—					—			—		—			
ชิดชม	—								—						—					—			—		—			
แดงสะอาด	—								—						—					—			—		—			
ฟาร์ติมา	—							—	—	—	—				—					—			—		—			
ชาแนล	—								—						—					—			—		—			
เคทวาน	—		—						—						—					—			—		—			
บอม17ชมพู	—								—						—					—			—		—			
บอม17แดง	—								—						—					—			—		—			
ปักบอม17	—		—						—						—					—			—		—			
ปิ๋ววรรณ	—								—						—					—			—		—			
แดงสุภาพ	—		—						—						—					—			—		—			
ชากระบะ	—								—						—					—			—		—			
เชริก้า	—								—						—					—			—		—			
บอมกัลยา	—								—						—					—			—		—			
ใจแดง	—		—						—						—					—			—		—			
ชาว5N	—								—						—					—			—		—			
มิตสิงคโปร์	—		—						—						—					—			—		—			
สมินเรด	—								—						—					—			—		—			
แสงอรุณ	—			—					—						—					—			—		—			
โอบัน	—			—					—						—					—			—		—			
ไวบาส	—								—		—				—					—			—		—			
ชาว4N	—								—						—					—			—		—			
นาซาบริด	—								—						—					—			—		—			
ชมพูเฉลิมพร	—								—						—					—			—		—			
แดงเฉลิมศรี	—								—						—					—			—		—			
บอม17	—		—						—						—					—			—		—			
เคแดง	—					—			—						—					—			—		—			
แดงสุวิมล	—								—						—					—			—		—			
ชาร์มมิงไวท์	—		—						—		—				—					—			—		—			
ชีซ่าแดง	—		—						—						—					—			—		—			
ลีซ่า	—								—						—					—			—		—			
สำราญเรด	—								—						—					—			—		—			
เหิมนชินา**	—								—						—					—			—		—			
ชาบิน	—								—						—					—			—		—			
มิตทิน	—								—						—					—			—		—			
มิลเวิลด์	—								—						—					—			—		—			
เฮียสกุล	—								—						—					—			—		—			
วิโรจน์5N	—								—		—				—					—			—		—			
ชาวอุก	—	—							—		—				—					—			—		—			
ชาวคิลก	—								—		—				—					—			—		—			
แดงพิริสา	—		—						—						—					—			—		—			
สีพิไล	—		—						—						—					—			—		—			
ทับทิมสยาม	—								—						—					—			—		—			
อรุณไวท์	—								—						—					—			—		—			
ลาออลาม	—								—						—					—			—		—			
มอร์นิงสตาร์	—								—		—				—					—			—		—			
ลอรา	—		—						—						—				—				—		—			
อติเชียว	—		—						—						—					—			—		—			
ชมพูเอมอร	—								—						—					—			—		—			

* แจ๊คคอนเสิร์ต

** เซินเซชินอลเพอร์เฟ็ค

ภาคผนวก 1 (ต่อ) ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 70 พันธุ์ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ G13

ชื่อพันธุ์	ขนาด DNA (bp)											
	1677	1557	1220	1176	1100	1031	975	555	500	414	290	200
ชาวสวน	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
แอนนา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ควินทิงค์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชาวเลอร์เวีย	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชาวประวิทย์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
กระตังแดง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
บุรณะเจด	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
แดงวาสนา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
โคมอนด์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
รินนภา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
หมี	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bluebutterfly	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ลายสีรินทร์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชาวบุรีขิง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
จอห์นนี่ไวท์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
กิมหลงทิงค์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
อินทวงศ์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
มาดาม	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
สุริยพิข	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
แดงจรี	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
แจ๊คคอนเสิร์ต*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ผักบุ้ง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ซิคชม	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
แดงสะอาด	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ฟาร์ติมา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชาแนล	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
เคหวาน	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
บอม17ชมพู	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
บอม17แดง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
บักบอม17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
นิวรรรณี	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
แดงสุภาพ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชาวกระ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
เอริก้า	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
บอมกัฒธา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ใจแดง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชาว5M	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
มีสสิงคโปร์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
สมันเรด	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
แสงอรุณ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
โบลัน	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ไวบาส	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชาว4M	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
นาซาบรีด	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชมพูเฉลิมพร	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
แดงเฉลิมศรี	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
บอม17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
เคแดง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
แดงสุวัฒน์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชาร์มมิงไวท์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ซีชาร์แดง	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ลิซ่า	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ฟ้าราญเรด	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
เซ็นเซชัน**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชาบีบ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
มีสทิน	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
มีสเจลด์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
เฮียสกุล	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
วิโรจน์5M	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชาวชุก	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชาวติลก	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
แดงพิริชา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ซีพีไวท์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
พันทิพย์สยาม	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
อรุณไวท์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ฉายสยาม	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
มอร์นิ่งสตาร์	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ดอรา	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
อลิเซีย	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ชมพูเอมอร	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* แจ๊คคอนเสิร์ต

** เซ็นเซชันบอลลเพอร์เพิล

ภาคผนวก 1 (ต่อ) ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 70 พันธุ์ที่ส่งเคราะห์จากไหม้เมอร์ P2672

ชื่อพันธุ์	ขนาด DNA (bp)														
	1508	1302	1174	1115	1071	972	834	763	725	627	600	575	536	515	200
ขาวตบาม															
แชนนา															
ควินทิงค์															
ขาวเลอว์เวีย															
ขาวประวิทย์															
กระหังแดง															
บุรณะเจด															
แดงวาสนา															
โคมอนด์															
จินนภา															
หมี															
Bluebutterfly															
ฉายสิรินทร์															
ขาวบริสุทธิ์															
จ่อพันนีไวท์															
กิมพลีทิงค์															
อินทวงศ์															
มดาม															
สุริย์ฟ้า															
แดงจรี															
แจ๊คคอบเลิร์ด*															
ผักบุ้ง															
ซัดชม															
แดงระอาด															
ฟาร์ติมา															
ซาแนล															
เคหวน															
บอม17ชมพู															
บอม17แดง															
บักบอม17															
บิวรรณี															
แดงสุภาพ															
ชากระ															
เอริก้า															
บอมกัลดา															
ใจแดง															
ขาว5N															
มีดสิงคโปร์															
สมีนเรด															
แสงอรุณ															
โบทัน															
ไวบาสู															
ขาว4N															
นาซาบรีด															
ชมพูเจดิมพร															
แดงเจดิมศรี															
บอม17															
เคแดง															
แดงสุวิทย์															
ชาร์มมิงไวท์															
สีฟ้าแดง															
ลิซ่า															
ฟ้าราเบเรด															
เขินเขิน***															
ซาบิน															
มีสทิน															
มีดเวสต์															
เชียวสกุล															
วิโรจน์5N															
ขาวยูกิ															
ขาวคิลก															
แดงพิริยา															
สีฟ้าไวท์															
ทับทิมสยาม															
อรุณไวท์															
ดาชสยาม															
มอร์นิงสตาร์															
ลอรา															
อลิเซีย															
ชมพูเอมอร															

* แจ๊คคอบเลิร์ด

** เขินเขินนอลเพอร์เฟ็ค

ภาคผนวก 1 (ต่อ) ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 70 พันธุ์ที่ส่งเคราะห์จากโพรมเมอร์ P2674

ชื่อพันธุ์	ขนาด DNA (bp)																			
	2894	1990	1870	1400	1255	1155	1001	984	952	935	836	571	515	490	478	456	380	365		
ชาวสนาน																				
แอนนา																				
ควีนพีค																				
ชาวเลอว์เวีย																				
ชาวประวิทย์																				
กระตังแดง																				
บุรณะเจด																				
แดงวาสนา																				
โคมอบด์																				
รินนภา																				
หมี																				
Bluebutterfly																				
ลาอสิรินทร์																				
ชาวบรีชชิง																				
จอร์นบีไวท์																				
กิมหลงพิงค์																				
อินทวงศ์																				
มาตาม																				
สุริย์พิช																				
แดงจรี																				
แจ๊คคอนเสิร์ต*																				
ผักบุ้ง																				
ชิดชม																				
แดงสะอาด																				
ฟ้าร์ติมา																				
ชาแนล																				
เคหวน																				
บอม17ชมพู																				
บอม17แดง																				
บิกบอม17																				
นิ่ววรรณิ																				
แดงสุภาพ																				
ชากระ																				
เอริก้า																				
บอมกัลดา																				
ใจแดง																				
ชาว5N																				
มีสซิงคโปร																				
สมีนเรด																				
แดงอรุณ																				
โบตัน																				
ไวบาส																				
ชาว4N																				
นาซาบรีด																				
ชมพูเจดิมพร																				
แดงเจดิมศรี																				
บอม17																				
เคแดง																				
แดงสุวิทย์																				
ชาร์มมิงไวท์																				
ชีชาร์แดง																				
ลีซ่า																				
สำราญเรด																				
เซ็นเซชั่น**																				
ซาบิน																				
มีสทิบ																				
มีสเวิร์ด																				
เอิสสกุล																				
วิโรจน์5N																				
ชาวอุก																				
ชาวติสกา																				
แดงพิริยา																				
ชีฟไวท์																				
ทับทิมสยาม																				
อรุณไวท์																				
ลายสยาม																				
มอร์นิงดาร์																				
ลอร่า																				
อลิเซีย																				
ชมพูเขมอร																				

* แจ็คเกอร์สันคอนเสิร์ต

** เซ็นเซชั่นมอลเพอร์เก็ต

ภาคผนวก 1 (ต่อ) ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 70 พันธุ์ที่ส่งเคราะห์จากโพรมเมอร์ ISSR11

ชื่อพันธุ์	ขนาด DNA (bp)																				
	1200	1010	975	925	860	799	717	700	679	652	625	599	550	532	500	476	451	431	370	346	330
ขาวสนาน	—			—	—			—			—			—	—			—			—
แอนนา	—							—	—					—	—		—				
ควีนพิงค์					—	—	—														—
ขาวเลอว์เวีย	—	—	—	—				—													—
ขาวประวิทย์	—	—		—				—													—
กระดังงะแดง				—				—						—	—				—	—	—
บุรณะเจด								—				—				—					—
แดงวานานา			—					—						—	—	—					—
โดมอนต์								—				—									
รินนภา								—						—	—		—	—			
หมี								—		—											
Bluebutterfly								—									—	—			
ลายสีรินทร์	—							—													
ขาวบริสุทธิ์	—	—		—				—													
จอห์นบีไวท์			—	—			—	—													—
กิมพลีพิงค์			—	—			—	—													
อินทวงศ์	—	—	—	—			—	—													
มาดาม							—	—													
สุริยพิศ	—		—	—			—	—													
แดงจรี							—	—									—	—			
แจ๊คคอนเสิร์ต*			—	—	—		—	—			—										
ผักบุ้ง	—							—													—
ชิดชม								—													
แดงระอาด								—													
พัลวันตีมา	—		—	—				—													—
ซาแนล	—		—	—				—													
เคหวน								—													
บอม17ชมพู								—													
บอม17แดง								—													
บิกบอม17								—													
นิววรรณ	—							—													
แดงสุภาพ								—													
ชากระ								—													
เชริก้า								—													
บอมกัฒยา								—				—									
โจนดง								—													
ขาว5N	—				—			—													
มีดสิงคโปร์		—	—	—				—													
สมีนเรศ								—													
แสงอรุณ								—													
ใบดั้น								—													
ไวบาส	—							—													
ขาว4N	—							—													
นาซ่าบิธ								—													
ชมพูเฉลิมพร	—			—				—													—
แดงเฉลิมศรี								—													—
บอม17								—													—
เคแดง								—													—
แดงสุวัฒน์								—													—
ชาร์มมิงไวท์								—													—
ชิซ่าแดง								—													—
ลิซ่า	—							—													—
สำราญเรศ								—													—
เซ็นเซชั่น**				—				—						—							—
ซาบิน								—					—								—
มีสทิน								—													—
มีสเวิลด์								—													—
เอชสกูล				—				—													—
วิโรจน์5N	—			—	—			—													—
ขาวยูนิ	—			—				—													—
ขาวคัลลา	—			—				—													—
แดงพิริยา								—													—
สีพีไวท์				—				—													—
ทับทิมสยาม								—	—												—
อรุณไวท์	—			—				—													—
ดาบสยาม	—			—				—													—
มอร์นิงสตาร์	—			—				—													—
ลอรา								—													—
อลิเซีย								—						—				—			—
ชมพูเอมอร								—													—

* แจ๊คเกอร์คอนเสิร์ต

** เซ็นเซชันดอร์เฟิล

ภาคผนวก 1 (ต่อ) ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 70 พันธุ์ที่ส่งเคราะห์จากไพรเมอร์ ISSR25

ชื่อพันธุ์	ขนาด DNA (bp)																			
	1680	1565	1430	1300	1246	1200	1175	1107	1065	928	871	840	800	751	725	700	683	647	570	500
ชาวสนาน																				
แอนนา																				
ควินพีงค์																				
ชาวเลอว์เวอ																				
ชาวประวิทย์																				
กระตังแดง																				
บุรณะเจด																				
แดงวาสนา																				
โดมอนด์																				
รินนภา																				
หมี																				
Bluebutterfly																				
ลายสิริบทร์																				
ชาวบรัชชิง																				
จอห์นบีไวท์																				
กิมหลงพีงค์																				
ฉันทวงศ์																				
มาดาม																				
สุริย์พีช																				
แดงจรี																				
แจ๊คคอนเสิร์ด*																				
มักบู้ง																				
ชิตชม																				
แดงสะอาด																				
ฟาร์ดีมา																				
ชาแนล																				
เคนวาน																				
บอม17ชมพู																				
บอม17แดง																				
บักบอม17																				
นิ่ววรรณ																				
แดงสุภาพ																				
ชากระบะ																				
เอริกา																				
บอมกัลฮา																				
โจแดง																				
ชาว25N																				
มิสคิงคโปร																				
ดมินเรด																				
แดงอรุณ																				
โบคัน																				
ไวบาส																				
ชาว24N																				
นาซาบริด																				
ชมพูเฉลิมพร																				
แดงเฉลิมศรี																				
บอม17																				
เคแดง																				
แดงสุวัฒน์																				
ชาร์มมิงไวท์																				
ชีซ่าแดง																				
ลีซ่า																				
สำราญเรด																				
เซ็นเซชัน**																				
ซาบีน																				
มิสทิน																				
มิสเวลด																				
เอชสกูล																				
วิโรจน์5N																				
ชาวยูกิ																				
ชาวคิลก																				
แดงพิริยา																				
ซีทีไวท์																				
ทับทิมสยาม																				
อรุณไวท์																				
ฉายสยาม																				
มอร์นิ่งสคาร์																				
ดอรา																				
อดิเซีย																				
ชมพูเอมอร																				

* แจ๊คเกอร์คอนเสิร์ด

** เซ็นเซชันออกเพอร์เทิล

ภาคผนวก 2 ตารางแสดงชื่อพันธุ์และประวัติของพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า 70 พันธุ์

กลุ่มที่ 1 กลุ่มย่อย 1.1 มี 31 พันธุ์

พันธุ์	แม่พันธุ์	พ่อพันธุ์	ประวัติการกลายพันธุ์
1. เอริก้า	-	-	-
2. ซากุระ	แจ็กเกอร์ลิน โทมัส	ทอมมี่เดิร์ก	-
3. ขาวบลิซซิ่ง	-	-	-
4. สุริย์พีช	ขาวเซ่ x ขาวฟอร์ม (ลูกผสมขาวเบนซ์)	ขาวเซ่ x เอริก้า (ลูกผสมเหลืองส้ม)	-
5. กิมหลงพิงค์	โคมอนสตาร์	ควีนเซาท์อีส	-
6. นาซ่าปีท	ซากุระ (Sakura Pink)	แอนนา (Expol Anna)	-
7. ขาว 5 N	วอลเตอร์โอมาย	ควีนฟรอนต์	-
8. นิวารรณนี	ฮาวายเอียน	ทอมมี่เดิร์ก	-
9. ขาวสนาน	-	-	-
10. วิโรจน์ 5 N	-	-	-
11. อรุณไวท์	จอห์นไวท์	วอลเตอร์โอมาย 4 เอ็น	-
12. มอร์นิ่งสตาร์(MS)	เค็บบี เบอร์ 2	เอกพล	-
13. ลายสยาม	-	-	-
14. ไวพาส	วอลเตอร์โอมาย	ไวพาสบิวตี้	-
15. ควีนพิงค์	ขาวสนาน	แอนนา	-
16. อินทวงศ์	คาร์ซีมิกามิ	วอลเตอร์โอมาย	-
17. จอห์นนี่ไวท์	แจ็กเกอร์ลิน โทมัส	วอลเตอร์โอมาย 2 เอ็น	-
18. ขาวดิลก	ลูกผสมของพันธุ์ฟ้าแลบ นอฟซีส	วอลเตอร์โอมาย	-
19. ขาวยูกิ	-	-	-
20. ซิฟไวท์	-	-	-
21. ลิซ่า	-	-	-
22. ขาวเลอร์เวีย	ฮาวายเอียน	ทอมมี่เดิร์ก	-
23. ขาวประวิทย์	-	-	-
24. บุพผิวรรณ	แจ็ก-ฮาวาย	ทีโอดอร์ทาากูชิ	-
25. แดงเฉลิมศรี	แจ็กเกอร์ลินคอนเสิร์ต	แดงขึ้นสงวน	-

พันธุ์	แม่พันธุ์	พ่อพันธุ์	ประวัติการกลายพันธุ์
26. ชิดชม	-	-	-
27. แดงสะอาด	-	-	-
28. เซนเซชันเนลเพอร์เฟ็ค	แจ็กเกอร์นคอนเสิร์ต	โมริสา	-
29. สมิ้นเรด	โรโบโต้โรมันด์	แจ็กเกอร์นคอนเสิร์ต	-
30. ซาบิน	ฮาวายเอียนบิวตี้	ทอมมีเคิร์ก	-
31. ขาว 4 N	ทีโอคอร์ทากูชิ	แกรนดิไอ (Grantii)	-

กลุ่มที่ 1 กลุ่มย่อย 1.2 มี 26 พันธุ์

พันธุ์	แม่พันธุ์	พ่อพันธุ์	ประวัติการกลายพันธุ์
1. เอียสกุล	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia 'Red Jo'
2. โจแดง	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia 'Jo'
3. แดงพิริยา	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia 'K Wan'
4. มิสทิน	-	-	-
5. ส้าราญเรด	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia 'Earsakul'
6. มิสเวลด์	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia 'No.16'
7. แดงจู้รี	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia 'Red Jo'
8. โซเนีย 17	ซีซาร์	ทอมมีเคิร์ก	-
9. แดงสุวัณน์	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia 'K Deang'
11. ลอรา (LR)	เชอร์รี่	อมีเรีย	-
12. โบตัน	-	-	-
13. แสงอรุณ			กลายพันธุ์มาจาก Sonia '17 Red'

พันธุ์	แม่พันธุ์	พ่อพันธุ์	ประวัติการกลายพันธุ์
14. ชมพูเอมอร	-	-	
15. แดงสิรินทร์	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia '17 Red'
16. แดงสุภาพ	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Shavin White (ลูกผสม วอลเตอร์ โอมา ย x ควีนฟลอริส)
17. โซเนีย 17 ชมพู	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia 'No. 17'
18. โซเนีย 17 แดง	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia 'No. 17'
19. เหวหวาน	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia 'No. 17'
20. โซเนียกัลยา	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia 'No. 17'
21. แดงวาสนา	-	-	กลายพันธุ์มาจาก Sonia '17 Red'
22. มิสสิงคโปร์	โซเนีย17แดง	สมุทรสงคราม	-
23. แอนนา	ลิ้มเฮป่า	ทอมมีเดร์ก	-
24. อลิเซีย(AS)	เอกพล	ทอมมีเดร์ก	-
25. ทับทิมสยาม	ลิ้มเฮป่า	ทอมมีเดร์ก	-
26. กระทั่งแดง	โจแดง	อีเมลดำสีแดง	-

กลุ่มที่ 2 มี 1 พันธุ์คือ ชาร์มมิ่งไวท์

พันธุ์	แม่พันธุ์	พ่อพันธุ์	ประวัติการกลายพันธุ์
1. ชาร์มมิ่งไวท์	-	-	-

กลุ่มที่ 3 มี 2 พันธุ์

พันธุ์	แม่พันธุ์	พ่อพันธุ์	ประวัติการกลายพันธุ์
1. บุรณะเจด	บางกอกกรีน	บุรณะแฟนซี	-
2. ซาแนล	-	-	-

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 10 พันธุ์

พันธุ์	แม่พันธุ์	พ่อพันธุ์	ประวัติการกลายพันธุ์
1. ซีชาร์แดง			
2. ชมพูเฉลิมพร	ซีชาร์4N	วอลเตอร์โอมา4 N	-
3. แจ็กเกอร์คอนเสิร์ต	นคอนเสิร์ต	แจ็กเกอร์โทมัส	-
4. สิรินทร์บุปผ์เตอร์ฟลายด์	นิววรรณ	แจ็กเกอร์คอนเสิร์ต x การาวบิวดีสีม่วง	-
5. ลายสิรินทร์	ลูกผสมของพันธุ์แจ็ก เกอร์โทมัสบลู	ลูกผสมของพันธุ์แคนดี้	-
6. หมีใหญ่แพนด้า	Lim Hepa	ทอมมี่เดิร์ก	-
7. รินนภา	รุ่งเรือง	ทอมมี่เดิร์ก	-
8. ไดมอนด์สตาร์	ฮาวายเอียนบิวตี้	ทอมมี่เดิร์ก	-
9. ฟาติมา	ลิ้มชองมิน	เมย์นีก (May Neal)	-
10. ปอมปาดัวร์	หลุยเบรเลียด (Louis Bleriot)	ฟาแลนนอปซิส (Phalaenopsis)	-

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมในระดับ DNA ของขนุนพันธุ์การค้า
Molecular Characterization of Cultivated Jackfruit '*Artocarpus heterophyllus*'
using DNA analysis.

สุภาพ สุนทรนนท์¹

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล²

กลุ่มงานวิจัยพัฒนานาคราเชื้อพันธุ์

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ในระดับ DNA ของขนุนพันธุ์การค้า ได้ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี โดยนำตัวอย่างใบขนุนจากแปลงรวบรวมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีและสวนเกษตรกรในเขตจังหวัดจันทบุรี มาสกัด DNA และทำการแยกความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Touch Down PCR โดยใช้ ISSR primer ทั้งหมด 14 สาย จากการศึกษาพันธุ์ขนุนทั้งหมด 43 พันธุ์ 90 ตัวอย่าง ผลการทดลองปรากฏว่า สามารถตรวจสอบแถบ DNA ของขนุนได้ทั้งหมด 199 ตำแหน่ง ซึ่งแบ่งเป็น monomorphic band 91 ตำแหน่ง(45.7%) และ polymorphic band 108 ตำแหน่ง (54.7%) เมื่อทำการวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้ Nei and Li Similarity Coefficient และสร้างโครงสร้าง (Dendrogram) เพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) พบว่า พันธุ์ขนุน 43 พันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันมีพันธุกรรมใกล้ชิดกันมากถึงประมาณ 90% สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ในแต่ละกลุ่มยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ตามระดับความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

คำนำ

ขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) เป็นไม้ผลขนาดใหญ่ มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางอินเดียตอนใต้ ในประเทศไทยขนุนมีปลูกกันมาตั้งแต่โบราณ โดยปลูกเป็นไม้มงคล ไม่ให้ร่มเงาตามหัวไร่ปลายนา ไม่ได้มุ่งเน้นผลผลิตเป็นการค้าเช่นปัจจุบัน ในอดีตขนุนที่นิยมปลูกมีเพียงไม่กี่พันธุ์ เช่น พันธุ์ดาบวิชัย ขุนวิชาญ แดงรัศมี แจ็กโตะ ฟ้าถล่ม ทองสุตใจ จำปากรอบ เนื่องจากเดิมเกษตรกรมักไม่ค่อยให้ความสนใจที่จะคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ ประกอบกับการขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศที่ได้ผลดียังไม่แพร่หลาย เกษตรกรจึงมักปลูกโดยการเพาะเมล็ดต่อ ๆ กันไป ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมมากมาย ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมามีสายพันธุ์ขนุนออกสู่ตลาดเป็นจำนวนมาก ประมาณได้ถึง 70-80 พันธุ์ แต่ปัญหาก็คือการตั้งชื่อพันธุ์ไม่มีหลักเกณฑ์แน่นอน เช่น เรียกชื่อตามสถานที่ปลูก ชื่อผู้ปลูก ชื่อผู้ให้พันธุ์ ตลอดจนรูปร่าง

รหัสการทดลอง 05-02-47-030

¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ² ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ของผล หรือสีของยวง ดังนั้นการจำแนกหรือตรวจสอบพันธุ์ด้วยลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอและมีโอกาสผิดพลาดได้มาก โดยเฉพาะขณะยังเป็นต้นอ่อนเพราะบางพันธุ์มีลักษณะภายนอกคล้ายกัน แต่มีชื่อต่างกัน ในขณะที่บางพันธุ์มีลักษณะต่างกัน กลับมีชื่อเหมือนกัน ทำให้สับสน และยากต่อการตรวจสอบ กว่าเกษตรกรจะทราบว่าพันธุ์ที่ซื้อมาตรงตามพันธุ์ที่ต้องการหรือไม่ ต้องรอจนกระทั่งออกผลอย่างน้อย 3-5 ปี ซึ่งหากพันธุ์ที่ซื้อมาไม่ตรงตามที่ต้องการ ก็เป็นการสูญเสียเวลาและโอกาสรวมถึงเพิ่มภาระการลงทุนแก่เกษตรกรหากต้องปลูกใหม่

จากปัญหาดังกล่าว นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามหาวิธีในการจำแนกหรือพิสูจน์พันธุ์ในขณะยังเป็นต้นอ่อน โดยการพัฒนาวิธีการด้านโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker) มาใช้ในการจำแนกชนิด/พันธุ์พืช ในทศวรรษที่ผ่านมาวิธีการที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม จุดกำเนิดของพันธุ์ตลอดจนการจำแนกพันธุ์และการศึกษาลายพิมพ์ DNA คือ Polymerase Chain Reaction (PCR) technique (William et al., 1990) และโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้กันแพร่หลายคือ Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Huang et al., 2003; Kumar et al., 1998; Liu et al., 2003) แต่ปัจจุบันความนิยมเริ่มลดลงเนื่องจากผลที่ได้มี reproducibility ค่อนข้างต่ำ Inter simple sequence repeat (ISSR) marker เป็น PCR-based marker ชนิดหนึ่งที่กำลังเป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ISSR marker เป็น primer (primer) ที่สร้างขึ้นโดยอาศัยพื้นฐานของการเรียงลำดับเบสของ Simple Sequence Repeat (SSR) (สายดีเอ็นเอตำแหน่งที่มีเบสซ้ำกันเป็นชุดๆ) ตรงตำแหน่งด้านข้างทั้ง 2 ข้าง (5' or 3') ของ target SSRs (Zietkiewicz et. al., 1994) primer จะจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณ microsatellite or SSRs ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีเบสซ้ำกันเป็นชุดๆ และพบได้มากมายในจีโนมพืช (Wang et. al., 1994) ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์ DNA ที่มีขนาดต่างๆ ขึ้นอยู่กับว่า primer ที่ใช้จะจับกับ DNA ที่ตำแหน่งใดบ้าง เมื่อนำ DNA ที่สังเคราะห์มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่น gel จะปรากฏเป็นแถบ DNA ที่ตำแหน่งต่างๆ แถบ DNA ที่ปรากฏบนแผ่น gel ที่ตำแหน่งแตกต่างกัน (Polymorphic band) จากการใช้ ISSR marker เกิดจากการที่จีโนมตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง มีชุดเบสซ้ำในจำนวนไม่เท่ากัน หรือไม่มีชุดเบสซ้ำชุดนั้น หรือชุดเบสซ้ำชุดนั้นเกิดการขาดหาย (deletion) ของเบส หรือเพิ่มขึ้น (insertion) ของเบสบางตำแหน่ง ทำให้ความยาวของขนาดของชุดเบสนั้นเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ขนาดของ DNA แตกต่างกัน ISSR marker จึงน่าจะเป็น marker ที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมพืช โดยเฉพาะพืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก (Zietkiewicz et. al., 1994) ซึ่งมีรายงานว่าใช้ได้ผลดีในไม้ผลหลายชนิด เช่น *Citrus* sp. (Fang and Roose, 1997; Fang et. al., 1998) grape (*Vitis vinifera* L.) (Moreno et. al., 1998) gooseberry (*Ribes* L.) (Lanham and Brennan, 1999) และ pear (Monte-Corvo et al., 2001)

สำหรับชนุน การศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางพันธุกรรมในระดับ DNA ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และปัจจุบันเกษตรกรเริ่มตระหนักถึงสิทธิประโยชน์ของการเป็นเจ้าของพันธุ์ และสนใจในการขอรับการคุ้มครองพันธุ์พืชตามพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช 2542 ดังนั้นเพื่อเป็นการรองรับพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งเป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบในการรับขึ้นทะเบียนพันธุ์พืช จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาลายพิมพ์ DNA และจัดทำเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ชนุนพันธุ์การค้า สำหรับใช้เป็นข้ออ้างอิงในการตรวจสอบพันธุ์ โดยเฉพาะในกรณีที่มีการจำแนกพันธุ์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยามีปัญหา นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค หรือวิธีการที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ DNA และศึกษาลักษณะรูปแบบลายพิมพ์ DNA ของชนุนพันธุ์การค้า สำหรับใช้จำแนกและ/หรือตรวจสอบพันธุ์ และเป็นข้อมูลด้านพันธุ์เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ

- 1.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบปรับอุณหภูมิขึ้นลงต่อเนื่อง (Thermocycler) Perkin Elmer, Gene Amp PCR 9700
- 1.2 เครื่องมือบันทึกภาพ DNA ได้แก่ เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator) กล้อง CCD และเครื่องพิมพ์ผลแบบ Thermal printer
- 1.3 เครื่องมือแยกขนาด DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าแบบแวนอน (Gel electrophoresis) พร้อมเครื่องกระจายกระแสตรง (Power supply)
- 1.4 เครื่องมือวิเคราะห์ DNA (Image Analyser) พร้อมโปรแกรมวิเคราะห์
- 1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดความเร็วสูงชนิดรักษาอุณหภูมิ
- 1.6 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง
- 1.7 ตู้บรักษาอุณหภูมิที่ 30-37 °C แบบเขย่าได้ (Incubator shaker)
- 1.8 อุปกรณ์ในการเตรียมตัวอย่าง ได้แก่ โกร่งบดยา กระตักน้ำแข็ง ถังใส่ไนโตรเจนเหลว หลอดสำหรับปั่นแยกตะกอนขนาด 1.5, 10 และ 50 ml ปิเปตดูดสารชนิดปรับปริมาตรได้ ขนาด 0.5 -1 ml
- 1.9 กระดาษพิมพ์ผล DNA ชนิด High glossy printing paper

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า ได้แก่ Tris-base, Glycine, Boric acid, Loading dye, DNA marker ขนาด 1 Kb

2.2 สารเคมีในการปรับความเป็นกรด-ด่าง ได้แก่ Hydrochloric acid, Sodium hydroxide, Acetic acid

2.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการสกัดไอโซไซม์และ DNA ได้แก่ PVP-10T, 2-Mercaptoethanol, Cetyltrimethylammonium bromide, Chloroform, Isoamyl alcohol, Absolute ethanol, Ethylene diamine tetraacetate (EDTA), Tris-HCl, Isopropanol

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการย้อม DNA ได้แก่ Ethidium bromide

2.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Agarose gel ได้แก่ Agarose powder

2.6 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ได้แก่ Taq DNA polymerase, Magnesium chloride, dNTPs

2.7 ชนิดของโมเลกุลเครื่องหมาย เป็นชนิด Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) primer 14 หมายเลข ได้แก่ ISSR10 ISSR11 ISSR12 ISSR17 ISSR18 ISSR23 ISSR26 ISSR27 ISSR34 ISSR40 ISSR46 ISSR48 ISSR64 และ ISSR74

วิธีการ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. การสกัด DNA ทำการสกัดตามวิธีของ Li and Midmore (1999) ที่ดัดแปลงเล็กน้อย โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1 เก็บตัวอย่างใบขนุนพันธุ์การค้า 43 พันธุ์ จากสวนขนุนในเขต จ.จันทบุรี โดยทำการสุ่มเก็บพันธุ์ละ 3 ต้น (ยกเว้นบางพันธุ์ที่สามารถหาได้เพียง 1 หรือ 2 ต้น)

1.2 นำตัวอย่างใบ มาล้างด้วยน้ำสะอาด ตามด้วยน้ำกลั่น เติดให้แห้ง นำไปตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วชั่งน้ำหนักประมาณ 2 กรัม

1.3 นำตัวอย่างใบที่ซังแล้ว มาบดให้ละเอียดกับไนโตรเจนเหลวในโถรงบดยา ตักผงละเอียดประมาณ 0.1 g ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml เติมสารสกัด (extraction buffer : 100mM Tris HCL, pH8.0; 20mM EDTA; 1.4M NaCl; 2%(w/v) CTAB and 0.2% mercaptoethanol (v/v) ลง ไป 500 ul เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่น (incubate) ที่ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

1.4 ดูดส่วนใสข้างบน (supernatant) ออกมาใส่หลอดใหม่ เติมสารละลาย chloroform : isoamyl (24:1) ลงไปในปริมาตรที่เท่ากับ supernatant เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

1.5 ดูดส่วนใสข้างบน (supernatant) ออกมาใส่หลอดใหม่ ระเหย chloroform : isoamyl โดยนำหลอดไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55°C ประมาณ 30 นาที แล้วเติมสารละลาย isopropanol ที่เย็นจัดลงในหลอด 1 เท่าของปริมาตรของ supernatant แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ -20°C 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำหลอดมาพลิกกลับไปมาเบาๆ จนกระทั่งสังเกตเห็นสาย DNA แขนงลอยอยู่ในสารละลาย ตกตะกอน DNA โดยนำหลอดไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

1.6 เทน้ำใสส่วนบนออก แล้วล้างตะกอน DNA ที่เกาะติดอยู่ข้างๆ หรือที่ก้นหลอดด้วย 70% ice-cold ethyl alcohol 3 ครั้ง

1.7 นำตะกอน DNA มาผึ่งให้แห้ง โดยการคว่ำหลอดไว้บนกระดาษซับ (Tissue paper)

1.8 ละลายตะกอน DNA ด้วยสารละลาย TE+RNase A 50 μl

1.9 ตรวจสอบปริมาณ DNA เบื้องต้น ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ DNA 10 μl + loading dye solution 2 μl ใช้ agarose gel 0.8%

1.10 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 260 และ 280 nm โดยใช้ DNA 10 μl + น้ำ 990 μl

2. การสังเคราะห์ DNA

2.1 นำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase(PCR) โดยในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 15 μl ในหลอด PCR ขนาด 0.2 ml ประกอบด้วย 1X PCR Buffer (Fermentas), 1.5mM MgCl_2 , 150mM dNTP, 1.3 μM Primer, 1unit Tag DNA Polymerase(Fermentas), และ 25ng DNA template

2.2 เมื่อผสมสารเคมีให้เข้ากันแล้ว นำหลอด PCR ไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง PCR Thermal cycler (Perkin Elmer, Gene Amp PCR 9700) โดยมี condition ดังนี้

94 $^{\circ}\text{C}$	5 : 00 นาที	1 รอบ
94 $^{\circ}\text{C}$	0 : 30 นาที	5 รอบแต่ละรอบอุณหภูมิลดลง 1 $^{\circ}\text{C}$
52 $^{\circ}\text{C}$	1 : 00 นาที	
72 $^{\circ}\text{C}$	1 : 00 นาที	
94 $^{\circ}\text{C}$	0 : 30 นาที	30 รอบ
48 $^{\circ}\text{C}$	1 : 00 นาที	
72 $^{\circ}\text{C}$	1 : 00 นาที	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 : 00 นาที	1 รอบ

นำผลผลิต PCR ไปแยกขนาด DNA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 X TBE buffer กระแสไฟ 100 Volt ประมาณ 2 ชม. หรือจนกระทั่งสีของ loading dye ห่างจากปลาย gel ประมาณ 1 ซม. นำแผ่น gel ไปตรวจดูแถบ DNA ด้วยเครื่อง UV- Transilluminater พร้อมบันทึกภาพเก็บไว้

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่บันทึกภาพไว้ ไปวิเคราะห์หาความแตกต่างและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชน 43 พันธุ์ ด้วย Image analysis system, Bio-1D++ version 99.03 (Bioprofil, Vilber Lourmat, France)

เวลาและสถานที่

พฤศจิกายน 2545- พฤศจิกายน 2547 ณ ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยพืชสวน จันทบุรี จ. จันทบุรี

ผลการทดลองและวิจารณ์

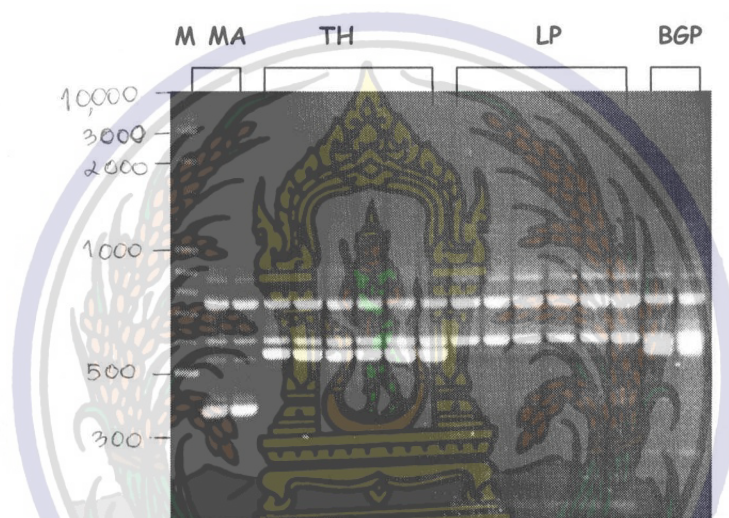
การสกัด DNA

ไม้ผลเมืองร้อนส่วนใหญ่ใบมักจะมียาง เมือก และพวกสารประกอบ Phenolic เป็นองค์ประกอบอยู่ค่อนข้างมาก ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการสกัดให้ได้ DNA ที่สะอาด มีสารปนเปื้อนน้อยที่สุด เพราะสารเหล่านี้หากปนเปื้อนอยู่ใน DNA จะยับยั้งและรบกวนปฏิกิริยาในการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งชนเป็นไม้ผลเมืองร้อนที่ใบมียางค่อนข้างมาก และเป็นปัญหาในการสกัด DNA ดังนั้นในการศึกษาขั้นแรกจึงมุ่งเน้นหาวิธีการสกัด DNA จากใบชนเพื่อให้ได้ DNA ที่สะอาด และปริมาณมากพอ สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป ในการทดลองเบื้องต้น ได้ทำการทดลองสกัด DNA จากใบชน 2 ระยะ คือ ใบอ่อน และใบเพสลาด โดยใช้ใบสด และใบที่ผึ่งลมให้น้ำแห้ง นำมาทดลองสกัดด้วยวิธีของ Li and Midmore (1999) จากการทดลองพบว่า การสกัด DNA จากใบเพสลาดที่ผึ่งลมให้น้ำแห้งก่อน DNA ที่ได้มีคุณภาพดีในขณะที่ DNA ที่สกัดจากใบสดทั้งใบอ่อนและใบเพสลาดมีลักษณะเหนียว บางครั้งมีสีน้ำตาลอ่อน ส่วนใบอ่อนผึ่งลมให้ผลไม่แตกต่างจากใบเพสลาด แต่ต้องให้ปริมาณใบมากกว่าและการทำความสะอาดยุ่งยากกว่า ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้ใบเพสลาด ซึ่งให้ปริมาณ DNA เฉลี่ย 27.8 ug/ml และอัตราส่วนของ OD260/280 มีค่าระหว่าง 1.75-1.89

การคัดเลือก Primer

เนื่องจากพันธุ์ชนที่มีอยู่หลากหลายในปัจจุบัน เกิดจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมตามธรรมชาติเพราะในอดีตที่ผ่านมาทุกพันธุ์มาจากการเพาะเมล็ดทั้งสิ้น เมื่อได้ผลเป็นที่พอใจก็ตั้งชื่อพันธุ์ตามคนปลูกบ้าง คนให้บ้าง ฯลฯ ยังไม่เคยมีรายงานเลยว่า มีพันธุ์ใดที่เกิดจากการผสมพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ตามหลักวิชาการ (พานิชย์ ยศปัญญา 2540) ชนพันธุ์ต่างๆจึงน่าจะมีความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรมใกล้เคียงกัน ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้ primer ชนิด ISSR (Zietkiewicz et al., 1994) ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ โดยในขั้นต้นทำการศึกษากับขนุนพันธุ์มาเลย์ และพันธุ์ทองสุตใจ ซึ่งมีลักษณะใบและผลแตกต่างกันอย่างเด่นชัด และทำการสังเคราะห์ DNA ด้วยวิธี Touchdown PCR จากการทดลองกับ primer ทั้งสิ้น 100 หมายเลข ผลปรากฏว่า มี 14 หมายเลขที่แสดงรูปแบบของ DNA แตกต่างกันระหว่าง 2 พันธุ์ จึงคัดเลือกไว้สำหรับการศึกษารุ่นต่อไป ภาพที่ 1 แสดงให้เห็นแถบ DNA ของขนุนพันธุ์ต่างๆ ที่ปรากฏบนแผ่น gel ที่มีขนาดแตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดรูปแบบการเรียงตัวของ DNA (DNA pattern) แตกต่างกัน แสดงความจำเพาะของแต่ละพันธุ์



ภาพที่ 1 ลักษณะรูปแบบ DNA ของขนุนพันธุ์ มาเลย์ (MA) ทองหอม (TH) เหลืองพิชัย(LP) และบ๊วยฉิมพลี (BGP) ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วย primer ISSR34 M = 1K marker

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของขนุนพันธุ์ต่างๆที่ปลูกเป็นการค้า

เมื่อนำ primer ทั้ง 14 หมายเลข (ตารางที่ 1) ที่คัดเลือกไว้มาทดลองกับขนุนพันธุ์ต่างๆ รวม 43 พันธุ์จำนวน 90 หมายเลข (ต้น) ผลปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบ DNA (DNA fragment) ได้ทั้งหมด 199 ตำแหน่ง ซึ่งมีขนาดโมเลกุลระหว่าง 206-1990 base pair(bp) โดยมีแถบที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์/ต้น (polymorphic band) 108 ตำแหน่ง คิดเป็น 54.3% และมีแถบที่ปรากฏอยู่ในทุกๆ พันธุ์/ต้น (monomorphic band) 91 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 45.7% การที่มี monomorphic band สูงเกือบ 50 % แสดงให้เห็นว่าพันธุ์ในกลุ่มตัวอย่างที่ทดลองมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตาม เมื่อนำรูปแบบ DNA หรือลายพิมพ์ DNA ของพันธุ์ต่างๆ มาเปรียบเทียบกัน พบว่าแต่ละพันธุ์มีลักษณะลายพิมพ์ DNA แตกต่างกัน (ภาคผนวก ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ชื่อ primer ลำดับนิวคลีโอไทด์ (base) และจำนวนแถบ DNA ที่สังเคราะห์จากขนุน พันธุ์การดำ 43 พันธุ์

ชื่อ primer	Sequence 5'...3'	Polymorphic Fragments no.)	Monomorphic Fragments no.)
ISSR 10	GAG AGA GAG AGA GAG AT	9	8
ISSR 11	GAG AGA GAG AGA GAG AC	8	6
ISSR 12	GAG AGA GAG AGA GAG AA	4	9
ISSR 17	CAC ACA CAC ACA CAC AA	8	6
ISSR 18	CAC ACA CAC ACA CAC AG	6	7
ISSR 23	TCT CTC TCT CTC TCT CC	4	6
ISSR 26	ACA CAC ACA CAC ACA CC	8	7
ISSR 27	ACA CAC ACA CAC ACA CG	7	6
ISSR 34	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	6	6
ISSR 40	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	13	7
ISSR 46	CAC ACA CAC ACA CAC ART	9	3
ISSR 48	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	7	5
ISSR 64	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	13	8
ISSR 74	CCC TCC CTC CCT CCC T	6	7
Total		108	91

เมื่อนำแถบ DNA ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดมาหาความสัมพันธ์ โดยใช้ Nei and Li Similarity Coefficient (Nei and Li, 1979) พบว่า กลุ่มพันธุ์ขนุนที่ทำการศึกษาคือ 43 พันธุ์ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ในระดับ 87 – 95% (ภาพที่ 2) ซึ่งให้เห็นว่า ขนุนพันธุ์การดำที่มีอยู่ในปัจจุบัน มี genetic background ที่ใกล้ชิดกันมาก และเมื่อนำข้อมูลมาทำ cluster analysis และ สร้าง Dendrogram เพื่อแบ่งกลุ่มตามความคล้ายคลึงทางลักษณะทางพันธุกรรมด้วย UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) ผลปรากฏว่าสามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ซึ่งมีความใกล้ชิดกันถึง 90% จึงเป็นไปได้ว่าพันธุ์ขนุนที่มีในปัจจุบัน อาจจะสืบเชื้อสายมาจากบรรพบุรุษในกลุ่มเดียวกัน จึงทำให้มี gene pool ค่อนข้างแคบ เพราะพันธุ์ขนุนในปัจจุบันเกิดจากการนำเมล็ดมาเพาะทั้งสิ้น เมื่อพบต้นที่ให้ผลเป็นที่พอใจก็เก็บเมล็ดไว้ไปปลูกต่อ ตัวอย่างเช่น พันธุ์ฟ้าดลุ่ม(เนื้อสีเหลืองทอง) กลายพันธุ์จากการเพาะเมล็ดขนุนพันธุ์ตาบ๊วยเมื่อประมาณ 60 ปีที่แล้ว จำปากรอบ(เนื้อสีเหลืองจำปา) มีรายงานว่าสืบเชื้อสายมาจากพันธุ์ตาบ๊วยเช่นกันแต่ไม่มีผู้ระบุแน่ชัดว่าเป็นชั้นลูกหรือหลาน แต่ในบางพันธุ์ไม่สามารถระบุต้นเชื้อพันธุ์ได้ ตัวอย่างเช่น ขนุนพันธุ์เหลืองเรวดี เป็นขนุนที่เกิดจากการ

เพาะเมล็ด ซึ่งเจ้าของเก็บเมล็ดมาจากซูปเปอร์มาเก็ต แล้วนำมาปลูกที่บ้านที่ซอยเรวดี เมื่อต้นโตพบว่า มีเนื้อเหลืองหนา รสชาติดี จึงให้ชื่อว่า เหลืองเรวดี เป็นต้น

จาก Dendrogram ในภาพที่ 2 จะเห็นว่าในระหว่าง 2 กลุ่มใหญ่ แต่ละกลุ่มประกอบไปด้วยพันธุ์ต่างๆที่สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามระดับของความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยชนวนพันธุ์ต่างๆ 17 พันธุ์ ที่ระดับความใกล้ชิดทางพันธุกรรม 90% ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยแรกประกอบด้วย พันธุ์โชควัฒนา ทองไพโรจน์ เหลืองไพลิน จำปาศรีราชา รวงทอง เพชรราชา เพชรราชา(ชลบุรี) คุณหญิง เหลืองเขาน้อย จำปาตะ (สวนคุณวิจิต) จำปากรอบ (บ้านคุณจักรินทร์) ทองประเสริฐ ทองส้ม ทองพิจิตร และทองสุดใจ กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยพันธุ์ จำปาตะ (สวนบ้านตาสาร) จำปากรอบ (แปลงรวมพันธุ์ ศวศ.จบ. และ สวนคุณวิจิต) ปิยะมาดา จำปาเกล็ดแก้ว และป่าจ้อ

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยพันธุ์ต่างๆ 26 พันธุ์ ซึ่งที่ระดับความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม ประมาณ 90% สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ 9 กลุ่มย่อย

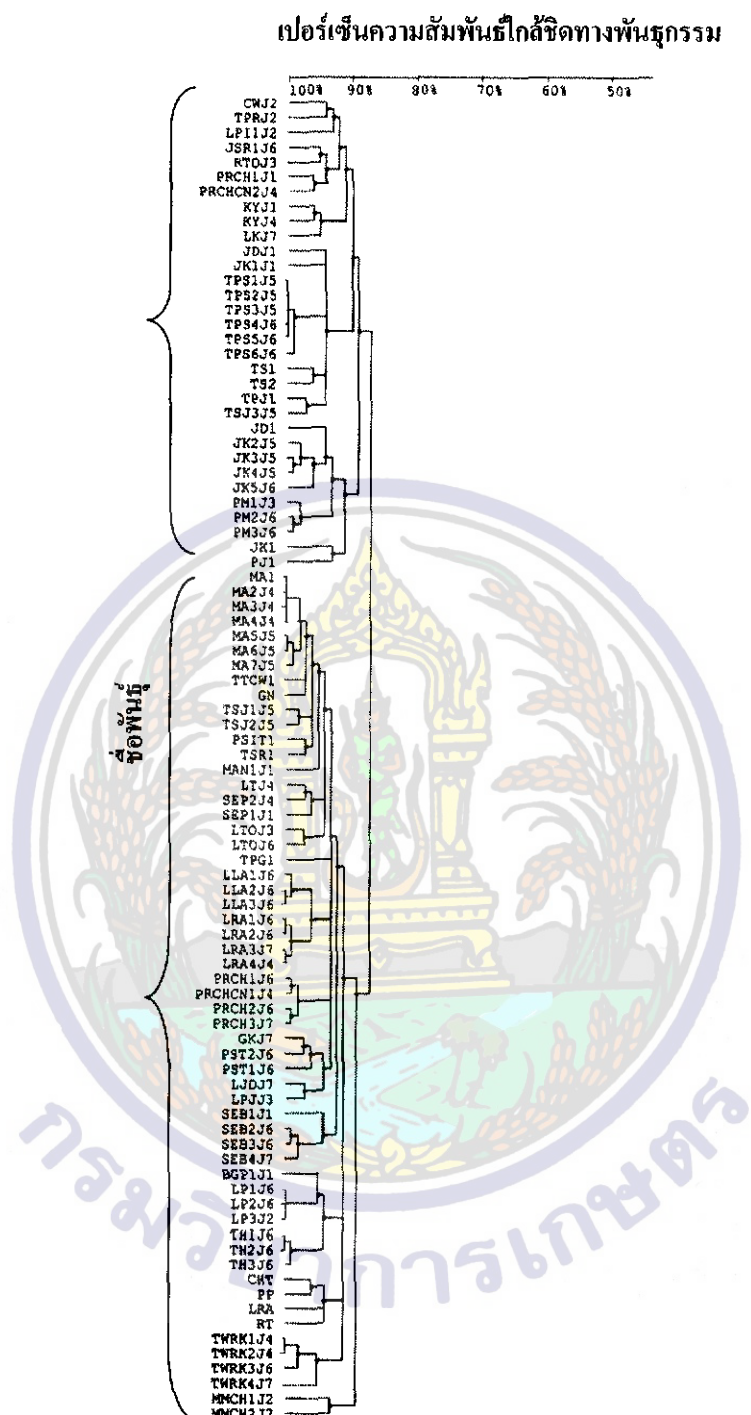
- กลุ่มย่อยที่ 1 มี 1 พันธุ์ คือ กลุ่มพันธุ์มาเลย์ (7 หมายเลข)
- กลุ่มย่อยที่ 2 มี 2 พันธุ์ คือ ทองทวีโชค และกิมไน้
- กลุ่มย่อยที่ 3 มี 3 พันธุ์ คือ ทองสุดใจ เพชรศรีทอง และทองส้มฤทธิ์
- กลุ่มย่อยที่ 4 มี 1 พันธุ์ คือ แม่เนื้อทอง
- กลุ่มย่อยที่ 5 ประกอบด้วย พันธุ์เหลืองทอง ศรีปราจีน และเหรียญทอง
- กลุ่มย่อยที่ 6 ประกอบด้วย พันธุ์ตะเภาแก้ว เหลืองระยอง เหลืองราชา เพชรราชา(ชล) เพชรราชา ก้านเขียว ไพศาลทักษิณ เหลืองจินแดง และเหลืองประจิม
- กลุ่มย่อยที่ 7 มีพันธุ์เดียวคือ พันธุ์ศรีบรรจง
- กลุ่มย่อยที่ 8 ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อยๆมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในระดับ 93 % กลุ่มแรกมี 8 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์บัวฉิมพลี เหลืองพิชัย ทองหอม กลุ่มที่ 2 มี 4 พันธุ์ ได้แก่ พระพิราพ แชมป์ ตะวันตก เหลืองเรวดี และรุ่งทิว กลุ่มที่ 3 มี 1 พันธุ์ คือ ทวายลุงเค
- กลุ่มย่อยที่ 9 มี 2 ต้น ซึ่งไม่ทราบชื่อ (Unknown) คาดว่าอาจจะเกิดจากการเพาะเมล็ด จากพันธุ์เดียวกัน เพราะมีความคล้ายคลึงกันมากถึงประมาณ 95%

จากการศึกษานี้ พบว่า ในบางพันธุ์ เช่น พันธุ์ มาเลย์ แม้เป็นพันธุ์เดียวกัน แต่สุมตัวอย่างใบจากหลายต้น และจากหลายสวน มีรูปแบบหรือลายพิมพ์ DNA ทั้งแบบที่เหมือนกันทุกประการ (identical pattern) (MA1,MA2J4, MA3J4, MA4J4) และแบบที่เหมือนกันไม่ทุกประการ(unidentical pattern) แต่มีความคล้ายคลึงในระดับ 98 % (MA5J5, MA6J5 และ MA7J5) ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากแต่ละต้นไม่ได้ขยายพันธุ์ด้วยวิธีไม่ใช้เพศ(vegetative propagation) จากต้นแม่ต้นเดียวกัน แต่มาจากต้นแม่พันธุ์หลายต้น ซึ่งแต่ละต้นอาจจะเพาะจากเมล็ดจากผลเดียวกันหรือต่างผลแต่ต้นเดียวกัน จึงทำให้

เกิดการแปรปรวนของพันธุกรรมได้ อย่างไรก็ตามทั้ง 7 ต้นมีลักษณะรูปแบบDNAคล้ายคลึงกันในระดับ 98-100% สำหรับพันธุ์บางพันธุ์ เช่น ทองสุตใจ และเพชรราชา จากผล cluster analysis ปรากฏว่าบางต้นจัดอยู่ในกลุ่มที่1 แต่บางต้นอยู่ในกลุ่มที่ 2 กรณีนี้คาดว่าอาจจะเกิดการติดป้ายชื่อ(Label) ผิดพลาด เพราะพันธุ์ที่นำมาปลูกเกษตรกรไม่ได้ขยายพันธุ์เอง แต่ซื้อพันธุ์มาจากร้านจำหน่ายพันธุ์ไม้ ซึ่งส่วนใหญ่ไม่ได้ขยายพันธุ์เองเช่นกันแต่รับพันธุ์มาจากแหล่งต่างๆอีกทอดหนึ่ง มีเพียงส่วนน้อยที่ขยายพันธุ์จากต้นแม่พันธุ์เองจึงมีโอกาสเกิดการผิดพลาดได้ง่ายและยากต่อการสืบหาประวัติ นอกจากนี้โดยทั่วไปร้านจำหน่ายพันธุ์ไม้ไม่มีการติดป้ายชื่อทุกต้น แต่จะจัดวางเป็นกลุ่ม ๆ และมีชื่อเพียงแถวแรกเท่านั้น สำหรับกรณีเช่นนี้อาจต้องติดตามดูลักษณะภายนอกเพิ่มเติม เช่น ลักษณะของผล สีของยวง เป็นต้น

สรุป

1. การวิเคราะห์DNAด้วยวิธี Touchdown PCR ร่วมกับ ISSR marker เป็นวิธีการที่สามารถจำแนกพันธุ์ชนุ่นได้อย่างมีประสิทธิภาพมาก สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ทุกพันธุ์และยังสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างต้นในพันธุ์เดียวกันซึ่งมีลักษณะรูปแบบDNAต่างกันเพียง 1-2 %
2. ชนุ่นพันธุ์การค้าในปัจจุบัน มีฐานทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันมาก มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุดเพียงประมาณ 10%
3. พันธุ์ชนุ่นที่ใช้ศึกษา 43 พันธุ์ 90 หมายเลข(1ต้น= 1หมายเลข) สามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และในแต่ละกลุ่มสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ โดยกลุ่มแรกประกอบไปด้วย 2 กลุ่มย่อย ส่วนกลุ่มหลังสามารถจัดแบ่งได้ 9 กลุ่มย่อย



ภาพที่ 2 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างขนุน 43 พันธุ์ (รายละเอียดชื่อพันธุ์ดู ภาคผนวก ตารางที่ 1)

เอกสารอ้างอิง

- พานิชย์ ยศปัญญา. 2540. ขนุน ยักษ์ใหญ่แห่งวงการไม้ผล สำนักพิมพ์มติชน กรกฎาคม 2540 153 หน้า
- Fang D.Q. and M. L.Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 408-417.
- Fang, D.Q.,R.R. Krueger, and M.L. Roose. 1998. Phylogenic relationships among selected *Citrus* germplasm accession revealed by Inter –simple Sequence Repeat (ISSR) marker. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123 (4) : 612-617.
- Fulton, T.M., J. Chunwongse, and S.D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and herbaceous plants. *Plomt Molecular Biology Reporter.* 13 (3) : 207-209.
- Huang, H.,D.R. Lane, and T.L. Kubisiak. 2003. Molecular Characterization of Cultivated Pawpaw (*Asimina triloba*) using RAPD Markers. *J. Amer. Soc.Hort.Sci.* 128(1) 85-93.
- Kumar, P.P., J.C.K. Yau, and C.J Goh. (1998). Genetic Analyses of *Heliconia* Species and Cultivars with Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123 (1) : 91-97.
- Lanham, P.G. and R.M. Brennan. 1999. Genetic characterization of gooseberry (*Ribes grossularia* subgenus *Grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers. *J. Hort. Sci.Biotechnol.* 74: 361-366.
- Li. M., and D.J. Midmore. 1999. Estimating the Genetic Relationships of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis* (Burm.f.) Hensch) Cultivated in Australia, using Random Amplified Polymorphic DNAs(RAPD). *J. of Hort. Sci. & Biotechnology*, 74(2) 224-231.
- Liu, C. and M. Mei. 2003. Classification of lychee cultivars with RAPD analysis. *Proceeding of the second International Symposium on Lychee, Longan, Rambutan and other Spindaceae Plants. Acta Horticulturae* 665, Jan. 2005. P 149-159.
- Monte-Corvo, L., L.Goulao, and C.Oliveira. 2001. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126 (5): 517-522.
- Moreno, S., J.P. Martin, and J.M. Ortiz. 1998. Inter-simple repeat PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica* 101: 117-125.

- Nei, M, and W.H. Li. 1979. Methemathical model of studying genetic variation in term of restriction endonuclease. Proceeding of The National Academy of Sciense of the United States of America.. 76: 5269-5273.
- Williams, J.G.K., A.R.Kubelik, K.J. Livak, A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbritary primers are useful for genetic markers. Nucleic acids Res. 18: 6531-6535.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.



ภาคผนวก

ตารางที่ 1 รายชื่อขนุนพันธุ์การค้าที่ใช้ในการทดลอง

หมายเลข	อักษรย่อ	ชื่อพันธุ์	แหล่งเก็บตัวอย่าง
1	MA1	มาเลย์	บ้านดร. สุภาพ ศวส. จบ.
2	MA2J4	มาเลย์	สวนคุณเทียนชัย อ.ขลุง
3	MA3J4	มาเลย์	
4	MA3J4	มาเลย์	
5	MA5J5	มาเลย์	แปลงรวมพันธุ์ ศวส. จบ.
6	MA6J5	มาเลย์	บ้านจันทรสติย์ ศวส. จบ.
7	MA7J5	มาเลย์	บ้านวันเพ็ญ ศวส. จบ.
8	CWJ2	ไซควัฒนา	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
9	TPS1J5	ทองประเสริฐ	แปลงรวมพันธุ์ ศวส. จบ.
10	TPS2J5	ทองประเสริฐ	
11	TPS3J5	ทองประเสริฐ	
12	TPS4J6	ทองประเสริฐ	
13	TPS5J6	ทองประเสริฐ	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
14	TPS6J6	ทองประเสริฐ	
15	TPRJ2	ทองไพโรจน์	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
16	JD1	จำปาตะ	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
17	JDJ1	จำปาตะ	บ้านตาสาร ต.พลั่ว
18	JK1J1	จำปากรอบ	บ้านคุณจักรินทร์ ศวส. จบ.
19	JK2J5	จำปากรอบ	แปลงรวมพันธุ์ ศวส. จบ.
20	JK3J5	จำปากรอบ	
21	JK4J5	จำปากรอบ	
22	JK5J6	จำปากรอบ	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
23	JSR1J6	จำปาศรีราชา	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
24	JK1	จำปาเกล็ดแก้ว	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
25	TS1	ทองส้ม	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
26	TS2	ทองส้ม	
27	PJ1	ป้าจ้อ	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
28	TPG1	ตะเภาแก้ว	บ้านจำ จ.ปราจีนบุรี
29	TSJ1J5	ทองสุตใจ	แปลงรวมพันธุ์ ศวส. จบ.
30	TSJ2J5	ทองสุตใจ	
31	TSJ3J5	ทองสุตใจ	
32	TTCW1	ทองทวีโชค	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว

33	TSR1	ทองสัมฤทธิ์	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
34	TPJ1	ทองพิจิตร	สวนคุณเทียนชัย อ.ขลุง
35	PSIT1	เพชรสีทอง	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
36	TH1	ทองหอม	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
37	TH2	ทองหอม	
38	TH3	ทองหอม	
39	LP1J6	เหลืองพิชัย	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
40	LP2J6	เหลืองพิชัย	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
41	LP3J2	เหลืองพิชัย	บ้านเจ็ญี หนองเสม็ด
42	BPG1J1	บัวยฉิมพลี	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
43	LRA1J6	เหลืองราชา	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
44	LRA2J6	เหลืองราชา	
45	LRA3J7	เหลืองราชา	
46	LRA4J4	เหลืองราชา	สวนคุณเทียนชัย อ.ขลุง
47	LLA1J6	เหลืองระยอง	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
48	LLA2J6	เหลืองระยอง	
49	LLA3J6	เหลืองระยอง	
50	LPI1J2	เหลืองไพลิน	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
51	PRCH1J1	เพชรราชา	บ้านเจ็ญี หนองเสม็ด
52	PRCHCN1J4	เพชรราชา(ชล)	สวนคุณเทียนชัย อ.ขลุง
53	PRCHCN2J4	เพชรราชา(ชล)	
54	PRCH1J6	เพชรราชา	
55	PRCH2J6	เพชรราชา	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
56	PRCH3J7	เพชรราชา	
57	SEB1J1	ศรีบรรจง	บ้านจำ จ. ปราจีนบุรี
58	SEB2J6	ศรีบรรจง	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
59	SEB3J6	ศรีบรรจง	
60	SEB4J7	ศรีบรรจง	
61	SEP1J1	ศรีปราจีน	บ้านจำ จ. ปราจีนบุรี
62	SEP2J4	ศรีปราจีน	สวนคุณเทียนชัย อ.ขลุง
63	LTJ4	เหลืองทอง	สวนคุณเทียนชัย อ.ขลุง
64	PM1J3	ปิยะมาดา	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
65	PM2J6	ปิยะมาดา	
66	PM3J6	ปิยะมาดา	
67	KYJ1	คุณหญิง	บ้านจำ จ. ปราจีนบุรี
68	KYJ4	คุณหญิง	สวนคุณเทียนชัย อ.ขลุง

69	LKJ7	เหลืองเขาน้อย	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
70	GN	กิมไน้	บ้านจำ จ. ปราจีนบุรี
71	MAN1J1	แม่เนื้อทอง	บ้านจำ จ. ปราจีนบุรี
72	MAN2J4	แม่เนื้อทอง	สวนคุณเทียนชัย อ.ขลุง
73	CHT	ชมพูตะวันตก	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
74	LRA	เหลืองเรวดี	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
75	RT	รุ่งทวี	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
76	PP	พระพิราพ	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
77	MMCH1J2	Unknown	} สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
78	MMCH2J7	Unknown	
79	LJDJ7	เหลืองจินแดง	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
80	LPJJ3	เหลืองประจิม	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
81	PST1J6	ไพศาลทักษิณ	} สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
82	PST2J6	ไพศาลทักษิณ	
83	GKJ7	ก้านเขียว	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
84	TWRK1J4	ทวายลุงเค	} สวนคุณเทียนชัย อ.ขลุง
85	TWRK1J4	ทวายลุงเค	
86	TWRK3J6	ทวายลุงเค	} สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
87	TWRK4J7	ทวายลุงเค	
88	LTOJ3	เหรียญทอง	} สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว
89	LTOJ6	เหรียญทอง	
90	RTOJ3	รวงทอง	สวนคุณวิจิต ต.พลั่ว

ตารางที่ 2 ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดินเหนียวของขนุน 43 พันธุ์ (90 หมายเลข) ที่ส่งเคราะห์จากโพมเมอร์ ISSR10

ชื่อพันธุ์	ขนาด DNA (bp)																	
	1166	1466	1361	1295	1135	996	909	822	739	693	647	606	574	504	443	410	365	
Ma1	—	—			—	—				—	—	—			—			
Ma2J4	—	—			—	—				—	—	—			—			
Ma3J4	—	—			—	—				—	—	—			—			
Ma4J4	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
Ma5J5	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
Ma6J5	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
Ma7J5	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
CWJ2	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
TPS1J5	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
TPS2J5	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
TPS3J5	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
TPS4J6	—	—			—	—				—	—	—	—		—	—		
TPS5J6	—	—			—	—				—	—	—	—		—	—		
TPS6J6	—	—			—	—				—	—	—	—		—	—	—	
TPRJ2	—	—			—	—				—	—	—	—		—	—		
JDJ1	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
JK1J1	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
JK2J5	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
JK3J5	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
JK4J5	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
JK5J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
JK1J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
JD1	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
JK1	—	—			—	—	—	—		—	—	—			—	—		
TS1	—	—			—	—	—	—		—	—	—			—	—		
TS2	—	—			—	—	—	—		—	—	—			—	—		
PJ1	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
TPG1	—	—	—	—	—	—				—	—	—			—	—		
TSJ1J5	—	—	—	—	—	—			—	—	—	—			—	—		
TSJ2J5	—	—	—	—	—	—			—	—	—	—			—	—		
TSJ3J5	—	—	—	—	—	—			—	—	—	—	—		—	—		
TTCW1	—	—	—	—	—	—				—	—	—	—		—	—		
TSR1	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
TPJ1	—	—			—	—				—	—	—	—		—	—		
PSIT1	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
TH1J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
TH2J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
TH3J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
LP1J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
LP2J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
LP3J2	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
BGP1J1	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
LRa1J1	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
LRa2J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
LRa3J7	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
LRa4J4	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
LLa1J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
LLa2J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
LLa3J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
LPI1J2	—	—	—	—	—	—				—	—	—			—	—		
PRCH1J1	—	—	—	—	—	—				—	—	—	—		—	—		
PRCHen1J4	—	—	—	—	—	—				—	—	—			—	—		
PRCHen2J4	—	—	—	—	—	—				—	—	—	—		—	—		
PRCH1J6	—	—	—	—	—	—				—	—	—			—	—		
PRCH2J6	—	—	—	—	—	—				—	—	—			—	—		
PRCH3J7	—	—	—	—	—	—				—	—	—			—	—		
SeB1J1	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
SeB2J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
SeB3J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
SeB4J7	—	—	—	—	—	—				—	—	—			—	—		
SeP1J1	—	—	—	—	—	—				—	—	—			—	—		
SeP2J4	—	—			—	—				—	—	—			—	—		
LTJ4	—	—	—	—	—	—				—	—	—			—	—		
PM1J3	—	—			—	—				—	—	—			—	—	—	
PM2J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—	—	
PM3J6	—	—			—	—				—	—	—			—	—	—	
KyJ1	—	—			—	—				—	—	—			—	—	—	
KyJ4	—	—			—	—				—	—	—			—	—	—	
LKJ7	—	—			—	—				—	—	—			—	—	—	
GM	—	—			—	—				—	—	—			—	—	—	
MaN1J1	—	—			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
CHT	—	—			—	—				—	—	—	—	—	—	—	—	
Lra	—	—			—	—	—	—		—	—	—			—	—	—	

RT	---	---	---	---	---	---
PP	---	---	---	---	---	---
MMCH1J1	---	---	---	---	---	---
MMCH2J7	---	---	---	---	---	---
LJDJ7	---	---	---	---	---	---
LPJJ3	---	---	---	---	---	---
PST1J6	---	---	---	---	---	---
PST2J6	---	---	---	---	---	---
GKJ7	---	---	---	---	---	---
TWRK1J4	---	---	---	---	---	---
TWRK2J4	---	---	---	---	---	---
TWRK3J6	---	---	---	---	---	---
TWRK4J7	---	---	---	---	---	---
LTOJ3	---	---	---	---	---	---
LTOJ6	---	---	---	---	---	---
RTOJ3	---	---	---	---	---	---



ตารางที่ 2 (ต่อ) ภาพจำลองแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของขนุน 43 พันธุ์ (90 หมายเลข) ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ ISSR64

[illegible]

Lra	---		---	---	---	---
RT	---		---	---	---	---
PP	---		---	---	---	---
MMCH1J1	---	---	---	---	---	---
MMCH2J7	---	---	---	---	---	---
LJDJ7	---	---	---	---	---	---
LPJJ3	---	---	---	---	---	---
PST1J6	---	---	---	---	---	---
PST2J6	---	---	---	---	---	---
GKJ7	---	---	---	---	---	---
TWRK1J4	---	---	---	---	---	---
TWRK2J4	---	---	---	---	---	---
TWRK3J6	---	---	---	---	---	---
TWRK4J7	---	---	---	---	---	---
LTOJ3	---	---	---	---	---	---
LTOJ6	---	---	---	---	---	---
RTOJ3	---	---	---	---	---	---

