



วิทยานิพนธ์

การศึกษาอนุกรมวิธานของพืชสกุลมังคุดบางชนิด
โดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

TAXONOMIC STUDY OF SOME SPECIES IN THE GENUS *GARCINIA*
BY DNA FINGERPRINTING

นางสาวมลิวรรณ นาคขุนทด

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. ๒๕๔๑

P53

28 ส.ค. 2543



โครงการ BRT ชั้น 15 อาคารมหานครฮิปปี้

539/2 ถนนศรีอยุธยา เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

..... วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์)

ปริญญา

..... พฤกษศาสตร์

สาขา

..... พฤกษศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง

การศึกษานุกรมวิธานของพืชสกุลมังคุดบางชนิดโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Taxonomic Study of Some Species in The Genus *Garcinia*

by DNA Fingerprinting

นามผู้วิจัย

นางสาวมลิวรรณ นาคขุนทด

ได้พิจารณาเห็นชอบให้เป็นวิทยานิพนธ์ระดับ..... ดี

โดย ประธานกรรมการ.....

(..... รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะไพเคนากุล, Dr.Agr.)

กรรมการ.....

(..... อาจารย์สมน มาสธณ, วท.ม.)

กรรมการ.....

(..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, Dr.Agr.Sci.)

หัวหน้าภาควิชา.....

(..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์กมลพรรณ นามวงศ์พรหม, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(..... ศาสตราจารย์ธรรมศักดิ์ สมมาตย์, Ph.D.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... 20 เดือน..... ตุลาคม..... พ.ศ..... 2541

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาอนุกรมวิธานของพืชสกุลมังคุด

บางชนิดโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Taxonomic Study of Some Species in

The Genus *Garcinia* by DNA Fingerprinting

โดย

นางสาวมลิวรรณ นาคขุนทด

พ.ศ. ๒๕๕๑

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษานุกรมวิธานของพืชสกุลมังคุดบางชนิดโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Taxonomic Study of Some Species in The Genus *Garcinia* by DNA Fingerprinting

โดย

นางสาวมลิวรรณ นาคขุนทด

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์)

พ.ศ. 2541

มลิวรรณ นาคขุนทด 2541 : การศึกษาอนุกรมวิธานของพืชสกุลมังคุดบางชนิดโดยการตรวจ
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์) สาขาวิชาพฤกษศาสตร์
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล,
Dr. Agr. 101 หน้า

การศึกษานุกรมวิธานและวิวัฒนาการของพืชสกุลมังคุด (*Garcinia*) จำนวน 12 ชนิด โดย
รวมมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) จำนวน 11 ตัวอย่าง และพืชในสกุลใกล้เคียงอีก 2
ชนิดเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ รวมทั้งสิ้น 24 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดี (random
amplified polymorphic DNA) ร่วมกับเทคนิคอาร์เอ็มพีไอ (random amplified microsatellite
polymorphisms) ผลการศึกษาด้วยเทคนิคอาร์เอฟดีโดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน
12 ชนิด พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 107 แถบ พืชทั้ง 14 ชนิดนั้นแสดงความแตก
ต่างกันอย่างชัดเจน ในขณะที่มังคุด 10 ตัวอย่างเกิดแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด แต่มังคุด
อีก 1 ตัวอย่างนั้นเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเล็กน้อย เมื่อนำเทคนิคอาร์เอ็มพีไอเข้ามาช่วย
ในการวิเคราะห์ผล โดยการใช้ไมโครแซทเทลไลท์โพรบที่เป็นชุดซ้ำของ 2, 3 และ 4 นิวคลีโอไทด์
ขนาดความยาว 20-21 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 11 ชนิด พบว่ามี 9 ชนิดที่สามารถไฮบริดซ์กับผล
ผลิตจากเทคนิคอาร์เอฟดีข้างต้นได้ และจากการเลือกคู่ไพรเมอร์กับไมโครแซทเทลไลท์โพรบที่ให้ผล
ชัดเจนเพียง 10 คู่ ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 94 แถบ และพบความแตกต่างของแถบ
ดีเอ็นเอในมังคุดทั้ง 11 ตัวอย่าง เมื่อนำผลของอาร์เอฟดีและอาร์เอ็มพีไอมาวิเคราะห์ด้วย
โปรแกรมคอมพิวเตอร์ สามารถบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ในแนวทางเดียวกัน

ดลิวรรณ นาคขุนทด

ลายมือชื่อนิสิต

ประธานกรรมการ

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

101 / 101 / 101

Maliwan Nakkuntod 1998 : Taxonomic Study of Some Species in The Genus *Garcinia* by DNA Fingerprinting. Master of Science (Botany), Major Field Botany, Department of Botany. Thesis Advisor : Associate Professor Surin Peyachoknagul, Dr. Agr. 101 pages.

Taxonomic and evolutionary studies of 12 species in the genus *Garcinia* including 11 accessions of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) and two other of the genera in the same family were performed by using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and random amplified microsatellite polymorphism (RAMPO) techniques. Twelve decamer primers were used for RAPD analysis and 104 polymorphic bands were observed. The difference among 14 species were clearly revealed. Within 11 accessions of mangosteen, 10 of them were monomorphic. Then eleven probes of 20-21 mers microsatellite which were two, three and four nucleotide-repeated were used for RAMPO technique. Nine probes could hybridized with RAPD products and 10 pairs of primers and microsatellite probes were chosen for detection. 94 polymorphic bands were observed. Fourteen species was clearly different and 11 mangosteen accessions could be distinguished. The software computational analysis of the evolutionary relationship among samples as determined by RAPD and RAMPO was nearly the same.

Maliwan Nakkuntod

Student's Signature

Surin Peyachoknagul

Thesis Advisor's Signature

14 / 10 / 98

คำนิยม

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล อาจารย์สมน มาสุธน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ อภิสทิตวาณิช คณะกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์อย่างยิ่ง ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อดี สหวัชรินทร์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพ ในประเทศไทย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ ๆ ทุกคนในครอบครัว ที่ให้ชีวิตและสนับสนุนแก่ข้าพเจ้าอย่างดียิ่งตลอดมา และขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ ชาวพฤกษศาสตร์และพันธุศาสตร์ทุกท่านที่เป็นกำลังใจมาโดยตลอด

มลิวรรณ นาคขุนทด

ตุลาคม ๒๕๕๑

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	47
สรุป	78
เอกสารอ้างอิง	80
ภาคผนวก	90

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	รายชื่อตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา
2	ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาร์เอพีดี
3	ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณจีนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี
4	ชนิดของไมโครแซทเทลไลท์โพรบและอุณหภูมิที่ใช้ในการไฮบริไดเซชัน
5	แสดงค่า Similarity Index ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอของพืชทั้ง 24 ตัวอย่างจากเทคนิคอาร์เอพีดี
6	แสดงค่า Similarity Index ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอของพืชทั้ง 24 ตัวอย่างจากเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอ
7	แสดงค่า Similarity Index ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอของพืชทั้ง 24 ตัวอย่าง จากเทคนิคอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอ
ตารางผนวกที่	
1	แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากพืช 24 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ 12 ชนิด โดยกำหนดสัญลักษณ์เลข '1' กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดสัญลักษณ์เลข '0' กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่

หน้า

- 2 แสดงผลการไฮบริดเชชันผลผลิตอาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ OPAA 10 ด้วย
ไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (TGG)₇ (1) และผลการไฮบริดเชชันผลผลิต
อาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ OPAA 17 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (AAG)₇ (2)
ของพืช 24 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์เลข '1' กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ
และกำหนดสัญลักษณ์เลข '0' กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ 97
- 3 แสดงผลการไฮบริดเชชันผลผลิตอาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ OPAD 05 ด้วย
ไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (TGG)₇ (1) และผลการไฮบริดเชชันผลผลิต
อาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ OPAD 05 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (TAT)₇ (2)
ของพืช 24 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์เลข '1' กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ
และกำหนดสัญลักษณ์เลข '0' กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ 98
- 4 แสดงผลการไฮบริดเชชันผลผลิตอาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ OPAD 05 ด้วย
ไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (TCC)₇ (1) และผลการไฮบริดเชชันผลผลิต
อาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ OPAD 06 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (GCC)₇ (2)
ของพืช 24 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์เลข '1' กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ
และกำหนดสัญลักษณ์เลข '0' กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ 99
- 5 แสดงผลการไฮบริดเชชันผลผลิตอาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ OPAD 08 ด้วย
ไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (CA)₁₀ (1) และผลการไฮบริดเชชันผลผลิต
อาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ OPAD 08 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (CT)₁₀ (2)
ของพืช 24 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์เลข '1' กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ
และกำหนดสัญลักษณ์เลข '0' กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ 100

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่

หน้า

- 6 แสดงผลการไฮบริดเซชันผลผลิตอาร์เอฟดีจากไพรมอร์ OPAD 09 ด้วย
ไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (AAG)₇ (1) และผลการไฮบริดเซชันผลผลิต
อาร์เอฟดีจากไพรมอร์ OPAD 12 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (AAC)₇ (2)
ของพืช 24 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์เลข '1' กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ
และกำหนดสัญลักษณ์เลข '0' กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

101

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	จีนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ OPAA 10, OPAA 17 กับพืชสกุลมังคุดและสกุลใกล้เคียง เรียงลำดับดังตารางที่ 1 และ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส 48
2	จีนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ OPAD 01, OPAD 04 กับพืชสกุลมังคุดและสกุลใกล้เคียง เรียงลำดับดังตารางที่ 1 และ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส 49
3	จีนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ OPAD 05, OPAD 06 กับพืชสกุลมังคุดและสกุลใกล้เคียง เรียงลำดับดังตารางที่ 1 และ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส 50
4	จีนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ OPAD 08, OPAD 09 กับพืชสกุลมังคุดและสกุลใกล้เคียง เรียงลำดับดังตารางที่ 1 และ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส 51
5	จีนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ OPAD 10, OPAD 11 กับพืชสกุลมังคุดและสกุลใกล้เคียง เรียงลำดับดังตารางที่ 1 และ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส 52
6	จีนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ OPAD 12, OPAD 15 กับพืชสกุลมังคุดและสกุลใกล้เคียง เรียงลำดับดังตารางที่ 1 และ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส 53
7	การจำแนกตัวอย่างพืชในสกุลมังคุดและสกุลใกล้เคียงในลักษณะ Phylogenetic tree จากผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี ตัวเลขในแถบบนแสดงสัดส่วนของความคล้ายคลึงกันของแต่ละตัวอย่าง 57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
8	ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAA 10 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (TGG) ₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส	59
9	ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAA 17 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (AAG) ₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส	60
10	ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 05 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (TGG) ₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส	61
11	ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 05 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (TAT) ₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส	62
12	ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 05 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (TCC) ₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
13 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 06 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (GCC) ₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส	64
14 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 08 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (CA) ₁₀ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส	65
15 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 08 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (CT) ₁₀ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส	66
16 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 09 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (AAG) ₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส	67
17 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 12 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (AAC) ₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส	68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18	
การจำแนกตัวอย่างพืชในสกุลมังคุดและสกุลใกล้เคียงในลักษณะ Phylogenetic tree จากผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอ ตัวเลขในแถบบนแสดงสัดส่วนของความคล้ายคลึงกันของแต่ละตัวอย่าง	73
19	
การจำแนกตัวอย่างพืชในสกุลมังคุดและสกุลใกล้เคียงในลักษณะ Phylogenetic tree โดยใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ร่วมกับเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอ ตัวเลขในแถบบนแสดงสัดส่วนของความคล้าย คลึงกันของแต่ละตัวอย่าง	77

การศึกษาอนุกรมวิธานของพืชสกุลมังคุดบางชนิดโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Taxonomic Study of Some Species in The Genus *Garcinia* by DNA Fingerprinting

คำนำ

ในสมัยก่อนได้มีการจำแนกพืชโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชเป็นหลัก ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล และ เมล็ด ซึ่งต้องใช้เวลาศึกษาค่อนข้างนาน เพราะพืชบางชนิดต้องใช้เวลาหลายปีในการเจริญเติบโตจนกระทั่งออกดอก ติดผล นอกจากนี้การจัดหมวดหมู่ของพืชโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงประการเดียวนั้นอาจเกิดความผิดพลาดขึ้นได้ ถ้ากลุ่มพืชที่ศึกษามีความใกล้เคียงกันมาก ต่อมาจึงมีการนำความรู้ทางด้านกายวิภาควิทยา และนิเวศวิทยามาช่วยในการจำแนก เมื่อวิทยาศาสตร์เจริญก้าวหน้าขึ้นได้มีการนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์สาขาอื่น ๆ มาช่วยในการจำแนก เช่น การจำแนกโดยใช้องค์ประกอบทางเคมีในพืช (chemotaxonomy) การจำแนกโดยใช้เรณูวิทยา (palynotaxonomy) เป็นต้น ในสมัยชาร์ล ดาร์วิน ผู้ค้นพบทฤษฎีวิวัฒนาการ ได้มีการใช้ระบบการจำแนกพืชโดยพิจารณาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) มีการจัดเรียงว่าพืชกลุ่มใดเกิดก่อนและพืชกลุ่มใดเกิดทีหลัง และมีความสัมพันธ์กันอย่างไร นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ เกี่ยวกับโครโมโซมหรือดีเอ็นเอเข้ามาช่วยในการจำแนกพืช เช่นเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง และสามารถจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยความแตกต่างของดีเอ็นเอ แม้ว่าลักษณะภายนอกจะคล้ายคลึงกันมากก็ตาม เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมีส่วนช่วยในการจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ รวมทั้งใช้ในการตรวจสอบพันธุ์ และตรวจสอบพันธุ์พ่อแม่ที่ถูกต้อง คือ การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนใดก็ได้ ไม่ขึ้นกับอวัยวะที่ใช้ในการตรวจสอบ ระยะเวลาเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม วิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีหลายแบบ แต่จำแนกตามหลักการที่ใช้เป็น 2 วิธี คือ วิธีตรวจโดยอาศัยการทำไฮบริไดเซชัน (hybridization) เช่น restriction fragment length polymorphism (RFLP) กับวิธีที่ตรวจโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction : PCR) เช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD)

การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอฟดี (RAPD) เป็นวิธีตรวจสอบดีเอ็นเอโดยประยุกต์จากเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random primer) ที่ไม่จำเพาะกับยีนใด วิธีการนี้ทำได้สะดวกและรวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย การตรวจผลทำโดยแยกขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) และสามารถตรวจดูแถบดีเอ็นเอได้ทันทีจากการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจความแตกต่างของดีเอ็นเอที่ได้จากผลผลิตการทำอาร์เอฟดี โดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ (microsatellite DNA) เรียกวิธีการตรวจสอบนี้ว่า random amplified microsatellite polymorphisms (RAMPO) (Richardson และคณะ, 1995) ผลที่ได้นี้จะแตกต่างจากผลของอาร์เอฟดี และจะมีความแตกต่างกันเมื่อใช้โพรบ (probe) แต่ละชนิด ซึ่งการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเหล่านี้ทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่าการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ มีผู้นำมาใช้ทั้งในสัตว์ เช่น นกกระจอก (Wetton และคณะ, 1987) และในพืชหลายชนิด เช่น พืชวงศ์กุหลาบ (Rosaceae) ในสกุลแอปเปิล (*Malus*) สาลี่ (*Prunus*) และ ราสเบอร์รี่ (*Rubus*) (Nybom และคณะ, 1990) มะเขือเทศ (Klein-Lankhorst และคณะ, 1991) ข้าวสาลี (Devos และ Gale, 1992) สนในสกุล *Pinus* (Nelson และคณะ, 1993) พริก (Inai และคณะ, 1993) ข้าว (Yu และ Nguyen, 1994; Zhou และ Gustafson, 1995) มังคุด (สุมน และคณะ, 2539) เป็นต้น

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการใช้เทคนิคอาร์เอฟดีและเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอ เพื่อการจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลมังคุดจำนวน 22 ตัวอย่าง และพืชในวงศ์เดียวกันอีก 2 ชนิด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับพันธุ์พืชในสกุลมังกุดบางชนิด
2. เพื่อหาความแตกต่างของพันธุ์มังกุดกับพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกัน และทำการเปรียบเทียบกับพืชในวงศ์เดียวกันด้วย
3. เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลมังกุดและสกุลใกล้เคียง

การตรวจเอกสาร

สภาพทางนิเวศวิทยาและการกระจาย

พืชในวงศ์ Guttiferac (Clusiaceae) จัดเป็นพืชในเขตร้อน มีการกระจายอยู่ทั่วไประหว่างเส้นรุ้ง 10 องศาเหนือและใต้ พืชในสกุลมังคุด (*Garcinia*) มีจำนวนมากกว่า 400 ชนิดกระจายอยู่หลายส่วนทั่วโลก แต่ส่วนใหญ่อยู่ในเขตร้อน เช่น มาลายา แอฟริกา ฟิลิปปินส์ เกาะบอร์เนียว อินเดีย พม่า อินโด-จีน่า และจีน แต่พบในบริเวณเอเชียอาคเนย์เป็นส่วนใหญ่ ชอบขึ้นตามป่าดิบทั่วไป โดยเฉพาะใกล้ลำห้วยหรือหนองน้ำ (Benemerito, 1936)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พืชสกุลมังคุดมีจำนวนโครโมโซม $2n = 48$ ยกเว้นมังคุดที่ปลูกกันโดยทั่วไปมีจำนวนโครโมโซม $2n = 96$ (นพรัตน์, 2530)

ลำต้น เป็นไม้ต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูงได้ถึง 30 เมตร ที่เป็นไม้พุ่มพบน้อย มีน้ำยางเหลืองหรือยางขาวในส่วนต่าง ๆ ของลำต้น ใบ เป็นชนิดใบเดี่ยว ไม่ผลัดใบ เกิดเป็นคู่ตรงข้ามกัน เนื้อใบค่อนข้างหนาและเหนียว ขอบใบเรียบ เส้นใบเรียงขนานกัน ไม่มีหูใบ ดอก เป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อดอก เกิดที่ซอกใบหรือปลายยอด มีทั้งดอกเพศผู้และดอกเพศเมียหรือเป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบเลี้ยงมี 4-5 กลีบ ส่วนมากมี 4 กลีบ มีกลีบเลี้ยงชั้นนอกและชั้นในอย่างละ 2 กลีบ เกิดเป็นคู่ตรงข้ามกัน กลีบดอกมี 2-6 กลีบ แต่ส่วนมากมี 4 กลีบ มีทั้งที่มีสีขาว เหลือง หรือ สีแดง ดอกเพศผู้มีเกสรเพศผู้จำนวนมาก แยกเป็นอิสระ เชื่อมติดกันเป็นวง หรือเป็นมัดจำนวน 4-5 มัด โดยจะอยู่ล้อมรอบรังไข่ที่เป็นหมัน หรือไม่มีเกสรเพศเมียก็ได้ ก้านชูอับเรณูอาจมีหรือไม่มีก็ได้ ถ้ามี ก้านชูอับเรณูจะมีลักษณะที่หนาและสั้นมาก อับเรณูมี 2-4 ห้อง มีทั้งที่เชื่อมติดกันและแยกเป็นแฉก อับเรณูแตกเป็นร่องหรือเป็นรู ดอกเพศเมียหรือดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน 8 อันถึงจำนวนมาก แยกเป็นอิสระหรือเชื่อมติดกัน รังไข่เป็นแบบ superior ovary มี 2-12 ช่อง ยอดเกสรเพศเมียอาจมีก้านชูสั้น ๆ หรือไม่มี ลักษณะแยกเป็นแฉก แบนคล้ายจานหรือเรียบ ออวุลมีจำนวน 1 อันในแต่ละช่อง (Benemerito, 1936) ผล เป็นผลสดและอูม่น้ำ (berry) เปลือกผลหนาค่อนข้างหนา มีกลีบเลี้ยงติดคงทน เมล็ด มีเยื่อหุ้มเมล็ด (aril) (ณพพร, 2526)

การจัดจำแนกพืชสกุลมังคุด (*Garcinia*)

พืชสกุลมังคุดจัดอยู่ในวงศ์ Guttiferae (Clusiaceae) ซึ่งมี 5 สกุล ดังนี้

รูปวิธานจำแนกสกุล (Ridley, 1922)

1. ดอกมีเพศเดียว ผลมีเปลือกอ่อนนุ่ม มีเมล็ดมากกว่าหรือเท่ากับ 1 เมล็ด ... *Garcinia*
1. ดอกมี 2 เพศ ผลมีเปลือกชั้นนอกและชั้นกลางสดเป็นเนื้อ ส่วนเปลือกชั้นในแห้ง มี 1 เมล็ด
 2. กลีบเลี้ยงมี 2 แฉก *Mammea*
 2. กลีบเลี้ยงมี 4-5 แฉก
 3. รังไข่มี 2 ช่อง *Mesua*
 3. รังไข่มี 1 ช่อง
 4. ออวุล 1 อัน *Calophyllum*
 4. ออวุล 4 อัน *Kaya*

ลักษณะเด่นของวงศ์นี้คือ ลำต้นหรือกิ่งอ่อนเป็นเหลี่ยมตามยาว 4 เหลี่ยม มียางเหลืองหรือขาว

พืชสกุลมังคุดที่รู้จักกันดีได้แก่ มังคุด มะพุด มะดัน ส้มแขกหรือส้มมะวน ชะมวง และพะวา (ปราโมช, 2532) โดยที่ เต็ม (2523) ได้รวบรวมพืชสกุลมังคุดในประเทศไทยจำนวน 22 ชนิด ดังนี้

- | | |
|---|-----------------------|
| 1. <i>Garcinia acuminata</i> Planch. & Triana | รงทอง (นครศรีธรรมราช) |
| 2. <i>G. atroviridis</i> Griff. | ส้มแขก (ปัตตานี) |
| 3. <i>G. costata</i> Hemsl. | มังคุดป่า (สตูล) |
| 4. <i>G. cowa</i> Roxb. | ชะมวง (ภาคกลาง) |
| 5. <i>G. dulcis</i> Kurz | มะพุด (ปัตตานี) |
| 6. <i>G. fusca</i> Pierre | มะดันป่า (มหาสารคาม) |
| 7. <i>G. gracilis</i> Pierre | หมักแปม (หนองคาย) |
| 8. <i>G. hanburyi</i> Hook.f. | รง (จันทบุรี, ตรวด) |

9. <i>G. hombroniana</i> Pierre	วา (ยะลา)
10. <i>G. lanessanii</i> Pierre	ส้มกุ้งใหญ่ (ขอนแก่น)
11. <i>G. mackeaniana</i> Craib	มะคะ (แพร่)
12. <i>G. mangostana</i> Linn.	มังคุด (ทั่วไป)
13. <i>G. merguensis</i> Wight	นวล (ภาคเหนือ)
14. <i>G. nervosa</i> Miq.	มะพุดป่า (ปัตตานี)
15. <i>G. nigrolineata</i> Planch.	ชะมวง (ตราด)
16. <i>G. rostrata</i> Benth. & Hook.f.	ม่วงลาย (สุราษฎร์ธานี)
17. <i>G. schomburgkiana</i> Pierre	มะดัน (ภาคกลาง)
18. <i>G. speciosa</i> Wall.	พะวา (สุราษฎร์ธานี)
19. <i>G. succifolia</i> Kurz	มะปोंด้น (ภาคเหนือ)
20. <i>G. thorelii</i> Pierre	มะคะจี๋หนอน (เชียงราย)
21. <i>G. vilersiana</i> Pierre	พะวาใบใหญ่ (ชลบุรี, จันทบุรี)
22. <i>G. xanthochymus</i> Hook.f.	มะคะหลวง (เชียงใหม่)

พืชสกุลมังคุดที่ใช้ทำการวิจัยมี 10 ชนิด ดังนี้

รูปพรรณจำแนกชนิด (Brandis, 1978 ; Hooker, 1872 ; Kurz, 1974 ; Whitmore, 1973; Backer และ Bakhuizen van den Brink, Jr., 1963 ; Lecomte, 1912)

1. กลีบเลี้ยงและกลีบดอกเป็น 5 กลีบ

2. ผิวใบด้านล่างมีขนสั้นมากอ่อนนุ่ม *G. nervosa* Miq. มะพุดป่า

2. ผิวใบด้านล่างเกลี้ยง *G. dulcis* Kurz มะพุด

1. กลีบเลี้ยงและกลีบดอกเป็น 4 กลีบ

3. กลีบเลี้ยงขนาดไม่เท่ากัน เรียง 2 ชั้น ชั้นในขนาดเล็กกว่าชั้นนอก

4. ผลมี 1 เมล็ด เปลือกผลสีเขียว เมื่อแห้งมีสีดำ *G. merguensis* Wight นวล

4. ผลมี 6-8 เมล็ด เปลือกผลสีม่วงเข้ม *G. mangostana* Linn. มังคุด

3. กลีบเลี้ยงขนาดเท่ากัน

5. ดอกเพศผู้มีเกสรเพศผู้ 4-5 มัด

6. ดอกเกิดที่ปลายยอด ดอกเพศเมียเป็นดอกเดี่ยว ... *G. costata* Hemsl. มังคุดป่า

6. ดอกเกิดที่ซอกใบ ดอกเพศเมียเป็นช่อดอกมี 3-6 ดอกย่อย ...

..... *G. schomburgkiana* Pierre มะดัน

5. ดอกเพศผู้มีเกสรเพศผู้เป็นอิสระ

7. รังไข่มี 4 ช่อง

8. เส้นใบย่อยมี 6-8 คู่ ดอกเกิดที่ซอกใบ *G. hunburyi* Hook.f. รัง

8. เส้นใบย่อยมากกว่า 10 คู่ ดอกเกิดที่ปลายยอด *G. speciosa* Wall. พะวา

7. รังไข่มี 6-8 ช่อง

9. เกสรเพศผู้ในดอกเพศผู้มี 12-17 อัน *G. gracilis* Pierre หมักแปม

9. เกสรเพศผู้ในดอกเพศผู้มีมากกว่า 20 อัน *G. cowa* Roxb. ชะมวง

ลักษณะเด่นของพืชสกุลมังคุดคือ มียางเหนียวสีเหลืองหรือขาว ผลอูม่น้ำ กลีบเลี้ยงติด
คงทน ที่ปลายผลมียอดเกสรตัวเมียติดอยู่ เนื้อมีรสเปรี้ยว

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลมังคุดบางชนิดที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้

1. *Garcinia costata* Hemsl. มังคุดป่า (สตูล) มะพัง (ลำปาง)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Ridley, 1922 ; Whitmore, 1973)

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้นสูง 15-21 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 30-45 เซนติเมตร

ใบ : แผ่นใบขนาดใหญ่ รูปขอบขนานแกมรูปไข่ สีเขียวเข้ม

ดอกเพศผู้ : เป็นช่อดอกมี 3-5 ดอกย่อย เกิดที่ปลายยอด ก้านช่อดอกยาว 0.6-1.2
เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ ขนาดเท่ากัน รูปวงกลม กลีบดอก 4 กลีบ ขนาดใหญ่กว่ากลีบเลี้ยง รูปไข่
สีเหลืองอ่อน เกสรเพศผู้ 4 มัด อับเรณูจำนวนมาก เกสรเพศเมียเป็นหมัน มียอดเกสรเพศเมียขนาดใหญ่

ดอกเพศเมีย : เป็นดอกเดี่ยว เกิดที่ปลายยอด กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีอย่างละ 4 กลีบ
มีเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน 12 อัน เกสรเพศเมียมียอดเกสรเพศเมียขนาดใหญ่

ผล : ขนาดใหญ่ กลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 เซนติเมตร

ลักษณะนิเวศ : ขึ้นบนเขาระดับความสูง 600-900 เมตร

การใช้ประโยชน์ : ผลใช้รับประทาน

2. *Garcinia cowa* Roxb. ชะมวง (ภาคกลาง) กะมวง (ภาคใต้) มวงส้ม
(นครศรีธรรมราช) หมากโมก (อุดรธานี)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Brandis, 1978 ; Hooker, 1872 ; Kurz, 1974 ; Whitmore, 1973)

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้นสูงประมาณ 18 เมตร กิ่งก้านจำนวนมาก

ใบ : แผ่นใบบาง รูปรีถึงรูปหอก 7.6-12.7 เซนติเมตร กว้าง 2.5-5.0 เซนติเมตร ปลาย
ใบและฐานใบแหลม เส้นใบไม่ชัดเจน มี 6-10 คู่

ดอก : มีขนาดเล็ก สีเหลืองหรือสีเหลืองแดง มีทั้งดอกเพศเดียวและดอกสมบูรณ์เพศ

ดอกเพศผู้ : เป็นช่อดอกแบบช่อซี่ร่ม มี 3-8 ดอกย่อย ส่วนมากเกิดที่ปลายยอด กลีบ
เลี้ยงขนาดเล็ก โคน รูปไข่ สีเหลืองหรืออาจมีสีชมพูด้วย กลีบดอกยาวเป็นสองเท่าของกลีบเลี้ยง รูป
ขอบขนาน เกสรเพศผู้จำนวนมาก ก้านชูอับเรณูสั้นมาก อับเรณูมี 4 ห้อง ไม่มีเกสรเพศเมีย

ดอกสมบูรณ์เพศ : เป็นดอกเดี่ยวหรือช่อดอกมี 3-5 ดอกย่อย เกิดที่ซอกใบ ไม่มีก้านช่อดอก
กลีบเลี้ยง โคน รูปไข่ กลีบดอกยาวและใหญ่กว่ากลีบเลี้ยง มีเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน 5-10 อัน ขนาด
ไม่เท่ากัน เกสรเพศเมียมีรังไข่กลม 6-8 ช่อง ยอดเกสรเพศเมียเป็นแฉกคล้ายดาว 6-8 แฉก ออวุล
จำนวนมาก

ผล : มีเปลือกอ่อนนุ่ม มีเมล็ดจำนวนมาก สีเหลืองหรือสีม่วงเข้ม มี 6-8 ช่อง

3. *Garcinia dulcis* Kurz มะพูด (ปัตตานี)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Backer และ Bakhuizen van den Brink, Jr., 1963 ; Kurz, 1974 ; Ridley,
1922 ; Whitmore, 1973)

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้นขนาดปานกลางสูง 6-12 เมตร

ใบ : แผ่นใบรูปไข่แกมรูปขอบขนานถึงรูปขอบขนาน ยาว 12-26 เซนติเมตร กว้าง 4-11
เซนติเมตร ปลายใบแหลมสั้น ฐานใบกลม ก้านใบยาว 1-2 เซนติเมตร แผ่นใบด้านบนสีเขียวเข้ม
ด้านล่างสีเหลืองเขียว เส้นใบย่อย 10 คู่

ดอก : รูปร่างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6-7 มิลลิเมตร ดอกสีเขียวเหลือง มีทั้งที่
สมบูรณ์เพศและมีเพศเดียว เป็นช่อดอกเกิดที่ซอกใบ ก้านดอกย่อยยาว 6-9 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงส่วน
มาก 5 กลีบ บางครั้ง 4-6 กลีบ กลีบดอก 5 กลีบ มีขนาดใหญ่กว่ากลีบเลี้ยง

ดอกเพศผู้ : เป็นช่อดอกมี 6-10 ดอกย่อย เกสรเพศผู้ 5 มัด อาจมีเกสรเพศเมียที่เป็นหมันหรือไม่มี

ดอกสมบูรณ์เพศ : เป็นช่อดอกมี 3-5 ดอกย่อย เกสรเพศผู้ 3-5 อัน เกสรเพศเมียรูปไข่ ยอดเกสรเพศเมียมี 5 แฉก ไม่มีก้านเกสรเพศเมีย

ผล : มีเปลือกอ่อนนุ่ม มีเมล็ดจำนวนมาก สีเหลือง รูปร่างกลม เนื้อมีสีเขียวเหลือง รสชาติเปรี้ยวมาก

ลักษณะนิเวศ : ขึ้นในระดับความสูงต่ำกว่า 500 เมตร

การใช้ประโยชน์ : ผลใช้รับประทานทั้งดิบหรือปรุงรสและทำแยมได้

4. *Garcinia gracilis* Pierre หมักแปม (หนองคาย) บงนั้ง (สกลนคร)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Lecomte, 1912)

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้น

ใบ : แผ่นใบรูปขอบขนานถึงรูปหอก ยาว 5-7 เซนติเมตร กว้าง 2-4 เซนติเมตร ก้านใบยาว 0.5-0.8 เซนติเมตร เส้นใบ 7-9 คู่

ดอกเพศผู้ : เป็นช่อดอกมี 1-3 ดอกย่อย ก้านดอกย่อยยาว 5 มิลลิเมตร เกสรเพศผู้ 12-17 อัน ไม่มีเกสรเพศเมีย

ดอกสมบูรณ์เพศ : เป็นดอกเดี่ยว มีริ้วประดับรองรับอยู่ 3 อัน ก้านดอกย่อยยาว 2-3 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ ยาว 4.5 มิลลิเมตร กลีบดอก 4 กลีบ โค้ง รูปร่างกึ่งขอบขนาน เกสรเพศเมียไม่เป็นหมัน จำนวนแปดฝักได้

ผล : มี 7-8 ช่อง

5. *Garcinia hanburyi* Hook.f. รง (จันทบุรี, ตราด)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Lecomte, 1912)

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้น ขนาดปานกลาง สูง 7-15 เมตร

ใบ : แผ่นใบรูปหอกแกมรูปไข่ ยาว 12-21 เซนติเมตร กว้าง 3-10 เซนติเมตร ก้านใบยาว 0.7-1.8 เซนติเมตร เส้นใบมี 6-8 คู่

ดอกเพศผู้ : เป็นช่อดอกมี 1-5 ดอกย่อยเกิดที่ซอกใบ ก้านดอกย่อยยาว 10-12 มิลลิเมตร มีริ้วประดับ 1-2 อัน กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีอย่างละ 4 กลีบ มีเกสรเพศผู้จำนวน 36 อัน

ดอกเพศเมีย : เป็นดอกเดี่ยวหรือช่อดอกมี 1-3 ดอกย่อย เกิดที่ซอกใบ ก้านดอกสั้นมาก หรือเกือบไม่มี กลีบเลี้ยง 4 กลีบ ขนาดเท่ากัน ติดคงทน ค่อนข้างหนา โคนี้อยู่ รูปรางกลม ยาว 4-5 มิลลิเมตร กลีบดอก 4 กลีบ ขนาดเท่ากัน โคนี้อยู่ รูปรางแบบรูปขอบขนานแกมรูปไข่ ยาว 7.1 มิลลิเมตร กว้าง 5-6 มิลลิเมตร เกสรเพศเมียมี 4 ช่อง ไม่มีก้านเกสรเพศเมีย

ผล : กลมแข็ง เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0-1.5 เซนติเมตร

6. *Garcinia mangostana* Linn. มังคุด (ภาคกลาง)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Backer และ Bakhuizen van den Brink, Jr. 1963 ; Brandis, 1978 ; Hooker, 1872 ; Kurz, 1974 ; Ridley, 1922 ; Whitemore, 1973)

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้นขนาดกลาง สูง 6-9 เมตร มีกิ่งก้านอยู่ตรงข้ามกัน

ใบ : แผ่นใบรูปรีถึงรูปหอกแกมรูปขอบขนาน ยาว 15-25 เซนติเมตร กว้าง 6-11 เซนติเมตร ฐานใบเป็นรูปลิ้น กลมหรือรูปหัวใจ ก้านใบยาว 1.5-2.5 เซนติเมตร เส้นใบชัดเจน จำนวนมาก ขนานกัน

ดอกเพศผู้ : เป็นช่อดอกเกิดที่ซอกใบมี 3 หรือ 5 หรือ 9 ดอก ดอกมีสีแดง เขียว เหลือง หรือม่วง กลีบเลี้ยง 4 กลีบ เรียง 2 ชั้น ๆ ละ 2 กลีบ ขนาดไม่เท่ากัน โคนี้อยู่ รูปรางกลม ติดคงทน กลีบดอก 4 กลีบ รูปไข่ ด้านในสีเหลืองแดง ด้านนอกสีเขียวแดง เกสรเพศผู้จำนวนมาก ภายในอับเรณูไม่มีละอองเรณู เกสรเพศเมียไม่มีออวูล ยอดเกสรเพศเมียมี 5-8 แฉก ไม่มีก้านเกสรเพศเมีย

ดอกเพศเมีย : เป็นดอกเดี่ยวหรือออกเป็นคู่ มี 1-3 ดอก ก้านดอกย่อยยาวประมาณ 1 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ เรียง 2 ชั้น ชั้นนอกสีเหลืองเขียว ชั้นในมีขอบกลีบสีแดง ขนาดเล็กกว่ากลีบชั้นนอก รูปรางโค้งกลม กลีบดอก 4 กลีบ รูปไข่กลับ สีเหลืองเขียวมีขอบสีแดง เกสรเพศผู้เป็นหมันมีจำนวนมาก เกสรเพศเมียมีรังไข่ 4-8 ช่องแต่ละช่องมี 1 ออวูล ไม่มีก้านเกสรเพศเมีย ยอดเกสรเพศเมียมี 8 แฉก

ผล : มีเปลือกอ่อนนุ่ม มีเมล็ดจำนวนมาก รูปรางกลม สีม่วงเข้ม เมล็ดใหญ่และแบน มีเนื้อหวาน

7. *Garcinia merguensis* Wight นวล (ภาคเหนือ) กะนวล (ภาคใต้) ขนมหึงหรือ
จี๋ผึ่ง (จันทบุรี) ซาแป (มาเลเซีย, นราธิวาส) นวลขาวหรือนวลดง (สุราษฎร์ธานี) นวลแดง (ชุมพร)
นวลแป้ง (นครศรีธรรมราช) บุนยง (ลำปาง) ม่วงนก (ระนอง) ยางเขา (ตราด)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Hooker, 1872 ; Kurz, 1974 ; Ridley, 1922 ; Whitmore, 1973)

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้น สูง 9-12 เมตร

ใบ : แผ่นใบรูปไข่รีถึงรูปหอก ยาว 7-9 เซนติเมตร กว้าง 2-4 เซนติเมตร ปลายใบ
แหลมยาว ฐานใบเป็นรูปลิ้น เส้นใบไม่ชัดเจน ก้านใบยาวประมาณ 0.6 เซนติเมตร

ดอกเพศผู้ : ขนาดกว้างประมาณ 3.8 มิลลิเมตร เป็นช่อดอกที่คอกย่อยที่อยู่กลางช่อบาน
ก่อน มี 3-6 ดอก เกิดที่ซอกใบ ก้านดอกยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ เรียง 2 ชั้น ๆ ละ 2
กลีบ กลีบนอกขนาดเล็ก คล้ายบัวประดับรูปร่างกลม กลีบในขนาดประมาณ 2.54 มิลลิเมตร เป็นแผ่น
โค้งบาง รูปร่างกลม กลีบดอก 4 กลีบ ลักษณะคล้ายกลีบเลี้ยงกลีบใน เกสรเพศผู้ 4 มัด อับเรณูจำนวนมาก
อับเรณูมีก้านสั้นมากหรือไม่มี ก้านเกสรเพศเมียที่ภายในรังไข่ไม่มีออวุลรูปร่างเป็นทรงกระบอก
ยาว ยอดเกสรเพศเมียรูปร่างกลมแบนคล้ายจาน

ดอกสมบูรณ์เพศ : กลีบดอกรูปร่างกลมถึงรูปไต เกสรเพศเมียไม่มีก้าน ยอดเกสรเพศ
เมียโค้งงอและมีขนาดใหญ่

ดอกเพศเมีย : เป็นดอกเดี่ยวหรือออกเป็นกลุ่มที่ซอกใบ ก้านดอกย่อยยาว 12.7-25.4
มิลลิเมตร ไม่พบเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน ยอดเกสรเพศเมียรูปร่างครึ่งวงกลมและขนาดใหญ่

ผล : มีเปลือกอ่อนนุ่ม มีเมล็ดจำนวนมาก รูปร่างกลม กว้าง 19 มิลลิเมตร ปกคลุม
ด้วยยอดเกสรเพศเมียที่โค้งและเรียบ

ลักษณะนิเวศ : พบขึ้นทั่วไปแถบประเทศมาเลเซีย ระดับความสูงมากกว่า 1,300 เมตร

8. *Garcinia nervosa* Miq. มะพุดป่า (ปัตตานี) ชะมวงน้ำ (ยะลา) พุด (ตรัง,
นครศรีธรรมราช) มูลู (มาเลเซีย, ปัตตานี)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Ridley, 1922 ; Whitmore, 1973)

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้นขนาดกลาง สูงได้ถึง 21 เมตร กิ่งย่อยแตกตรงกันข้าม

ใบ : แผ่นใบรูปหอกแกมขอบขนานหรือรูปไข่แกมขอบขนาน ยาว 22-50 เซนติเมตร กว้าง 8-17 เซนติเมตร ฐานใบแคบหรือกลมหรือรูปหัวใจ ใบมีสีเขียวเข้ม ด้านล่างแผ่นใบมีขนอ่อนนุ่ม (pubescent) ก้านใบยาวประมาณ 3 เซนติเมตร เส้นใบมี 15-20 คู่

ดอกเพศผู้ : เป็นช่อดอกขนาดใหญ่ เกิดที่ซอกใบ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีอย่างละ 5 กลีบ เกสรเพศผู้มี 5 มัด มีเกสรเพศเมียที่เป็นหมัน

ดอกเพศเมีย : เป็นช่อดอกมี 8-10 ดอกย่อย เกิดที่ซอกใบ สีเหลืองเขียว ก้านดอกย่อย ยาว 2-3 เซนติเมตร มีขน กลีบเลี้ยง 5 กลีบ หนาด้ายหนึ่ง ขนาดไม่เท่ากัน มีขน กลีบดอก 5 กลีบ ขนาดใหญ่กว่ากลีบเลี้ยง รูปรางกลม มีเกสรเพศผู้เป็นหมัน 5 อัน เกสรเพศเมียมีรังไข่ 5 ช่อง ยอดเกสรเพศเมียมี 5 แฉก

ผล : รูปรางกลมหรือรูปเพอร์ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 เซนติเมตร เปลือกสีเหลือง

9. *Garcinia schomburgkiana* Pierre มะดัน (ภาคกลาง)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Lecomte, 1912)

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้น สูง 6-10 เมตร

ใบ : แผ่นใบรูปขอบขนาน แผ่นใบยาวประมาณ 9 เซนติเมตร กว้างประมาณ 2 เซนติเมตร ก้านใบยาว 5 มิลลิเมตร

ดอกเพศผู้และดอกสมบูรณ์เพศ : เป็นช่อดอกมี 3-6 ดอกย่อย เกิดที่ซอกใบ ก้านช่อดอก ยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ โค้ง รูปรางกลม ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร กว้างประมาณ 3.5 มิลลิเมตร กลีบดอก 4 กลีบ รูปไข่รี สีเหลือง ยาวประมาณ 6.6 มิลลิเมตร กว้างประมาณ 3 มิลลิเมตร เกสรเพศผู้ 5-6 มัด มีรังไข่ที่เป็นหมัน

ผล : สีเขียว รสเปรี้ยว รับประทานขณะยังดิบ

10. *Garcinia speciosa* Wall พะวาหรือกะวา (สุราษฎร์ธานี) กวักไหมหรือหมาก กวัก (หนองคาย) ขวาค (เชียงราย) ชะมวง (พิจิตร) มะระขึ้นก (เชียงใหม่) มะป่อง (ภาคเหนือ) วน้ำ (ตรัง) สารดป่า (ภาคกลาง, เชียงใหม่)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Brandis, 1978 ; Hooker, 1872 ; Kurz, 1974)

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้นความสูงประมาณ 15 เมตร เปลือกต้นบางสีเทาดำ

ใบ : แผ่นใบรูปขอบขนานถึงรูปหอก ยาว 12-30 เซนติเมตร กว้าง 4-8 เซนติเมตร
ก้านใบยาว 2-4 เซนติเมตร เส้นใบจำนวนมากและขนานกัน

ดอกเพศผู้ : เป็นช่อดอกมี 3-9 ดอกย่อย เกิดที่ปลายกิ่ง ก้านช่อดอกยาว ดอกสีเหลืองมี
กลิ่นหอม กลีบเลี้ยงขนาดคล้ายหนัง 4 กลีบ รูปรางกลม กลีบดอก 4 กลีบ ยาวเป็นสองเท่าของกลีบเลี้ยง
แต่บางกว่า รูปไข่ เกสรเพศผู้จำนวนมาก ก้านชูอับเรณูสั้นมาก เกสรเพศเมียเป็นหมัน ยอดเกสรเพศ
เมียโค้ง ขนาดใหญ่ สีเหลือง รูปรางกลม

ดอกสมบูรณ์เพศ : เป็นดอกเดี่ยว กลีบเลี้ยงขนาดใหญ่ เกสรเพศผู้จำนวนมาก เกสรเพศ
เมียมียอดเกสรตัวเมียขนาดใหญ่ เป็นแฉก

ผล : รูปรางกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร เมื่อผลสุกจะมีสีแดงสด รสเปรี้ยว

11. *Garcinia* sp. 1

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้น ขนาดปานกลาง

ใบ : แผ่นใบรูปหอกแกมรูปไข่ ยาว 10-20 เซนติเมตร กว้าง 3-9 เซนติเมตร ก้านใบ
ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เส้นใบมี 6 คู่

ดอกเพศผู้ : ไม่ทราบข้อมูล

ดอกเพศเมีย : ไม่ทราบข้อมูล

ผล : กลมแข็ง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ก้านผลสั้นมาก มียอดเกสร
ตัวเมียติดอยู่ที่ขั้วผลด้านหนึ่ง มีกลีบเลี้ยงติดคงทน

12. *Garcinia* sp. 2

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้น ขนาดปานกลาง สูงประมาณ 2 เมตร

ใบ : แผ่นใบรูปไข่แกมรูปหอก ยาว 11-26 เซนติเมตร กว้าง 4-10 เซนติเมตร ก้านใบ
ยาว 0.5-1.5 เซนติเมตร เส้นใบมี 5-9 คู่

ดอกเพศผู้ : ไม่ทราบข้อมูล

ดอกเพศเมีย : ไม่ทราบข้อมูล

ผล : ไม่ทราบข้อมูล

13. *Mammea siamensis* Kostern. สารภี (ภาคกลาง) ทรพี (จันทบุรี) สร้อยพี (ภาคใต้) สารภีแนน (เชียงใหม่)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Ridley, 1992 ; Hooker, 1872 ; Kurz, 1974)

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้น สูง 10-15 เมตร

ใบ : แผ่นใบรูปหอกแกมรูปขอบขนาน ยาว 14-20 เซนติเมตร กว้าง 4-6.5 เซนติเมตร ปลายใบมนหรือมีติ่งสั้น ๆ ก้านใบหนาสีเหลือง ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร เส้นใบจำนวนมาก

ดอก : เป็นช่อดอกเดี่ยวหรือเป็นกระจุกตามกิ่งมี 1-2 ดอกย่อย สีขาว มีกลิ่นหอม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.75 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 2 กลีบ กลีบดอก 4 กลีบ รูปหอกแกมขอบขนาน ยาวประมาณ 1 นิ้ว เกสรเพศผู้จำนวนมาก รังไข่แบบ superior ovary มี 2 ช่อง แต่ละช่องมี 2 ออวุลยอด เกสรเพศเมียแยกเป็นแฉก 3 แฉก

ผล : ผลสด อู่น้ำ (berry) รูปกระสวย เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร มีกลีบเลี้ยงติดคงทน

ลักษณะนิเวศ : เจริญเติบโตที่สูงจากระดับน้ำทะเล 20-400 เมตร

ประโยชน์ : ผลใช้รับประทาน มีรสหวาน เนื้อไม้ใช้ทำพื้นกระดาน

14. *Calophyllum inophyllum* Linn. กระทิงหรือกาะทิง (ภาคกลาง) ทิง (กระบี่) เนาวกาน (น่าน) สารภีทะเล (ประจวบคีรีขันธ์) สารภีแนน (ภาคเหนือ)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Whitemore, 1972 ; Hooker, 1872 ; Ridley, 1922)

ลักษณะวิสัย : เป็นไม้ต้น ขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่ สูงประมาณ 33 เมตร

ใบ : แผ่นใบรูปไข่กลับแกมขอบขนานหรือรูปรี ยาว 8-15 เซนติเมตร กว้าง 4.5-8 เซนติเมตร ปลายใบกลม ฐานใบแหลม ก้านใบยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เส้นใบจำนวนมาก เนื้อใบหนาและเหนียว

ดอกเพศผู้ : เป็นช่อดอกมี 4-6 ดอกย่อยเกิดที่ปลายกิ่ง สีขาว มีกลิ่นหอม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร ก้านดอกย่อยยาว 2-4 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ เรียง 2 ชั้น ๆ ละ 2

กลีบ กลีบดอก 4 กลีบยาวกว่ากลีบเลี้ยง มีเกสรเพศผู้ 4 มัด รังไข่แบบ superior ovary รูปร่างค่อนข้างกลม ยอดเกสรตัวเมียแยกเป็นแฉก

ผล : กลมสีเขียวเข้ม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร

ลักษณะนิเวศ : พบขึ้นตามป่าใกล้ชายทะเล สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 5-50 เมตร

ประโยชน์ : เนื้อไม้ใช้ทำเรือ เครื่องตกแต่งบ้าน เครื่องมือกลึงกรรม น้ำมันจากเมล็ด

ใช้จุดตะเกียงและผสมเครื่องสำอางค์

พืชในสกุลมังคุดที่รู้จักกันดีคือมังคุด ชาติชาย และคณะ (2532) รายงานไว้ว่ามังคุดที่ปลูกกันอยู่ในปัจจุบันมีอยู่เพียงพันธุ์เดียวคือพันธุ์พื้นเมือง เนื่องจากมังคุดเป็นไม้ผลชนิดเดียวที่ไม่มี การกลายพันธุ์ จึงยังคงสภาพพันธุ์เดิมไว้ได้จนถึงปัจจุบัน มีการแปรพันธุ์บ้างในด้านของสีผล ขนาด และรสชาติ ตามสภาพของท้องถิ่นที่ปลูก แต่จากการที่ได้มีผู้ศึกษาและสังเกตอย่างใกล้ชิดพบว่ามังคุด ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 พวกคือ มังคุดเมืองนนท์ และมังคุดปักยี่ไต้ (ทวีศักดิ์, 2532 ; สมศักดิ์, 2532) ซึ่งมังคุดสองพวกนี้จะมีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดหลายลักษณะคือ

1. มังคุดเมืองนนท์ มีลักษณะใบค่อนข้างเรียว ผลมีขนาดเล็กกว่ามังคุดปักยี่ไต้ ส่วนของช่อดอกจะเล็กและยาว เปลือกผลค่อนข้างบาง โคนของกลีบเลี้ยงที่ติดกับช่อดอกมีสีแดง ผลเมื่อสุกจะมีสีส้มดำให้คุณภาพของเนื้อดี

2. มังคุดปักยี่ไต้ ลักษณะใบจะอ้วนและป้อม ผลมีขนาดใหญ่กว่ามังคุดเมืองนนท์ ให้น้ำหนักผลดี ช่อดอกสั้น เปลือกผลหนา โคนของกลีบเลี้ยงที่ติดกับช่อดอกมีสีเขียวเข้ม ผลเมื่อสุกจะมีสีแดงอมชมพู ผลจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงได้ช้ากว่ามังคุดเมืองนนท์

อย่างไรก็ตามความแตกต่างของมังคุดทั้งสองกลุ่มดังที่กล่าวมาแล้วนั้น อาจเกิดมาจากหลายสาเหตุ โดยเฉพาะสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน เช่น ลักษณะดิน ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ปริมาณน้ำฝน อุณหภูมิ ความชื้น เป็นต้น (ทวีศักดิ์, 2532)

ประโยชน์ของพืชในสกุลมังคุด

พืชในสกุลมังคุดที่นิยมปลูกกันมากคือมังคุด (*G. mangostana* Linn.) ซึ่งนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ พม่า และไทย สำหรับในประเทศไทยมังคุดจัดเป็นผลไม้ที่มีรสชาติดีชวนรับประทาน จึงได้สมญานามว่าเป็น

ราชินีแห่งผลไม้ (Queen of fruits) นอกจากนี้ยังนิยมปลูกมะพุด (*G. dulcis* Kurz) มะคัน (*G. schomburgkiana* Pierre) ทางใต้ก็มีส้มแขก หรือส้มมะวน (*G. atroviridis* Griff.) เพื่อรับประทานผล ส่วนทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือปลูกชะมวง (*G. cowa* Roxb.) และ พะวา (*G. speciosa* Wall.) เป็นไม้ดอก นอกจากนี้ชาวบ้านทางภาคใต้ยังนิยมนำใบอ่อนมาปรุงรสเปรี้ยวในอาหารประเภทต้ม เช่น ต้มเครื่องในวัว ต้มส้มปลาแห้ง ยางเหลืองของมังคุด เรียกว่า แกมโบก (gamboge) ใช้ประโยชน์ในด้านเภสัชได้ เช่น เชื่อกันว่าใช้เปลือกผลตากแห้งต้มกับน้ำปูนใสหรือฝนกับน้ำ กินแก้ท้องเสียธรรมดาได้ รงทอง (*Garcinia acuminata* Planch. & Triana) และรง (*G. hanburyi* Hook.f.) ใช้ประโยชน์เป็นยาถ่าย และสีย้อมผ้า เนื้อไม้ของมะคะจีหนอน (*G. thorelii* Pierre) และพะวา ใช้ทำเครื่องเรือน ทำเสา เสาเข็ม พื้นกระดาน รอด และเครื่องมือในการกลสิกรรม (แผนกพฤกษศาสตร์และสัตวศาสตร์, ไม่ระบุปีที่พิมพ์)

การศึกษาเกี่ยวกับพืชสกุลมังคุดทางการเกษตร

กองเศรษฐกิจการค้า กรมการค้าภายใน (2530) รายงานว่าในประเทศฟิลิปปินส์ได้ทดลองนำพืชในสกุลเดียวกันที่ทนทานต่อความแห้งแล้ง มาทำเป็นต้นตอในการทาบกิ่งของมังคุด ที่ได้ผลคือ *Garcinia kydia* Roxb., *G. venulosa* Choisy., *G. morello* Dest. แต่ไม้ชนิดนี้ในประเทศไทยไม่พบ สำหรับในประเทศมาเลเซียใช้มะพุดเป็นต้นตอทาบกิ่งมังคุด ปรากฏว่าได้ผลดี ซึ่งไม้ในสกุลนี้มีมากมายหลายชนิดที่เป็นไม้ป่าทนต่อความแห้งแล้ง หากได้นำมาทดลองเป็นต้นตอจะทำให้ทนต่อความแห้งแล้งได้ เช่น ส้มแขกหรือส้มมะวน พะวา ชะมวง หมักแปม รง นวล พะวา มะคะจีหนอน พะวาใบใหญ่ และ มะคะหลวง

การศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ของเนื้อไม้ของพืชสกุลนี้ โดย มงคล (2531) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการขยายพันธุ์มังคุดเพื่อหาต้นตอที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ เพื่อเป็นการปรับปรุงการผลิตมังคุดให้ได้ปริมาณและคุณภาพผลดีขึ้น โดยใช้พืชสกุลมังคุด 4 ชนิดคือ พะวา มะพุด ส้มแขก และชะมวง เป็นต้นตอมังคุดในการขยายพันธุ์ พบว่าพะวาและมะพุดมีโอกาสดิตกับมังคุดได้เป็นผลสำเร็จดีกว่าอีก 2 ชนิด เนื่องจากมีลักษณะเนื้อไม้คล้ายคลึงกับมังคุด

มงคลและคณะ (2533) ทำการเสียบยอดหรือทาบกิ่งมังคุดบนพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกัน ได้แก่ พะวา มะพุด ส้มแขกและชะมวง รวมทั้งยังใช้มังคุดเป็นต้นตอด้วย พบว่าพะวาและมะพุดทาบกิ่งกับมังคุดได้ดี แต่เมื่อนำไปปลูกในสภาพแปลงปลูก ปรากฏว่าพืชมีการเจริญเติบโตช้าและปรับตัว

กับสภาพแวดล้อมได้ไม่ดี มีเพียงการทาบทมมังคุดบนต้นต่อมังคุดเท่านั้นที่เจริญเติบโตจนให้ผลผลิตได้ แต่พบว่าการเจริญเติบโตช้ามาก เมื่อเทียบกับต้นมังคุดที่ปลูกด้วยเมล็ด (สายพันธ์และมงคล, 2532) ต่อมาจึงมีแนวความคิดที่จะเร่งการเจริญเติบโตโดยวิธีเสริมรากโดยใช้พืชต่างชนิดกัน และแนะนำว่าพะวาและมะปูดต่างก็ทาบทมได้ดีกับมังคุดน่าจะนำมาใช้ประโยชน์ในการเสริมราก เนื่องจากพืชทั้งสองชนิดนี้มีการปรับตัวได้ดีในสภาพภูมิอากาศของภาคใต้

สายพันธ์และคณะ (2535) ศึกษาผลของการเสริมรากที่มีต่อการเจริญเติบโตของมังคุดโดยใช้มะปูด มังคุดและพะวา อายุ 2 ปีเป็นต้นกล้า ปรากฏว่าต้นกล้าพะวามีการเจริญเติบโตเร็วและมีความยาวรากมากที่สุด รองลงมาคือมังคุด จึงเลือกพะวาและมังคุดมาใช้ในการเสริมราก ปรากฏว่ามังคุดที่เสริมรากด้วยพะวามีการเจริญเติบโตและพัฒนาดีที่สุด มีระบบรากที่แผ่กระจายได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างเห็นได้ชัดกับมังคุดไม่เสริมรากและมังคุดเสริมรากด้วยมังคุด

การทาบทมได้มีการศึกษาทดลองที่ Kallar and Burliar Fruit Station โดยผลการทดลองพบว่า การทาบทมมังคุดโดยใช้ *Garcinia tinctoria* Pierre เป็นต้นตอได้ผล 60% ถ้าใช้ *Garcinia speciosa* Wall เป็นต้นตอได้ผล 20% และพบว่าต้นตอ *Garcinia tinctoria* Pierre ที่ใช้ควรมีอายุมากกว่า 4 ปี (Naik, 1947)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting)

เป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นใช้ครั้งแรกโดย Alec Jeffreys และคณะ ในปี ค.ศ. 1985 เพื่อใช้บ่งบอกลักษณะจำเพาะของแต่ละบุคคลด้วยดีเอ็นเอ และพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้จะเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละบุคคล ไม่มีโอกาสที่บุคคลคู่ใดหรือสิ่งมีชีวิตคู่ใดจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) หรือพืชที่เกิดจากการสืบพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ ในปัจจุบันนี้ได้มีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืชและสัตว์หลายชนิด โดยในบางประเทศยังยอมรับผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นหลักฐานในศาลหรือใช้บ่งบอกความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่กับลูกได้ด้วย เนื่องจากดีเอ็นเอที่ปรากฏในลายพิมพ์นั้นมีการถ่ายทอดตามกฎของเมนเดล (สุรินทร์, 2539)

การตรวจสอบในระดับของดีเอ็นเอมีข้อได้เปรียบกว่าการตรวจสอบในระดับอื่น ๆ คือสามารถวิเคราะห์จากส่วนใดของพืชก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม และสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน โดยการตรวจสอบดีเอ็นเอนี้

อาศัยหลักการที่ว่าโมเลกุลดีเอ็นเอสามารถจำลองตัวเองได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงสภาพที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งเนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เองทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแต่ละตัวภายในสายดีเอ็นเอ หรือ เปลี่ยนแปลงชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่ หรือ เปลี่ยนแปลงในระดับของโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีบางส่วนของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมา (insertion) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนของดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือจากต่างโครโมโซม (transposition) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สุรินทร์, 2539)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปัจจุบันมีหลายวิธี แต่จำแนกตามหลักการที่ใช้มี 2 วิธี (บุรุษย์, 2536) คือ

1. วิธีตรวจโดยอาศัยการทำไฮบริไดเซชัน (hybridization-based DNA fingerprinting) โดยทำการวิเคราะห์ขนาดความยาวของดีเอ็นเอ ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ วิธีนี้อาศัยหลักว่าแต่ละอัลลีลเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วจะให้ขนาดของดีเอ็นเอที่ต่างกัน (restriction fragment length polymorphism : RFLP) เทคนิคที่ใช้คือสกัดดีเอ็นเอนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมแล้วแยกโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และนำมาทำ Southern blot hybridization กับโพรบที่เหมาะสม ซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารฟลูออเรสเซนต์ ตรวจสอบผลที่เกิดขึ้นจะปรากฏแถบดีเอ็นเอหลายแถบมีลักษณะจำเพาะกับแต่ละพันธุ์ โดยโพรบที่ใช้อาจมาจาก

1. มินิแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอของคนที่สามารถใช้ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ทั้งในพืชและสัตว์
2. มินิแซทเทลไลต์ดีเอ็นเออื่นๆ เช่น มินิแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอจากจีโนมของไวรัส M13 และมินิแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอจากพืชเอง
3. ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ เป็นดีเอ็นเอชุดซ้ำขนาดสั้นมากประมาณ 1-6 คู่เบส พบได้ทั้งในจีโนมของคน สัตว์ พืช รา และแบคทีเรีย หรือสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี แล้วนำมาใช้เป็นโพรบ โดยทำการทดลองเลือกชนิดของโพรบที่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่น (GATA)₅, (TCC)₇, (CA)₁₀, (GTG)₅ เป็นต้น

2. วิธีตรวจโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) (PCR-based DNA fingerprinting) โดยทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการเพิ่มขยายในหลอดทดลอง (PCR) วิธีนี้อาศัยการใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่จำเพาะกับช่วงของดีเอ็นเอหรือยีนหนึ่ง ๆ โดยต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อนเพื่อตรวจสอบยืนยันว่ามียีนดังกล่าว เช่น ในการถ่ายยีนหรือตรวจสอบพอลิเมอร์พืชมระหว่างพันธุ์พืชและสัตว์ โดยจะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งที่จำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว และการตรวจสอบดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งโดยวิธีพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ชนิดสุ่มรหัสเพียงชนิดเดียวมาใช้เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ จากตอนแรกมีจำนวนน้อย ๆ ให้มีการเพิ่มจำนวนขึ้นเฉพาะบางแห่งเท่านั้น จนเมื่อดีเอ็นเอมีมากขึ้นก็สามารถนำมาวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและย้อมเห็นแถบดีเอ็นเอบางแถบได้ วิธีนี้จึงเรียกว่า random amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งสามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ขึ้นทั้งต่างชนิดและการแยกภายในชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ยังทำได้ง่าย รวดเร็วและสามารถใช้ได้ดีกับตัวอย่างมาก ๆ

Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP

การวิเคราะห์อาร์เอฟแอลพี สามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ หาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ ขณะที่พืชเกิดการจำลองตัวเองและการผสมพันธุ์ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจุดตัดบนสายดีเอ็นเอ หรือเกิดความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด เรียกลักษณะเช่นนี้ว่าเกิดความหลากหลาย (polymorphism) ดังนั้นอาร์เอฟแอลพี หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

วิธีตรวจสอบอาร์เอฟแอลพี ทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์ (genomic DNA) แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) นำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกขนาดโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วนำไปตรวจสอบต่อโดยเทคนิค southern blot hybridization โดยทำการถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลลงไบบนแผ่นเมมเบรน (membrane filter) แล้วนำแผ่นเมมเบรนไปไฮบริไดซ์กับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลดรังสี เพื่อหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีเบสที่เป็นคู่สมกับโพรบที่ใช้ ผลของการตรวจสอบจะแสดงให้เห็นถึงชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กัน (สุรินทร์, 2539)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ เป็นปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นสั้น ๆ ที่จำเพาะ โดยต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ หรือทราบเฉพาะบริเวณปลายก็ได้ จากนั้นจึงสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้น ๆ 2 ชนิด มีความยาวประมาณ 20-35 เบส ซึ่งแต่ละชนิดมีเบสที่เป็นคู่สมกับส่วนปลาย 3' ของเส้นดีเอ็นเอหนึ่ง เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ นำไพรเมอร์ไปรวมกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ทั้งหมดในปริมาณที่มากเกินไป แล้วเริ่มปฏิกิริยาซึ่งแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ จากเกลียวคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยการเพิ่มอุณหภูมิจนถึงประมาณ 91-95 องศาเซลเซียส เรียกขั้นตอนนี้ว่า denaturation จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งมีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าจับกับปลาย 3' ของชิ้นดีเอ็นเอหนึ่ง เรียกขั้นตอนนี้ว่า annealing ต่อมาอาศัยการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์โพลีเมอเรส ที่อุณหภูมิ 58-72 องศาเซลเซียส เพื่อสร้างสายดีเอ็นเอขนาดยาวขึ้นจากไพรเมอร์ที่มีอยู่เดิม เรียกขั้นตอนนี้ว่า extension เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อทำเช่นนี้ 30-40 รอบ ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการก็จะเพิ่มขึ้นเป็นล้าน ๆ เท่าจนถึง 2^n เท่าเมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ จากนั้นนำผลที่ได้ไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ก็สามารถตรวจสอบขนาดของผลผลิตที่ได้ว่ามีความยาวเท่าใด จะมีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายหรือไม่

วิจารณ์ (2533) กล่าวว่าข้อดีหรือจุดเด่นของพีซีอาร์อยู่ที่ความง่าย ความแม่นยำ ความรวดเร็ว ความไว และสามารถที่จะดัดแปลงใช้ในรูปแบบต่าง ๆ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาพไม่ดีนัก คือตัวอย่างที่อยู่ในสภาพเน่าเปื่อยก็ยังใช้ได้ เช่นตัวอย่างดีเอ็นเอจากโครงกระดูกโบราณหรือซากศพโบราณได้ รวมทั้งช่วยในการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในปัจจุบันทำได้สะดวกและรวดเร็ว การศึกษาด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตจึงง่ายขึ้นมาก และมีการนำวิธีการพีซีอาร์ไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาดีเอ็นเอในคนเชื้อชาติต่าง ๆ และจากโครงกระดูกมนุษย์โบราณ สรุปว่ามนุษย์ทั้งหมดในปัจจุบันสืบเชื้อสายมาจากบรรพบุรุษของมนุษย์กลุ่มหนึ่งซึ่งอาศัยอยู่ในทวีปแอฟริกาเมื่อประมาณ 2 แสนปีมาแล้ว

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

ในปี 1990 William และคณะ ได้เสนอเทคนิคใหม่ในการวิเคราะห์ความหลากหลายของดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นเอง เรียกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี หรือเรียกสั้น ๆ ว่า Rapid อาร์เอพีดีเป็นการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย และไพรเมอร์ที่ใช้ไม่เจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) อาจเรียกวิธีดังกล่าวนี้ว่า arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) (Welsh and McClelland, 1990; Kersulyte และคณะ, 1992) DNA amplification fingerprinting (DAF) (Caetano-Anolles และคณะ 1991; Castiglione และคณะ, 1993; Connolly และคณะ, 1994) หรือ multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP) (Caetano-Anolles และคณะ, 1992) อาร์เอพีดีสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิต เทคนิคอาร์เอพีดีใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มเพียงชนิดเดียว โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดสั้นประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นในจีโนมจึงมีหลายบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าเกาะกับดีเอ็นเอได้ เพื่อให้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสใช้เริ่มต้นในการจำลองตัว ผลที่ได้ก็คือ เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบางส่วนของโครโมโซมเท่านั้น จากนั้นนำจีโนมดีเอ็นเอที่ได้ไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสและย้อมโดยเอธิเดียมโบรไมด์จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันหรือแตกต่างกันก็ได้ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบได้ในแบคทีเรีย โปรโตซัว เห็ดรา แมลง พืช สัตว์ รวมทั้งมนุษย์ ต่อมาจึงได้มีการนำมาใช้ตรวจสอบพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวาง

เอพี-พีซีอาร์ (AP-PCR) ศึกษาโดย Welsh และ McClelland (1990) โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 20 หรือมากกว่า 20 นิวคลีโอไทด์ และใช้โปรแกรมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ชุด คือ ใช้อุณหภูมิสำหรับ annealing ต่ำในรอบแรก แล้วจึงเพิ่มให้สูงขึ้นอีก 30-40 รอบ โดยในการทำพีซีอาร์ช่วงหลังใช้นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีลงไปด้วย แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยโพลีอะครีลาไมด์เจล ตรวจสอบผลโดยการทำออโตเรดิโอกราฟี

ดีเอเอฟ (DAF) ศึกษาครั้งแรกโดย Caetano-Anolles และคณะ (1991) โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียง 5-8 นิวคลีโอไทด์ และใช้อุณหภูมิ 2 ระดับในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งโดยทั่วไปในพีซีอาร์จะใช้อุณหภูมิ 3 ระดับ จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาแยกขนาดดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโพลีอะครีลาไมด์และย้อมด้วย silver stain

เอ็มเอเอฟพี (MAAP) ศึกษาโดย Caetano-Anolles และคณะ (1992) โดยทำการศึกษา ทั้ง 2 เทคนิค คือ เทคนิคอาร์เอพีดีและเทคนิคเอฟแอลพี (amplification fragment length polymorphism : AFLP) เพื่อใช้ในการสร้างแผนที่โครโมโซม (genomic map)

ความแตกต่างของแถบอาร์เอพีดีหรือโพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่างอาจ
จะเกิดจาก

1. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่มากสุดแทรกในระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์
เกาะ ทำให้ไพรเมอร์ทั้ง 2 โมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ
ขึ้น
2. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอส่วนที่เป็นที่เกาะกับไพรเมอร์หายไป 1 ตำแหน่งหรือทั้ง 2
ตำแหน่ง ทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอจากบริเวณดังกล่าว
3. มีการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ ทำให้
ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายไม่ได้ จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ
4. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสุดแทรกเข้ามาหรือหายไป ทำให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอ
ที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป

โดยทั่วไปโพลิมอร์ฟิซึมของอาร์เอพีดีมักเกิดขึ้นในลักษณะของการมีหรือไม่มีแถบ
ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอของพืชพบทั้งจาก
นิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรีย ในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมดแล้วนำมาวิเคราะห์
อาร์เอพีดี พบว่าแถบดีเอ็นเอบางส่วนประมาณ 5% เกิดจากการเพิ่มปริมาณในส่วน of ไมโทคอนเดรีย
และน้อยกว่า 5% มาจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ แถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่จึงมาจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส
ซึ่งได้รับการถ่ายทอดจากพ่อและแม่ แม้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดีจะทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก
แต่ก็มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ ซึ่งบางครั้งให้ผลที่ต่างจากเดิม เนื่องจากอาร์เอพีดีมีความไวต่อการ
เปลี่ยนสถานะต่าง ๆ จึงต้องควบคุมสถานะต่าง ๆ ให้คงที่ และแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากอาร์เอพีดีจะแสดง
การข่ม (dominance) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างยีนในไทป์
แบบ homozygous dominant และ heterozygous ได้ แต่อาร์เอฟแอลพีสามารถบอกถึงความแตกต่าง
นี้ได้ (สุรินทร์, 2540) ทั้งเทคนิคอาร์เอฟแอลพีและอาร์เอพีดีถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการหา

ค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากแหล่งรวบรวมพันธุ์ โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำมาบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชชนิดเดียวกันที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยได้ และเป็นวิธีที่ง่ายต่อการตรวจสอบจีโนมพืชทั้งจีโนม นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำมาวิเคราะห์ทางสถิติได้ (Thormann และคณะ, 1994)

การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Southern Blot Hybridization

Southern blotting (Southern, 1975) เป็นการถ่ายขึ้นดีเอ็นเอจากเจลสู่แผ่นเมมเบรนก่อนการทำไฮบริไดเซชัน โดยการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว (denature) และย้ายลงแผ่นเมมเบรน หลังจากนั้นนำแผ่นเมมเบรนนี้ไปทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอตัวตรวจสอบหรือโพรบที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยโพรบจะจับคู่กับดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกันบนแผ่นเมมเบรน จากนั้นจึงล้างโพรบที่ไม่เข้าไปจับคู่ที่เป็นส่วนเกินออก แล้วนำแผ่นเมมเบรนไปตรวจสอบด้วยวิธีต่าง ๆ ตามชนิดของสารเคมีที่ใช้ติดอยู่บนโพรบ เช่น ถ้าใช้สารกัมมันตรังสี ในการติดฉลากโพรบ จะทำการตรวจสอบโดยวิธีออโตเรดิโอกราฟี (autoradiography) ด้วยฟิล์มเอกซเรย์ หรือถ้าใช้สารปลอดรังสี (non-radioactive) เช่น สารไบโอติน (biotin) ก็จะนำมาทำปฏิกิริยากับสาร streptavidin ซึ่งเกาะอยู่กับเอนไซม์ alkaline phosphatase แล้วตรวจสอบโดยดูการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ phosphatase กับ substrate ทำให้เกิดสารโมเลกุลใหม่ที่มีสีเกิดขึ้น ซึ่งประสิทธิภาพหรือความไวต่อการทำปฏิกิริยาจะต่ำกว่าการใช้สารกัมมันตรังสี แต่ในปัจจุบันสามารถตรวจสอบโดยวิธีออโตเรดิโอกราฟีได้กับการใช้สารปลอดรังสี เช่น ไบโอติน และฟลูออเรสซิน (fluorescein) โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยา chemiluminescence โดยทำปฏิกิริยาให้เกิดแสงขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาหลายชั่วโมงและตรวจจับแสงที่เกิดขึ้นโดยใช้ฟิล์มที่มีความไวต่อช่วงแสงดังกล่าวซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าการเกิดสี (Bronstein และ McGrath, 1989; During, 1991; Beck, 1992; Bierwerth และคณะ, 1992; Neuhaus-Url และ Neuhaus, 1993)

Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMPO)

ในปี 1995 Richardson และคณะ ได้เสนอเทคนิคใหม่เป็นการทำไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบที่เป็นชุดซ้ำสั้น ๆ (microsatellite DNA) ในการตรวจจับผลผลิตของอาร์เอพีดี เรียกเทคนิคนี้ว่า random amplified microsatellite polymorphism (RAMPO) มีขั้นตอน คือ หลังจากการทำอาร์เอพีดีจะได้ผลผลิตของอาร์เอพีดีออกมา แล้วนำมาแยกขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยการนำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จาก

นั้นย้ายแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) แล้วนำไปไฮบริไดซ์กับ โพรบที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (^{32}P) เช่น $[\text{CA}]_8$ $[\text{GA}]_8$ $[\text{CAC}]_5$ เป็นต้น แล้วตรวจสอบผลโดยการทำออโตเรดิโอกราฟ ซึ่ง Richardson และคณะ (1995) ได้ ทดลองหาความสัมพันธ์ของ *Dioscorea bulbifera* จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดีคิว คู่กับเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอ โดยเริ่มเทคนิคอาร์เอฟดีด้วยการใช้ไพรเมอร์ OPG-15 พบว่าให้แถบดีเอ็นเอ ที่แตกต่างกัน แล้วนำผลผลิตจากการทำอาร์เอฟดีไปย้ายลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วไฮบริไดซ์ ด้วยโพรบ $[\text{CA}]_8$ และ $[\text{GA}]_8$ ซึ่งผลจากแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกัน และเมื่อนำผลไปเทียบกับผล ของอาร์เอฟดี จะเห็นได้ว่าให้ผลที่แตกต่างอย่างเห็นได้ชัด

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Nybom และคณะ (1990) ทำการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อศึกษาความแตกต่างทาง พันธุกรรมในพืชสกุลแอปเปิล สาลี่ และราสเบอร์รี่ ในวงศ์ Rosaceae โดยใช้ดีเอ็นเอจากฝาจ M13 เป็นโพรบ ทำการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ 5 ชนิด พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันได้ ในปีถัดมา Nybom และ Hall (1991) พบความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมระหว่างพืชในสกุลราสเบอร์รี่พันธุ์ปลูก โดยใช้เทคนิคเดียวกันนี้

ต่อมา Koller และคณะ (1993) ทำการจัดจำแนกพันธุ์แอปเปิล (*Pyrus malus*) จำนวน 11 พันธุ์ ด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี พบว่าทั้ง 11 พันธุ์มีความแตกต่างกัน และพบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ที่สกัดได้จะมีผลต่อความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เทคนิคนี้ยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์ความ ผันแปรทางพันธุกรรมของพืช (*Prunus persica* (L.) Batsch) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ โดยใช้พืชพันธุ์ปลูกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้ ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์จำนวน 60 ไพรเมอร์ ปรากฏว่ามีไพรเมอร์ 35 ชนิดทำให้เกิดแถบ ดีเอ็นเอได้ แต่มีไพรเมอร์เพียง 10 ชนิดเท่านั้นที่ให้ความแตกต่างระหว่างพืชที่มาจาก การเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อ (Hashmi และคณะ, 1997)

Yamamoto และคณะ (1994) ใช้เทคนิคเอพี-พีซีอาร์ (AP-PCR) ในการจำแนกพันธุ์ ข้าว (*Oryza sativa* L.) และผักสลัด (*Lactuca sativa* L.) สกัดดีเอ็นเอจากข้าวที่เพาะจากเมล็ดอายุ 1 เดือนจำนวน 37 พันธุ์ ใช้ไพรเมอร์ 21 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 13 ชนิดให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตก

ต่างกันในช่วง 50% ส่วนในผักสลัดเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 47% และแถบดีเอ็นเอที่ได้บางส่วนจำเพาะต่อบางพันธุ์ จึงนำมาใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการคัดเลือกพันธุ์ในอนาคตต่อไปได้ และมีการใช้เทคนิคดีเอเอฟ (DAF) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างหญ้าสกุล *Cynodon* ที่เป็นพันธุ์ปลูกในประเทศออสเตรเลียจำนวน 18 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาดสั้นๆ จำนวน 20 ชนิด ปรากฏว่าไพรเมอร์ 13 ชนิด จะให้รูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในทุกตัวอย่างอย่างชัดเจน เมื่อวิเคราะห์ผลแล้วสามารถแยกพืชในสกุลนี้ออกได้เป็น 2 กลุ่ม (Ho และคณะ, 1997)

นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่เป็นข้าวไร่และข้าวนาสวน โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 42 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 40 ชนิด ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และพบความแตกต่างอย่างชัดเจนในต่างชนิดย่อยและในชนิดย่อยเดียวกัน (Yu และ Ngugen, 1994) ต่อมาสมศักดิ์ และคณะ (2538) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวในสกุล *Oryza* ที่เป็นข้าวพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่า 5 ชนิด คือ *O. sativa*, *O. officinalis*, *O. nivara*, *O. minuta* และ *O. rufipogon* ใช้ไพรเมอร์ 48 ชนิด พบว่ามี 7 ชนิดที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 68 แถบ ขนาด 300-1,700 คู่เบส จึงสามารถแบ่งข้าวที่ใช้ทำการตรวจสอบได้เป็น 4 กลุ่ม

พืชในวงศ์หญ้า (Poaceae) ชนิดอื่นที่มีการนำมาศึกษาด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีมีมากมายหลายชนิด เช่น ศึกษาข้าวบาเลย์พันธุ์แท้และพวกที่เป็น doubled-haploid (DH) ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ ทั้งหมด 33 ชนิด สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนด้วยบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย CTAB พบว่ามีไพรเมอร์ 19 ชนิดที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจำนวน 31 แถบ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจัดเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เป็น dominant ยกเว้น 1 แถบ ดีเอ็นเอที่พบว่าเป็น codominant จากการวิเคราะห์ด้วย southern blot hybridization (Tinker และคณะ, 1993) จากนั้นมีการศึกษาพืชในสกุล *Elymus* ที่มีโครโมโซมเป็น tetraploid โดยใช้คู่ไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์ที่มาจากข้าวสาลี (wheat microsatellite (WMS) primer pairs) รวมกับเทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของจีโนมดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ WMS จำนวน 18 คู่และไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์จำนวน 10 ชนิด ผลปรากฏว่าคู่ไพรเมอร์ WMS 10 ชนิดให้ผลแตกต่างในทุกตัวอย่าง และเมื่อวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีสามารถแยกพืชสกุลนี้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ พืชในกลุ่มที่มีจีโนม เป็น SH และ SY และผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการจำแนกจากลักษณะภายนอก จึงกล่าวได้ว่าทั้ง 2 วิธีนี้สามารถใช้ตรวจสอบหาความแตกต่างภายในชนิดเดียวกันและต่างชนิดได้ (Sun และ

คณะ, 1997) และยังมีการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีนี้ในหญ้าแฝกที่พบในประเทศไทย พบความแตกต่างระหว่างหญ้าแฝกหอมและหญ้าแฝกดอนได้อย่างชัดเจน (วินิตชาญ, 2540)

เทคนิคอาร์เอพีดีนี้ยังสามารถใช้จำแนกพันธุ์พืชได้อีกหลายชนิด เช่น มะละกอ (Stiles และคณะ (1993) คื่นช่าย (*Apium graveolens*) (Yang และ Quiros, 1993) blackcurrent (*Ribes nigrum* L.) (Lanham และคณะ, 1995) และ ฝ้าย (*Gossypium hirsutum* L.) (Iqbal และคณะ, 1997) และเทคนิคอาร์เอพีดียังสามารถนำมาศึกษาเพื่อจำแนกชนิดโดยเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วย เช่น พืชสกุล *Asphodelus* (Lifante และ Aguinagalde, 1996) และพืชสกุล *Scaevola* (Swoboda และ Bhalla, 1997)

นอกจากนี้ Schnell และคณะ (1995) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการศึกษาตัวอย่างมะม่วง (*Mangifera indica* L.) พบว่าทุกตัวอย่างมีความแตกต่างกัน แต่ไม่มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะในแต่ละตัวอย่าง จึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดพร้อมกัน ปรากฏว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะได้ในทุกตัวอย่าง และยังสามารถถึงความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ไพรเมอร์ และดีเอ็นเอที่เหมาะสมด้วย พบว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์และไพรเมอร์จะมีผลต่อรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น แต่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอจะไม่มีผล ซึ่งทั้งสามปัจจัยนี้จะไม่มีผลซึ่งกันและกัน ต่อมา สุมณ และคณะ (2539) ทำการตรวจสอบพันธุ์มังคุดโดยเทคนิคอาร์เอพีดี จากการเก็บตัวอย่างมังคุดในพื้นที่ที่มีการปลูกมาก 3 แห่ง คือ จันทบุรี ชุมพร และนนทบุรี ตรวจสอบกับไพรเมอร์ 152 ชนิด พบว่ามี 26 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่างมังคุดที่นำมาทดสอบได้

นอกจากพืชแล้วยังมีการนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้จำแนกเชื้ออีกด้วย เช่น Manulis และคณะ (1994) จัดจำแนกเชื้อ *Fusarium oxysporum* จากดอกคาร์เนชั่น โดยใช้ไพรเมอร์ 30 ชนิด สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อราที่แยกได้จากเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคของดอกคาร์เนชั่น พบว่ามีไพรเมอร์ 17 ชนิดที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันและสามารถใช้จำแนกเชื้อได้

ในปี 1996 Sharma และคณะได้เปรียบเทียบระหว่างเทคนิคอาร์เอพีดี (Sharma และคณะ, 1995) และเอเอฟแอลพี โดยทำการศึกษาความหลากหลายและสายวิวัฒนาการของพืชสกุล *Lens* พบว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถนำมาวิเคราะห์พืชสกุลนี้ได้ผลสอดคล้องกับเทคนิคอาร์เอพีดี แต่จะให้ผลชัดเจนกว่าเทคนิคอาร์เอพีดีและเทคนิคทางโมเลกุลอื่น ๆ

Gupta และคณะ (1994) ทำการศึกษาหาจำนวนและตำแหน่งชุดซ้ำสั้น ๆ (simple-sequence repeats : SSR) ในจีโนมของยูคาริโอต โดยใช้เทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิคอาร์เอพีดี เรียกว่า เทคนิค single primer amplification reactions (SPARs) และใช้ไพรเมอร์ที่เป็นชุดซ้ำของ 2, 3, 4 และ 5 นิวคลีโอไทด์ พบว่าไพรเมอร์แบบที่เป็นชุดซ้ำของ 4 นิวคลีโอไทด์จะมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันกับชุดซ้ำอื่น ๆ

ในปี 1989 เริ่มมีการนำไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมาใช้เป็นโพรบในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดย Weising และคณะ (1989) แสดงถึงความแตกต่างของชั้นดีเอ็นเอของข้าวบาเลย์ 3 พันธุ์ที่เกิดจากการไฮบริดซ์ด้วยโพรบ (GACA)₄ และถั่วเขียว (*Cicer arietinum*) ที่ไฮบริดซ์ด้วยโพรบ (GATA) และได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเออีกมากมายเช่น Nybom (1991, 1993) และ Weising และคณะ (1991, 1992) ทำการศึกษาในพืช และ Meyer และคณะ (1992, 1993) ศึกษาในเชื้อรา เป็นต้น

Weising และคณะ (1995b) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศและกัญชารวมทั้งมนุษย์ ยีสต์ และแบคทีเรีย *E. coli* โดยอาศัยหลักการพีซีอาร์ใช้ไมโครแซทเทลไลท์เป็นไพรเมอร์ (microsatellite-complementary oligonucleotide as PCR primer : MP-PCR) แล้วนำผลมาไฮบริดซ์กับโพรบที่เป็นชุดซ้ำของ 2 นิวคลีโอไทด์ คือ [GT]₈ และ [GA]₈ พบว่าให้ผลที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แสดงว่าไมโครแซทเทลไลท์สามารถนำมาใช้หาความแตกต่างระหว่างพืชชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันได้

ในปี 1995 Richardson และคณะ ได้เสนอเทคนิคใหม่ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ เรียกว่า เทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอ (RAMPO) และพบความแตกต่างในพืชที่ทำการทดลองและผลที่ได้นี้แตกต่างกับผลที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีอย่างชัดเจน จากนั้น Ramser และคณะ (1997) ได้นำเทคนิคนี้มาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในสกุลถั่ว (*Dioscorea*) โดยเปรียบเทียบไมโครแซทเทลไลท์โพรบ พบว่าไมโครแซทเทลไลท์โพรบที่ใช้อาจเป็นได้ทั้งชุดซ้ำที่เป็น 1, 3 และ 4 นิวคลีโอไทด์ โดยโพรบที่แตกต่างกันก็จะให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันด้วยขึ้นกับความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์โพรบชนิดนั้น ๆ และได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ขนาดสั้นกับไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ด้วย

นอกจากใช้เทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอในพืชแล้วยังมีการนำมาศึกษาในเชื้อราด้วย โดย Weising และคณะ (1995a) ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiostoma novoulmi* ด้วยไพรเมอร์ UBC352 และ UBC429 จากนั้นนำมาไฮบริไดซ์กับโพรบ $[GT]_8$, $[CT]_8$ และ $[CAC]_5$ พบว่าเชื้อราพวกนี้มีความซับซ้อนของจีโนมต่ำและมีไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอน้อย จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ แต่เมื่อนำมาใช้กับพืช 5 สกุลโดยใช้ไพรเมอร์ UBC352 และโพรบ $[GT]_8$ จะเห็นความแตกต่างของพืชทุกตัวอย่าง

จากนั้น Cifarelli และคณะ (1995) ได้ศึกษาโดยใช้เทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอ แล้วสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อบางพันธุ์ได้จึงเรียกชื่อใหม่ว่า random amplified hybridization microsatellites (RAHM) โดยทำการศึกษาทั้งพืช 3 ชนิด คือ หัวผักกาดแดง (*Beta vulgaris* L.) โอลิฟ (*Olea europaea* L.) และ ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) สกัดดีเอ็นเอและทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี จากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วย้ายดีเอ็นเอจากเจลสู่แผ่นเมมเบรนใช้วิธี Southern blot hybridization โดยนำแผ่นเมมเบรนไปไฮบริไดซ์ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบที่เป็นลำดับเบสซ้ำ ๆ กัน (simple sequence repeats : SSR) ที่ติดฉลากด้วย Digoxigenin-dUTP ตรวจสอบการเกิด chemiluminescence โดยที่ดีเอ็นเอจากหัวผักกาดแดงไฮบริไดซ์ด้วยโพรบ $(CC)_{12}$ และดีเอ็นเอจากโอลิฟไฮบริไดซ์ด้วยโพรบ $(GA)_{12}$ และดีเอ็นเอจากทานตะวันไฮบริไดซ์ด้วยโพรบ $(GT)_8$ ผลปรากฏว่าจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสจนถึง 2 กิโลเบส แล้วนำแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะมาทำ library เก็บไว้โดยสกัดดีเอ็นเอจากเมมเบรนแล้วโคลนลงไปในพลาสมิด โดยทำเฉพาะในหัวผักกาดแดง 18 พันธุ์ได้เป็นโคลน pC258-CC มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 537 คู่เบสแทรกอยู่ จากนั้นสกัดชิ้นดีเอ็นเอนี้ออกมาจากพลาสมิด แล้วเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ C258 และตรวจสอบผลโดย Southern blot hybridization ด้วยโพรบ $(CC)_{12}$ อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นออกมาให้บริสุทธิ์และโคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEM-5Zf(+) แล้วคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอนั้นแทรกอยู่ จากนั้นมาสกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการและทำการไฮบริไดซ์กับโพรบ $(CC)_{12}$ อีกทีหนึ่ง เมื่อให้ผลที่แน่ชัดแล้วจึงนำโคลนของ pC258-CC ที่คัดเลือกกว่ามีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการมาหาลำดับเบส ซึ่งผลจากหัวผักกาดแดง 18 พันธุ์พบว่าตรวจสอบได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยบางพันธุ์สามารถตรวจสอบจากการทำอาร์เอพีดีเพียงอย่างเดียว แต่บางพันธุ์ตรวจสอบได้เมื่อทำไฮบริไดเซชันร่วมด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชสกุลมังคุด จำนวน 12 ชนิด และสกุลใกล้เคียง 2 ชนิด รวม 24 ตัวอย่าง โดยเก็บจากสถานที่ต่าง ๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายชื่อตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างพืช	สถานที่เก็บตัวอย่าง	การจัดเรียงตัวของใบ
1. มังคุดตัวอย่างที่ 1 (ศูนย์จันทบุรี) (<i>Garcinia mangostana</i> Linn.)	จังหวัดจันทบุรี	opposite decussate
2. มังคุดตัวอย่างที่ 2 (ประจวบ) (<i>Garcinia mangostana</i> Linn.)	จังหวัดจันทบุรี	opposite decussate
3. มังคุดตัวอย่างที่ 3 (ลำพูน 3 ใบ) (<i>Garcinia mangostana</i> Linn.)	จังหวัดจันทบุรี	whorled
4. มังคุดตัวอย่างที่ 4 (ป้าหวา 3 ใบ) (<i>Garcinia mangostana</i> Linn.)	จังหวัดจันทบุรี	whorled
5. มังคุดตัวอย่างที่ 6 (ดวงกมล 3 ใบ) (<i>Garcinia mangostana</i> Linn.)	จังหวัดจันทบุรี	whorled
6. มังคุดตัวอย่างที่ 6 (ทุ่งตะโก) (<i>Garcinia mangostana</i> Linn.)	จังหวัดชุมพร	opposite decussate
7. มังคุดตัวอย่างที่ 7 (หลังสวน 2) (<i>Garcinia mangostana</i> Linn.)	จังหวัดชุมพร	opposite decussate
8. มังคุดตัวอย่างที่ 8 (หลังสวน 5) (<i>Garcinia mangostana</i> Linn.)	จังหวัดชุมพร	opposite decussate

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างพืช	สถานที่เก็บตัวอย่าง	การจัดเรียงตัวของใบ
9. มังคุดตัวอย่างที่ 9 (ป่าเจ้า)	จังหวัดนนทบุรี	opposite decussate
(<i>Garcinia mangostana</i> Linn.)		
10. มังคุดตัวอย่างที่ 10 (นนทบุรี)	จังหวัดนนทบุรี	opposite decussate
(<i>Garcinia mangostana</i> Linn.)		
11. มะปูด	กรุงเทพฯ	opposite decussate
(<i>Garcinia dulcis</i> Kurz)		
12. มะคันทน์	กรุงเทพฯ	opposite decussate
(<i>Garcinia schomburgkiana</i> Pierre)		
13. พะวา	สวนพฤกษศาสตร์บางเขน	opposite decussate
(<i>Garcinia speciosa</i> Wall)		
14. ชะมวง	สวนพฤกษศาสตร์บางเขน	opposite decussate
(<i>Garcinia cowa</i> Roxb.)		
15. มะปูดป่า	เขาคันทรง จ. ฉะเชิงเทรา	opposite decussate
(<i>Garcinia nervosa</i> Miq.)		
16. หมักแปม	เขาคันทรง จ. ฉะเชิงเทรา	opposite decussate
(<i>Garcinia gracilis</i> Pierre)		
17. นวล	ทุ่งแสลงหลวง จ. พิชญ์โลก	opposite decussate
(<i>Garcinia merguensis</i> Wight)		
18. มังคุดป่า	จังหวัดชุมพร	opposite decussate
(<i>Garcinia costata</i> Hemsl.)		
19. รง	สวนสมุนไพร จ. จันทบุรี	opposite decussate
(<i>Garcinia hanburyi</i> Hook.f.)		
20. G 1	เขาคันทรง จ. ฉะเชิงเทรา	opposite decussate
(<i>Garcinia</i> sp.)		

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างพืช	สถานที่เก็บตัวอย่าง	การจัดเรียงตัวของใบ
21. G 2 (<i>Garcinia</i> sp.)	คณะมนุษยศาสตร์ ม. เกษตรศาสตร์	opposite decussate
22. สารภี (<i>Mammea siamensis</i> Kosterm.)	กรุงเทพฯ	opposite decussate
23. กระทิง (<i>Calophyllum inophyllum</i> Linn.)	สวนพฤกษศาสตร์บางเขน	opposite decussate
24. มังคุดตัวอย่างที่ 11 (มังคุดพวง) (<i>Garcinia mangostana</i> Linn.)	จังหวัดอุดรธานี	opposite decussate

2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1 อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่งบดยา หลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร และ 1.5 มิลลิลิตร เครื่องเซนตริฟิวจ์ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ตามที่อธิบายในวิธีการ

3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวัดความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ได้แก่ เครื่อง spectrophotometer

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกขนาดดีเอ็นเอ ได้แก่ เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส อุปกรณ์ในการย้อมเจล อุปกรณ์ถ่ายรูปโพลาไรซ์

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ได้แก่ อะกาโรสเจล สารละลายบัฟเฟอร์ สารละลายโพลิดิงบัฟเฟอร์ สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน เอธิเดียมโบรไมด์

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำอาร์เอพีดี

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ได้แก่ หลอดพลาสติกขนาด 0.5 มิลลิลิตร เครื่อง DNA Thermal Cycler เครื่องเซนติฟิวจ์ขนาดเล็ก

4.2 สารเคมีในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ได้แก่ mineral oil ฟิชอาร์บัพเฟอร์ แมกนีเซียม คลอไรด์ Taq DNA polymerase สารละลาย dNTP ไพรมเมอร์

4.2 โปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำไฮบริไดเซชัน

5.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการถ่ายดีเอ็นเอสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน ได้แก่ แผ่นไนลอนเมมเบรน กระดาษกรอง Whatman 3 MM กระดาษทิชชู หลอดไฟอัลตราไวโอเล็ต

5.2 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการไฮบริไดเซชัน ได้แก่ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ ไมโครเซพเทลโลทโพรม

5.3 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับตรวจสอบผลการไฮบริไดเซชัน ได้แก่ ชุดน้ำยาตรวจสอบสำเร็จรูป แผ่นฟิล์มเอกซเรย์ น้ำยาส่งภาพ (developer) และน้ำยาคงสภาพ (fixer) ของ Kodak® เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอ การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์และการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

ในการวิจัยนี้ใช้ใบอ่อนพืชในการสกัดดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณมากและคุณภาพดีเนื่องจากบดให้ละเอียดได้ง่าย เนื่องจากพืชในสกุลมังคุดนี้มีใบค่อนข้างหนา ถ้าใช้ใบแก่จะบดยากมากและไม่ละเอียดทำให้ได้ดีเอ็นเอที่คุณภาพไม่ดีและปริมาณน้อย และใช้ตัวอย่างพืชสดนำมาสกัดดีเอ็นเอทันที ถ้าสถานที่เก็บนั้นอยู่ไกลไม่สามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอได้ทันที ให้เก็บตัวอย่างไว้ในถุงพลาสติก พรมน้ำและรัดปากถุงให้แน่น เก็บไว้ในตู้เย็นหรือกล่องใส่น้ำแข็ง เก็บตัวอย่างทั้งกิ่ง ไม่เด็ด

เป็นใบเดี่ยว ๆ เมื่อทำได้ให้รีบสกัดดีเอ็นเอทันที และถ้าตัวอย่างที่เก็บมามีปริมาณมากก็สามารถเก็บไว้ใช้คราวหน้าได้อีกโดยเด็ดเป็นใบเดี่ยวแล้วจุ่มในไนโตรเจนเหลวเพื่อให้แข็งตัวทันทีก่อน จึงนำมาเก็บที่ลบ 80 องศาเซลเซียส ที่เก็บเป็นใบเดียวนั้นเพื่อสะดวกแก่การแบ่งตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ

2. การเตรียมดีเอ็นเอ

โดยใช้วิธีที่ประยุกต์จาก Agrawal และคณะ (1992) มีขั้นตอนดังนี้

2.1 นำใบอ่อนมาล้างให้สะอาด เช็ดให้แห้ง แล้วใช้ใบอ่อน 1 กรัม บดในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด

2.2 นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่เติม $2 \times$ CTAB buffer (4% hexadecyltrimethyl ammonium bromide, 2.8 M NaCl, 20 mM Na_2EDTA , 200 mM Tris HCl, pH 8.0) 10 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร

2.3 แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เขย่าโดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง ทุก ๆ 10 นาที

2.4 นำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

2.5 เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamylalcohol 24 : 1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ

2.6 นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000 g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและคลอโรฟอร์มออกจากกัน

2.7 ใช้ปิเปตดูดชั้นน้ำส่วนบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำละลาย linear polyacrylamide 140 ไมโครลิตรและไอโซโพรพานอลปริมาตร 2 ใน 3 เท่าของปริมาตรของเหลวที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันเบา ๆ

2.8 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ ลบ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.9 แล้วจึงนำมาหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000 g เป็นเวลา

15 นาที

2.10 เทส่วนน้ำทิ้งและล้างตะกอนด้วย wash buffer (10 mM sodium acetate , 70%

ethanol)

2.11 นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000 g เป็นเวลา 2

นาที

2.12 เทส่วนน้ำทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนให้แห้งในอากาศ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.13 ละลายตะกอนใน RNase buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 15 mM NaCl) 500

ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.14 เติม RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.15 สกัดด้วยฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform :

isoamylalcohol 25:24:1) 500 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ 4 ครั้ง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000 g เป็นเวลา 10 นาที

2.16 สกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamylalcohol

24:1) 450 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000 g เป็นเวลา 5 นาที

2.17 ย้ายส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเอใส่ลงในหลอดใหม่ แล้วเติม linear polyacrylamide

70 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรของเหลวที่มีอยู่ และเอทานอล ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรของเหลวที่มีอยู่

2.18 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ ลบ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที

2.19 แล้วจึงนำมาหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 15,000 g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% นำไปเซนตริฟิวจ์ 5 นาที ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศแล้วจึงละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร เก็บที่เย็นเอไว้ที่อุณหภูมิ ลบ 20 °ซ จนกว่าจะใช้ต่อไป

3. การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอทำได้พร้อม ๆ กัน วิธีที่ใช้โดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ การวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้ spectrophotometer หรือดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบรไมด์ หลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส ซึ่งคัดแปลงมาจาก Sambrook และคณะ (1989)

3.1 การวัดปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอโดยวิธี optical method

การวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิก ทำได้โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยอาศัยหลักการว่าเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 260 และโปรตีนจะดูดแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ดังนั้นจึงใช้หลักการดังกล่าวนี้มาวิเคราะห์หาปริมาณและความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอ มีขั้นตอนดังนี้

3.1.1 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ละลายอยู่ในทีอีบัฟเฟอร์ มาเจือจางในสภาพที่เหมาะสมด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

3.1.2 ใช้ น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อเป็นมาตรฐาน (blank)

3.1.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และที่ 280 นาโนเมตร

3.1.4 นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากสูตรดังนี้

$$1.0 A_{260} = 50 \text{ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ของดีเอ็นเอเกลียวคู่)}$$

หรือ
$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (}\mu\text{g/ml)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.1.5 ตรวจสอบคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอโดยดูอัตราส่วนของค่า A_{260}/A_{280} ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นเกลียวคู่บริสุทธิ์ ถ้าได้ค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปะปน ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในสารละลายดีเอ็นเอมีอาร์เอ็นเอปนอยู่ (วัฒนาลัย, 2536)

3.1.6 การวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีนี้จะใช้ได้ดีในกรณีที่สารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ ไม่มีอาร์เอ็นเอและโอลิโกนิวคลีโอไทด์เจือปนและต้องมีปริมาณมากพอจึงจะอ่านค่าการดูดกลืนแสงได้ ซึ่งอยู่ในระดับไมโครกรัม ปริมาณที่วัดได้โดยวิธีนี้ค่อนข้างจะแน่นอนและสามารถตรวจสอบคุณภาพได้ด้วยดังที่กล่าวในข้อ 3.1.5 (สุรินทร์, 2540) แต่ถ้าปริมาณดีเอ็นเอน้อยมาก ๆ จึงต้องเปลี่ยนมาใช้วิธีอื่น

3.2 การวิเคราะห์และแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

โดยใช้หลักการที่ว่าโมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว สามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอโดยประมาณได้ในระดับนาโนกรัม นอกจากนี้การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้ยังสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ด้วยว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอหรือไม่ และยังทราบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขนาดไหน มีการแตกหักของโมเลกุลมากเพียงใด (สุรินทร์, 2540) ทำได้ดังนี้

3.2.1 นำภาดเจลมาปิดขอบด้านปลายทั้งสองด้านให้แน่นหนาด้วยเทปกา

3.2.2 เตรียมอะกาโรสเจล 0.8% โดยชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม ใส่ลงในบัฟเฟอร์ทีเออี (TAE buffer; 4.84 g Tris-acetate, 1.15 ml glacial acetic acid, 2 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 หรือ 0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) 100 มิลลิลิตร ละลายผงอะกาโรสโดยใช้เครื่องไมโครเวฟ 1 นาที ต้มจนเดือดเพื่อให้อะกาโรสหลอมละลาย

3.2.3 ปลอຍให้สารละลายอะกาโรสเย็นลงจนถึงอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในพิมพ์ให้เจลมีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ วางหัวเสียบลงที่ปลายด้านบนของแผ่นเจล เพื่อว่าเมื่อเจลแข็งตัวจะได้มีช่อง (well) สำหรับหยอดตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอ

3.2.4 ปลอຍให้อะกาโรสเจลเย็นลงจนแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที แล้วดึงหัวออกอย่างระมัดระวัง ดึงเทปกาวออกทิ้งไป

3.2.5 นำแผ่นเจลไปใส่ในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส ให้ด้านที่มีช่องอยู่ใกล้ขั้วลบ และเติมบัฟเฟอร์ที่เออีให้ท่วมแผ่นเจลพอสมควร ผิวเจลควรอยู่ใต้สารละลายที่เออีบัฟเฟอร์ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร

3.2.6 ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับโหลดคิงบัฟเฟอร์ (6X loading buffer; 0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 แล้วค่อยๆ หยอดสารละลายผสมนี้ลงในช่องตรงร่องหัวด้วยไมโครปิเปตต์ สารละลายดีเอ็นเอจะจมลง และทำเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดและความเข้มข้น ในที่นี้ใช้ 1 Kb DNA ladder marker

3.2.7 ปิดฝาเครื่องและเปิดกระแสไฟฟ้าให้วิ่งผ่านจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของโหลดคิงบัฟเฟอร์เคลื่อนที่ไปได้ระยะทางที่เหมาะสม ใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที

3.2.8 นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide 0.5 µg/ml) 10-15 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปล้างด้วยน้ำประปาที่กำลังไหลประมาณ 5 นาที

3.2.9 นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้ UV transilluminator บันทึกภาพโดยใช้กล้องถ่ายภาพโพลาไรซ์ที่มีแผ่นกรองแสงสีแดงอยู่ด้วย เปรียบเทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

4. วิธีทำอาร์เอพีดี (RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA)

4.1 การเลือกชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ใช้ไพรเมอร์ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 12 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอได้ปริมาณมากและชัดเจน และมีแถบดีเอ็นเอมาก ดังการศึกษาการตรวจสอบพันธุ์มังกุด โดยสุมนและคณะ (2539) ดังนี้

1. OPAA 10 5' TGGTCGGGTG 3'
2. OPAA 17 5' GAGCCCGACT 3'
3. OPAD 01 5' CAAAGGGCGG 3'
4. OPAD 04 5' GTAGGCCTCA 3'
5. OPAD 05 5' ACCGCATGGG 3'
6. OPAD 06 5' AAGTGCACGG 3'
7. OPAD 08 5' GGCAGGCAAG 3'
8. OPAD 09 5' TCGCTTCTCC 3'
9. OPAD 10 5' AAGAGGCCAG 3'
10. OPAD 11 5' CAATCGGGTC 3'
11. OPAD 12 5' AAGAGGGCGT 3'
12. OPAD 15 5' TTTGCCCCGT 3'

4.2 ปฏิกิริยาในการทำอาร์เอพีดี

ในการทดลองเบื้องต้นเมื่อเลือกไพรเมอร์ที่จะใช้เพิ่มปริมาณได้แล้ว จะต้องทดลองเปลี่ยนแปลงสภาพต่าง ๆ เช่น ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ และอุณหภูมิกับเวลาที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ (polymerase chain reaction : PCR) เพื่อให้ได้สภาพที่เหมาะสมที่สุดสำหรับพืชตัวอย่างนั้นๆ สำหรับดีเอ็นเอของพืชสกุลมังกุดนี้จะใช้ความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยาดังนี้ (สุมนและคณะ, 2539)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
1. ดีเอ็นเอ (50 ng/μl)	2.0	100 ng/15 μl
2. 10 × PCR buffer	1.5	1 เท่า
3. MgCl ₂ (25 mM)	1.5	2.5 mM
4. dNTP (2 mM)	1.2	160 μM
5. ไพรมอร์ (5 pmole/μl)	1.0	5 pmole/15 μl
6. <i>Taq</i> polymerase (5 unit/μl)	0.1	0.5 unit/15 μl
7. น้ำกลั่นบริสุทธิ์	7.7	
	รวม 15 μl	

หยด mineral oil 2-3 หยด เนื่องจากเครื่องพีซีอาร์ไม่มีระบบให้ความร้อนที่ฝา แล้วนำไป เซนทริฟิวจ์ นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้

ตารางที่ 3 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Denaturation	94	3	1
2. Denaturation	94	1	35
Annealing	35	1	
Extension	72	2	
3. Final extension	72	5	1
4. storage	4	Overnight	1

4.3 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำอาร์เอฟดี

ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% (ขั้นตอนตาม 3.2) เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ถ่ายภาพเก็บไว้

4.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

การเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวอย่างพืชทั้ง 24 ตัวอย่าง โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการให้คะแนนจากขนาดและจำนวนแถบของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ในทั้ง 12 ไพรมเมอร์ โดยจะใช้เลข “1” เมื่อมีแถบดีเอ็นเอ และเลข “0” เมื่อไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน (ดังตารางผนวกที่ 1) และนำความแตกต่างทั้งขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละตัวอย่าง ไปเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของพืชแต่ละชนิด

4.5 การเปรียบเทียบรูปแบบของดีเอ็นเอในพืชแต่ละตัวอย่าง

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของพืชแต่ละตัวอย่างที่ปรากฏบนแผ่นอะกาโรสเจลที่ได้จากการทำ RAPD โดยทำการเปรียบเทียบทีละคู่ โดยการใช้ข้อมูลในข้อ 4.4 คำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างพืชจากสัดส่วนของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (F) ได้จากสูตรดังนี้ (Nei และ Li, 1979)

$$F = 2N_{xy} / N_x + N_y$$

N_{xy} คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในพืช x และ y

N_x คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในพืช x

N_y คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในพืช y

นำค่า F ที่คำนวณได้จากทุก ๆ ไพรมเมอร์มารวมกันแล้วหาค่าเฉลี่ย ตัวเลขที่ได้จะสามารถบอกความเหมือนของดีเอ็นเอในพืชแต่ละตัวอย่างได้ ถ้าตัวเลขมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่ามีความเหมือนกันมากในคู่ที่นำมาเปรียบเทียบกัน กรณีที่ค่า F เท่ากับ 1 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันเลย

5. การตรวจพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ

5.1 การทดสอบชนิดของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำไฮบริไดเซชัน

ใช้ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอขนาด 20-21 เบส จำนวน 11 ชนิด ที่สังเคราะห์ขึ้นจากเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยติดฉลากด้วยฟลูออเรสซิน (fluorescein) 2 ตำแหน่ง ดังนี้ (TAT)₇, (GCC)₇, (TGG)₇, (TCC)₇, (CA)₁₀, (AAC)₇, (AAG)₇, (CT)₁₀, (GC)₁₀, (AT)₁₀ และ (GATA)₅

5.1.1 ทำปฏิกิริยาอาร์เอพีดีโดยใช้ดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่างเดียว และใช้ไพรเมอร์ทั้ง 12 ชนิด

5.1.2 ตรวจสอบผลผลิตของอาร์เอพีดีโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% ย้อมเจลด้วยเอซีเดียมโบรไมด์ พร้อมบันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วทำการถ่ายดีเอ็นเอสู่แผ่นไนลอนก่อนจะทำการไฮบริไดเซชัน โดยย้ายดีเอ็นเอที่ถูกทำให้เสียสภาพ (denatured) จากเจลไปสู่แผ่นเมมเบรนเสียก่อน ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้แผ่นไนลอนมากกว่าแผ่นไนโตรเซลลูโลสเพราะมีความเหนียวไม่ขาดง่าย สามารถจับกับกรดนิวคลีอิกได้ดีและสามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่ การถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปสู่แผ่นไนลอนโดยวิธี capillary transfer คือ การให้ดีเอ็นเอค่อย ๆ ซึมผ่านจากเจลขึ้นมาติดกับแผ่นเมมเบรน ใช้เวลาประมาณ 6-24 ชั่วโมง มีวิธีการดังนี้

5.1.2.1 หลังจากนำผลผลิตของอาร์เอพีดีมาแยกขนาดโดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วถ่ายรูปโพลารอยด์เก็บไว้และควรวางไม้บรรทัดชนิดที่ถ่ายรูปแล้วเห็นเส้นแบ่งชัดเจนไว้ข้างเจลด้วย เพื่อจะใช้ดูระยะของแต่ละแถบของดีเอ็นเอ

5.1.2.2 ตัดเจลส่วนที่ไม่ต้องการออก แล้วนำแผ่นเจลใส่ในภาชนะพลาสติก แล้วทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพโดยเติมสารละลาย denaturation solution (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) ลงไป 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

5.1.2.3 เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

5.1.2.4 เทสสารละลายทิ้ง แล้วปรับความเป็นกรดด้วยสารละลาย

neutralization solution (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาเทสสารละลายทิ้ง

5.1.2.5 ถ่ายดีเอ็นเอจากแผ่นอะกาโรสเจลไปสู่แผ่นไนลอน (nylon membrane)

โดยตัดแผ่นไนลอน Hybond™-N⁺ ขนาดเท่ากับแผ่นเจล (5 x 10 เซนติเมตร) หรือใหญ่กว่าเจลเล็กน้อย จุ่มน้ำเพื่อให้เปียกทั่วแผ่น แล้วนำไปแช่ในสารละลายเอสเอสซี (SSC; 15 mM sodium citrate, 0.15 M NaCl, pH 7.0) ความเข้มข้น 20 เท่า นำมาวางทับบนแผ่นอะกาโรสเจล แล้วถ่ายดีเอ็นเอด้วยวิธีคาพิลลารีบลอตติง โดยที่บัฟเฟอร์จะซึมผ่านเจลขึ้นมายังเมมเบรนและจะพาดีเอ็นเอขึ้นมาด้วย ระมัดระวังอย่าให้ส่วนประกอบอื่น เช่น กระดาษกรองหรือกระดาษทิชชูที่อยู่เหนือแผ่นไนลอนแตะบัฟเฟอร์โดยตรงจะทำให้บัฟเฟอร์ลัดซึมผ่านขึ้นมาทางด้านบน ดีเอ็นเอก็จะไม่ถูกพาขึ้นมาบนแผ่นไนลอน

5.1.2.6 ทิ้งไว้ 12-18 ชั่วโมง ใช้กระดาษกรองซับแผ่นไนลอนให้แห้ง แล้ว

ห่อด้วยแผ่นใสห่ออาหาร (wrap) จากนั้นนำไปผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ต 5 นาที เก็บใส่ถุงพลาสติกที่แห้งและสะอาด ปิดให้แน่น แล้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาไฮบริไดเซชัน

5.1.3 จากนั้นทำการไฮบริไดเซชันโดยใช้วิธี Southern blot hybridization แล้วทำ

การเลือกคู่โพรเมอร์กับไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอที่เหมาะสม เพื่อเลือกไปไฮบริไดซ์กับพีซีที 24 ตัวอย่าง โดยวิธีไฮบริไดเซชันทำดังนี้

5.1.3.1 นำแผ่นไนลอนที่ได้จากข้อ 5.1.2.6 มาทำการปรับสภาพเมมเบรนโดย

การแช่ในสารละลาย 2X SSC ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

5.1.3.2 นำแผ่นไนลอนใส่ในถุงพลาสติกทึบร้อนที่แห้งและสะอาด เติมสาร

ละลายไฮบริไดเซชัน (hybridization buffer; 6X SSC, 0.5% blocking agent, 0.1% SDS) 5 มิลลิลิตร ใส่อากาศออกให้หมด ปิดถุงให้สนิท บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิซึ่งจะใช้อุณหภูมิแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของไมโครแซทเทลไลต์โพรบ (ดังตารางที่ 4) นานเป็นเวลา 60 นาที (เรียกว่า pre-hybridization)

ตารางที่ 4 ชนิดของไมโครแซทเทลไลท์โพรบและอุณหภูมิที่ใช้ในการไฮบริไดเซชัน

ชนิดของไมโครแซทเทลไลท์โพรบ	ค่า Tm (°ซ)	อุณหภูมิที่ใช้ในการไฮบริไดเซชัน (°ซ)
1. (GATA) ₅	45	45
2. (TAT) ₇	37	37
3. (GC) ₁₀	75	50
4. (GCC) ₇	79	50
5. (TGG) ₇	65	50
6. (CA) ₁₀	55	45
7. (TCC) ₇	65	50
8. (AAC) ₇	51	45
9. (AAG) ₇	51	45
10. (AT) ₁₀	35	37
11. (CT) ₁₀	55	45

โดยค่า Tm หาจากผลรวมของลำดับเบสในไมโครแซทเทลไลท์ โดยที่ G และ C มีค่าเท่ากับ 4 และ A และ T มีค่าเท่ากับ 2 แล้วจึงเลือกอุณหภูมิสำหรับไฮบริไดเซชันเป็น 3 กลุ่ม คือ 37 , 45 และ 50 องศาเซลเซียส

5.1.3.3 จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายไมโครแซทเทลไลท์โพรบ 5 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายไฮบริไดเซชันในข้อ 5.1.3.2 ระวังอย่าให้สัมผัสกับแผ่นไนลอนโดยตรง ให้หยอดลงไปบริเวณที่เป็นสารละลายเท่านั้น ผสมให้เข้ากัน ไล่อากาศออกให้หมด แล้วปิดตู้ให้สนิท บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิซึ่งจะใช้อุณหภูมิใดขึ้นกับชนิดของไมโครแซทเทลไลท์โพรบ นานเป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

5.1.3.4 นำแผ่นไนลอนใส่ในภาชนะพลาสติก เติมสารละลาย stringency wash buffer (6X SSC, 0.1% SDS) ลงไป 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

5.1.3.5 เทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย stringency wash buffer ใหม่ลงไป 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

5.1.3.6 เทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย stringency wash buffer ใหม่ที่บ่มที่อุณหภูมิที่ใช้ในการไฮบริไดเซชันลงไป 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิที่ใช้ในการไฮบริไดเซชัน เป็นเวลา 1-2 นาที

5.1.3.7 เทสารละลายทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ล้างแอนติบอดี (Antibody wash buffer; 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 300 mM NaCl) 20 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

5.1.3.8 เทสารละลายทิ้ง เติมสารละลายบล็อกกิงเอเจนต์ (blocking agent เจือจาง 1 ใน 10 เท่าใน Antibody wash buffer) 20 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที

5.1.3.9 เทสารละลายทิ้ง เติมสารละลายแอนติฟลูออเรสซีน (anti-fluorescein conjugate ใน 0.5% BSA (bovine serum albumin)) ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ล้างแอนติบอดี 1 : 1000 เท่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที

5.1.3.10 เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างแผ่นในลอนด้วยบัฟเฟอร์ล้างแอนติบอดีที่ผสมทวิน 20 (Tween 20) 0.3 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที 3 ครั้ง และล้างด้วยบัฟเฟอร์ล้างแอนติบอดีที่ไม่ผสมทวินอีก 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที

5.1.4 การตรวจสอบผลไฮบริไดเซชัน (Amersham[®] Life Science, 1993)

5.1.4.1 นำแผ่นในลอนมาวางบนแผ่นใสห่ออาหาร (wrap) โดยหงายด้านหน้าขึ้น (ด้านที่สัมผัสกับอะกาโรสเจล) จากนั้นใช้ไมโครปิเปตต์หยดสารละลาย CDP-star* detection reagent ลงบนผิวหน้าของแผ่นในลอนให้ทั่ว ทิ้งไว้ 5 นาที

5.1.4.2 นำแผ่นในลอนมาห่อด้วยแผ่นใสห่ออาหารแผ่นใหม่ โดยต้องกำจัด CDP-star* detection reagent ที่เกินออกก่อน ใช้เทปกาวใสยึดติดกับกล่องดำ (expose box) ให้แน่น

5.1.4.3 นำเข้าห้องมืด แล้วประกบแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์ เข้ากับแผ่นไนลอนในกล่องดำ ซึ่งแผ่นใสห่ออาหารด้านที่สัมผัสฟิล์มต้องแห้ง ทิ้งไว้ 5-10 นาที

5.1.4.4 นำแผ่นฟิล์มไปแช่ในน้ำยาสร้างภาพ (developer) ของ Kodak® นานประมาณ 30 วินาที

5.1.4.5 นำแผ่นฟิล์มไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ (fixer) ของ Kodak® นานประมาณ 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำไหลประมาณ 30 นาที ผึ่งแผ่นฟิล์มให้แห้ง

5.1.4.6 จากนั้นนำมาวิเคราะห์ เพื่อจับคู่ระหว่างไมโครแซทเทลไลท์โพรบกับไพรเมอร์ที่เหมาะสม เพื่อจะได้นำมาวิเคราะห์ทั้ง 24 ตัวอย่าง

5.2 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีไฮบริไดเซชัน

5.2.1 การถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปสู่แผ่นไนลอนโดยวิธี capillary transfer

หลังจากนำผลผลิตของอาร์เอฟดีมาแยกขนาดโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสตามวิธีในข้อ 3.2 โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% แล้วทำการถ่ายรูปโพลารอยด์เก็บไว้และควรวางไม้บรรทัดชนิดที่ถ่ายรูปแล้วเห็นเส้นแบ่งชัดเจนไว้ข้างเจลด้วย เพื่อจะใช้ระยะของแต่ละแถบของดีเอ็นเอ ทำการถ่ายดีเอ็นเอจากแผ่นอะกาโรสเจลไปสู่แผ่นไนลอน (nylon membrane) โดยวิธีเดียวกับข้อ 5.1.2

5.2.2 การไฮบริไดเซชัน

ทำการไฮบริไดส์โดยการจับคู่ไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมจำนวน 10 คู่ที่ได้จากผลของข้อ 5.1.4.6 โดยใช้สารละลายไฮบริไดเซชัน 15 มิลลิลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิซึ่งจะใช้อุณหภูมิแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของไมโครแซทเทลไลท์โพรบนั้น และจะใช้สารละลายไมโครแซทเทลไลท์โพรบ 15 ไมโครลิตร และสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ เช่น บัฟเฟอร์ล้างแอนติบอดี สารละลายบล็อกกิ้งเอเจนท์ และสารละลายแอนติฟลูออเรสซิน ใช้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นทำตามวิธีในข้อ 5.1.3 และ 5.1.4 แล้วตรวจดูภาพที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มเปรียบเทียบกับภาพโพลารอยด์ นำผลมาวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์

5. สถานที่ทำการวิจัย

สถานที่ ห้องปฏิบัติการภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
 เกษตรศาสตร์
 ห้องปฏิบัติการภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
 เกษตรศาสตร์

6. ระยะเวลาทำการวิจัย เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม 2539 สิ้นสุดเดือนกุมภาพันธ์ 2541

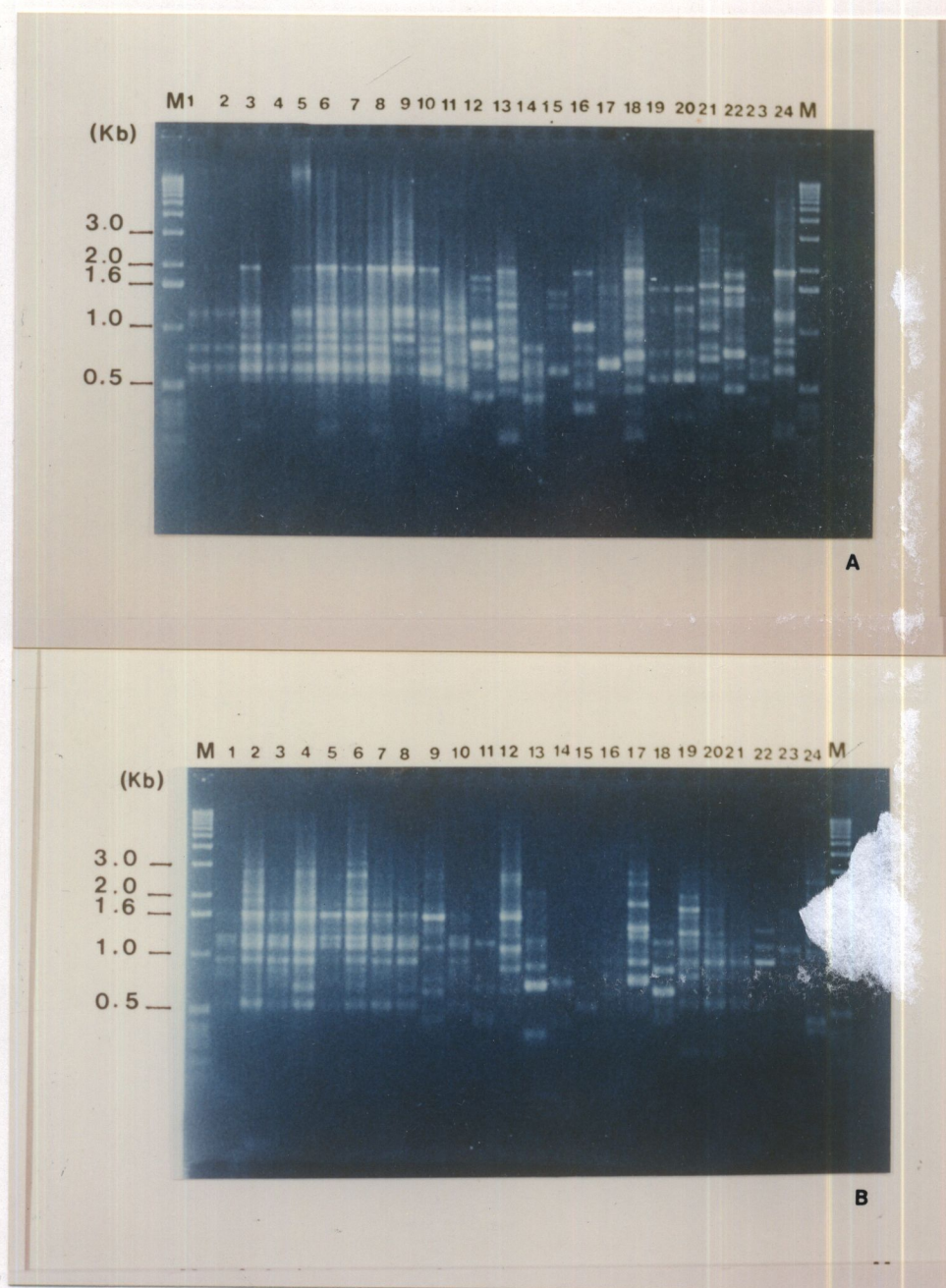
ผลและวิจารณ์

1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

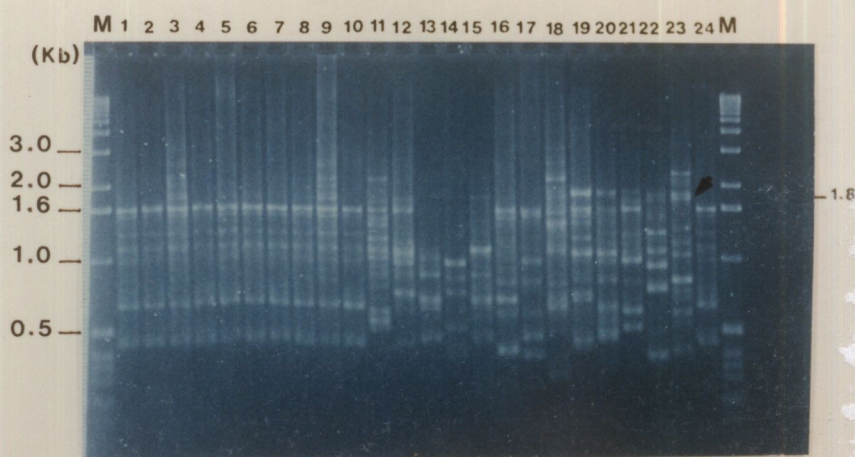
จากการใช้ไพรเมอร์ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ OPAA 10, OPAA 17, OPAD 01, OPAD 04, OPAD 05, OPAD 06, OPAD 08, OPAD 09, OPAD 10, OPAD 11, OPAD 12 และ OPAD 15 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพืชสกุลมังคุดจำนวน 12 ชนิด โดยรวมมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) จำนวน 11 ตัวอย่าง และพืชในสกุลใกล้เคียงอีก 2 ชนิด รวมทั้งสิ้น 24 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจนในทุกตัวอย่าง เมื่อพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากไพรเมอร์แต่ละชนิดจะให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กันในพืชแต่ละชนิด เมื่อแยกขนาดดีเอ็นเอบนแผ่นวุ้นอะกาโรสด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าพืชทั้ง 12 ชนิดมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism) โดยที่แถบดีเอ็นเอจะมีขนาดอยู่ระหว่าง 0.3 ถึง 3.0 กิโลเบส จำนวนทั้งหมด 107 แถบ ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบจากพืชแต่ละชนิด

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของพืชสกุลมังคุดภายในชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับพืชในวงศ์เดียวกัน แต่ต่างสกุลกัน พบความแตกต่างดังแสดงในภาพที่ 1-6 ซึ่งคาดว่าสามารถใช้เป็นตัวแทนหรือเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ที่จำเพาะได้ในพืชสกุลมังคุด

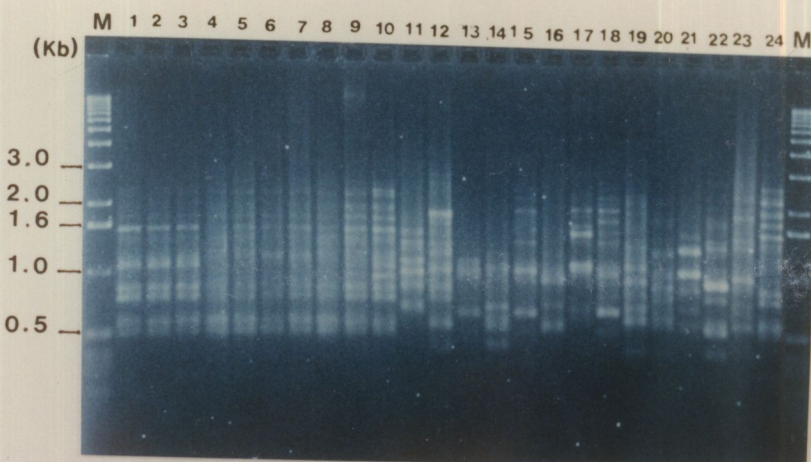
การแยกความแตกต่างของมังคุด 11 ตัวอย่างนั้น พบว่าไพรเมอร์ 4 ชนิด คือ OPAD 01, OPAD 08, OPAD 11 และ OPAD 12 ให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในมังคุดทุกตัวอย่าง ขณะที่ไพรเมอร์ 8 ชนิดให้แถบดีเอ็นเอของมังคุด 10 ตัวอย่างเหมือนกัน (monomorphism) ยกเว้นอีกหนึ่งตัวอย่างคือ มังคุดพวงจะเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยมังคุดทั้ง 10 ตัวอย่างจะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์ 42 แถบ ในจำนวนนี้มี 12 แถบที่ไม่ปรากฏในมังคุดพวง และมีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในมังคุดพวงด้วย จากแถบดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์มี 1 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 1.23 กิโลเบส จากไพรเมอร์ OPAD 09 ที่ปรากฏเฉพาะในมังคุดพวง โดยที่ตัวอย่างมังคุดอื่นไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 4 B)



ภาพที่ 1 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ A.) OPAA 10 B.) OPAA 17 กับพืชสกุลมังกุด และสกุลใกล้เคียง เรียงลำดับดังตารางที่ 1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส

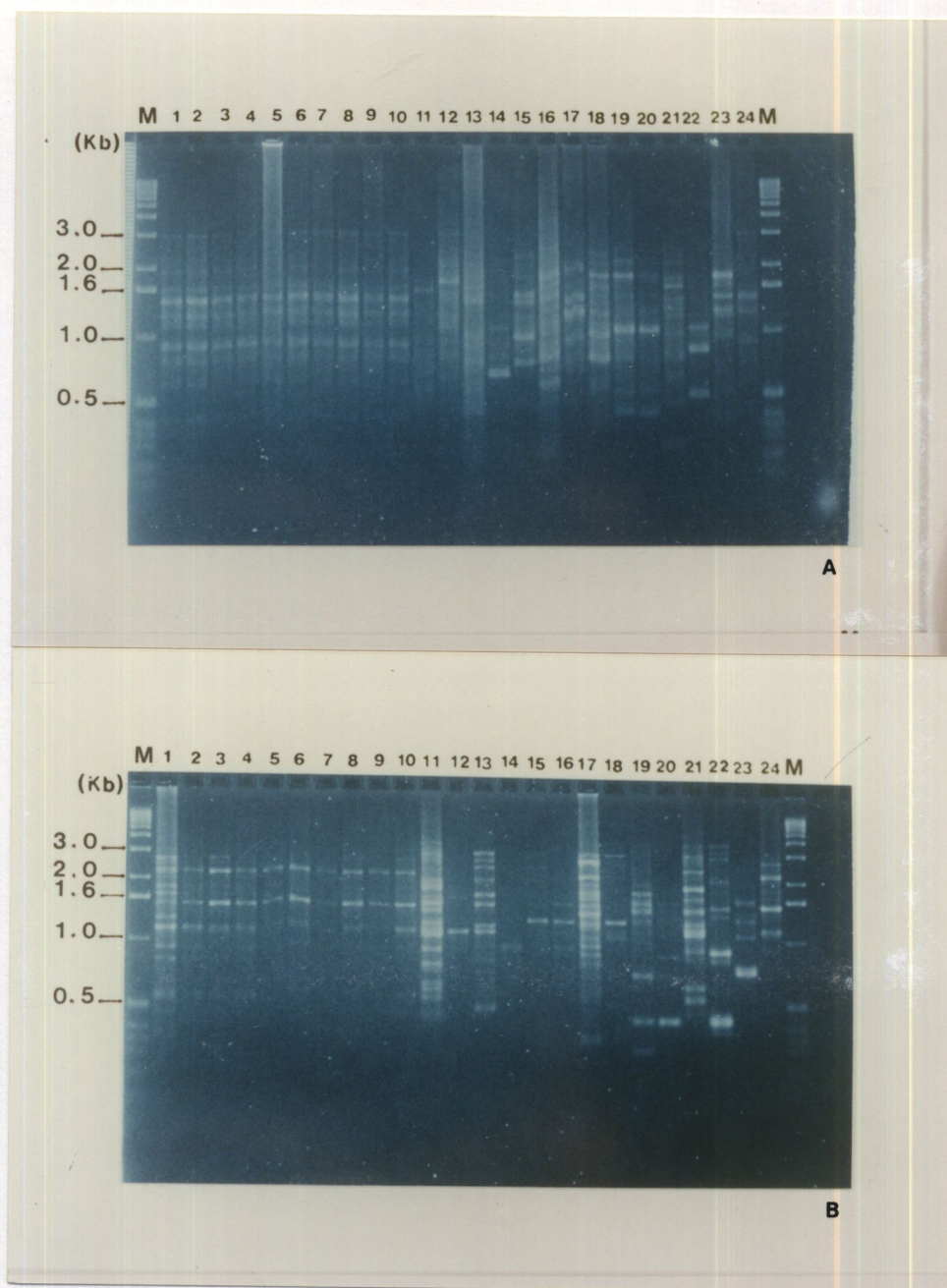


A

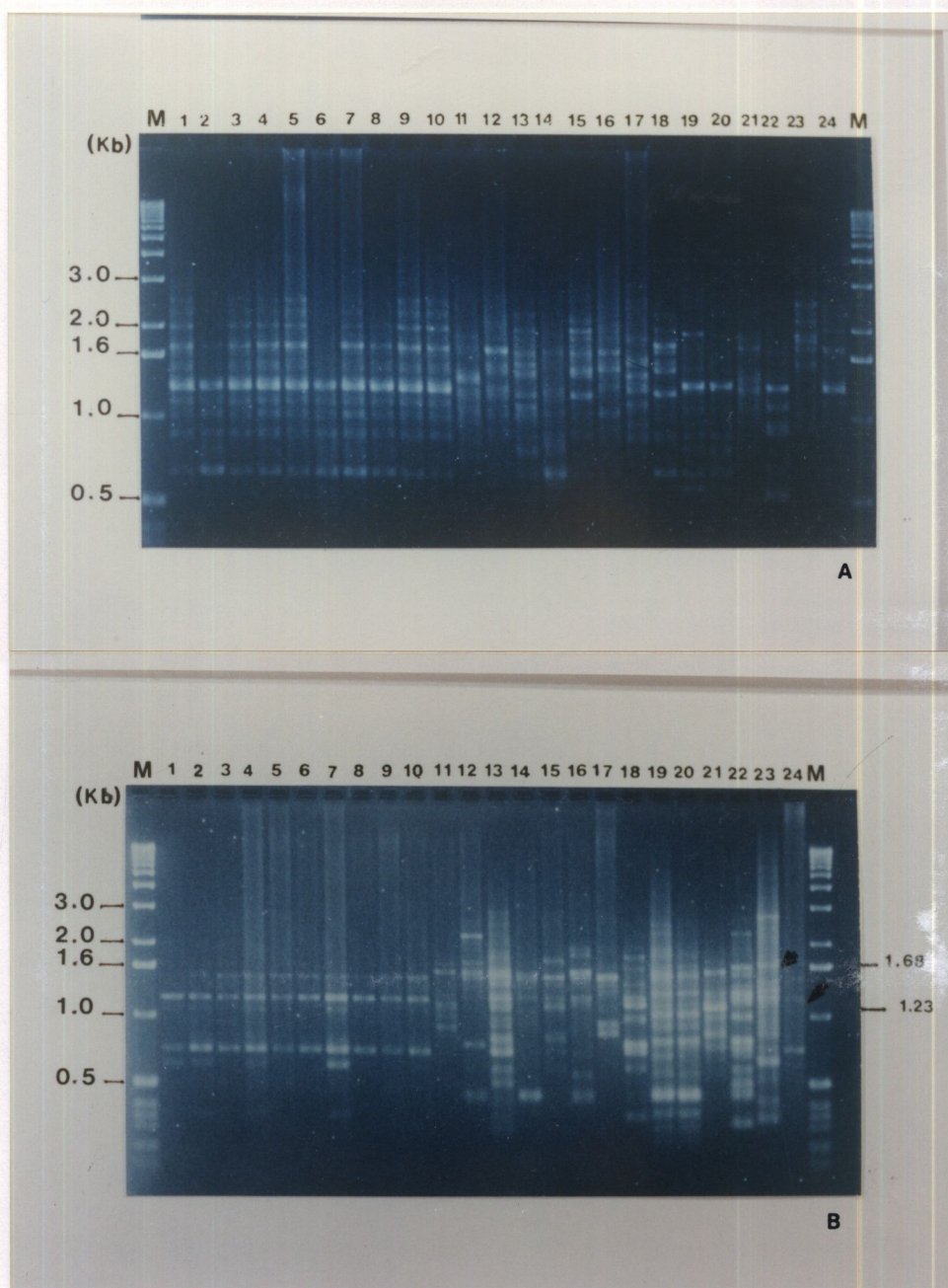


B

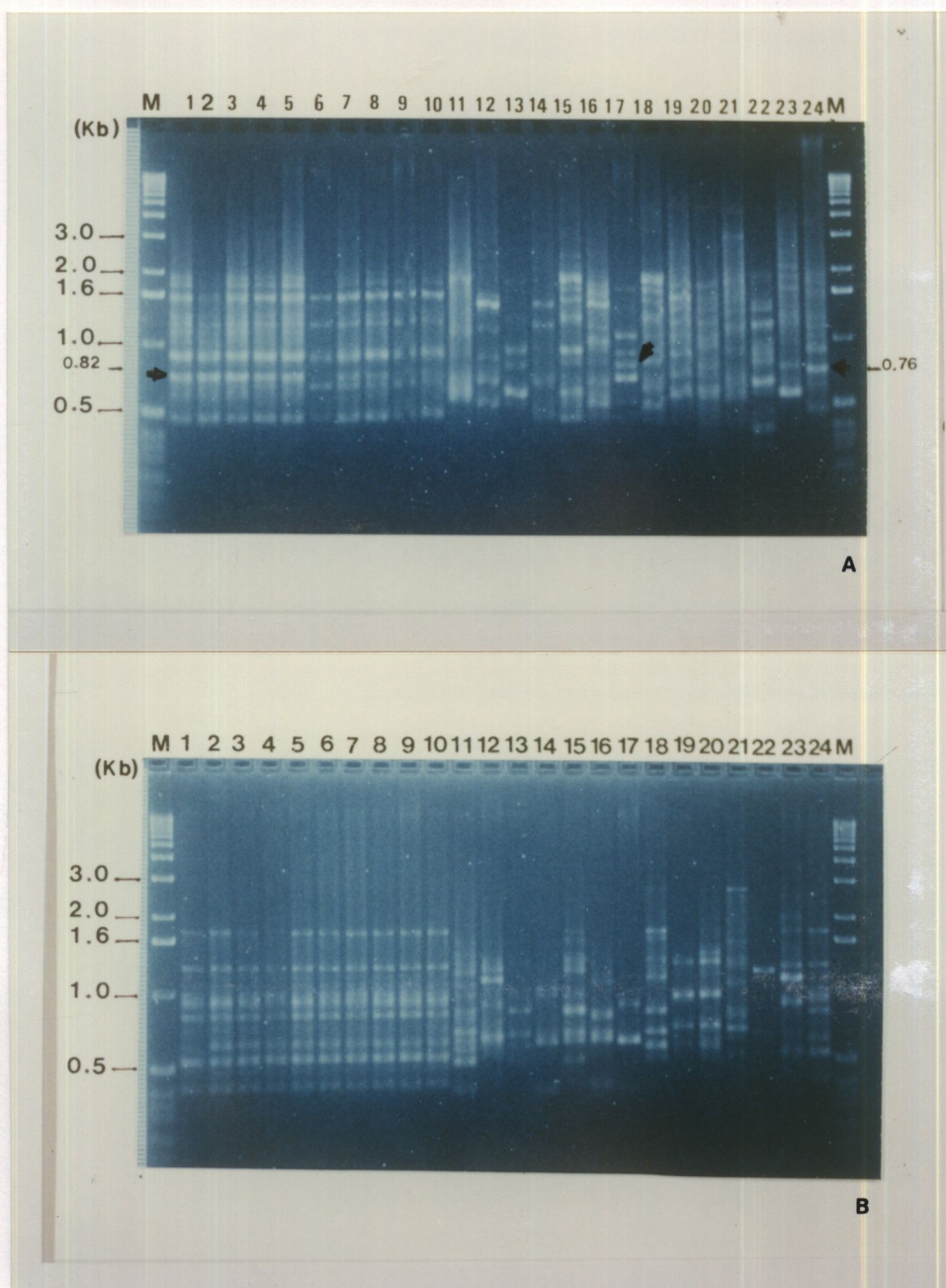
ภาพที่ 2 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ A.) OPAD 01 B.) OPAD 04 กับพืชสกุลมั่งคุด และสกุลใกล้เคียง เรียงลำดับดังตารางที่ 1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส



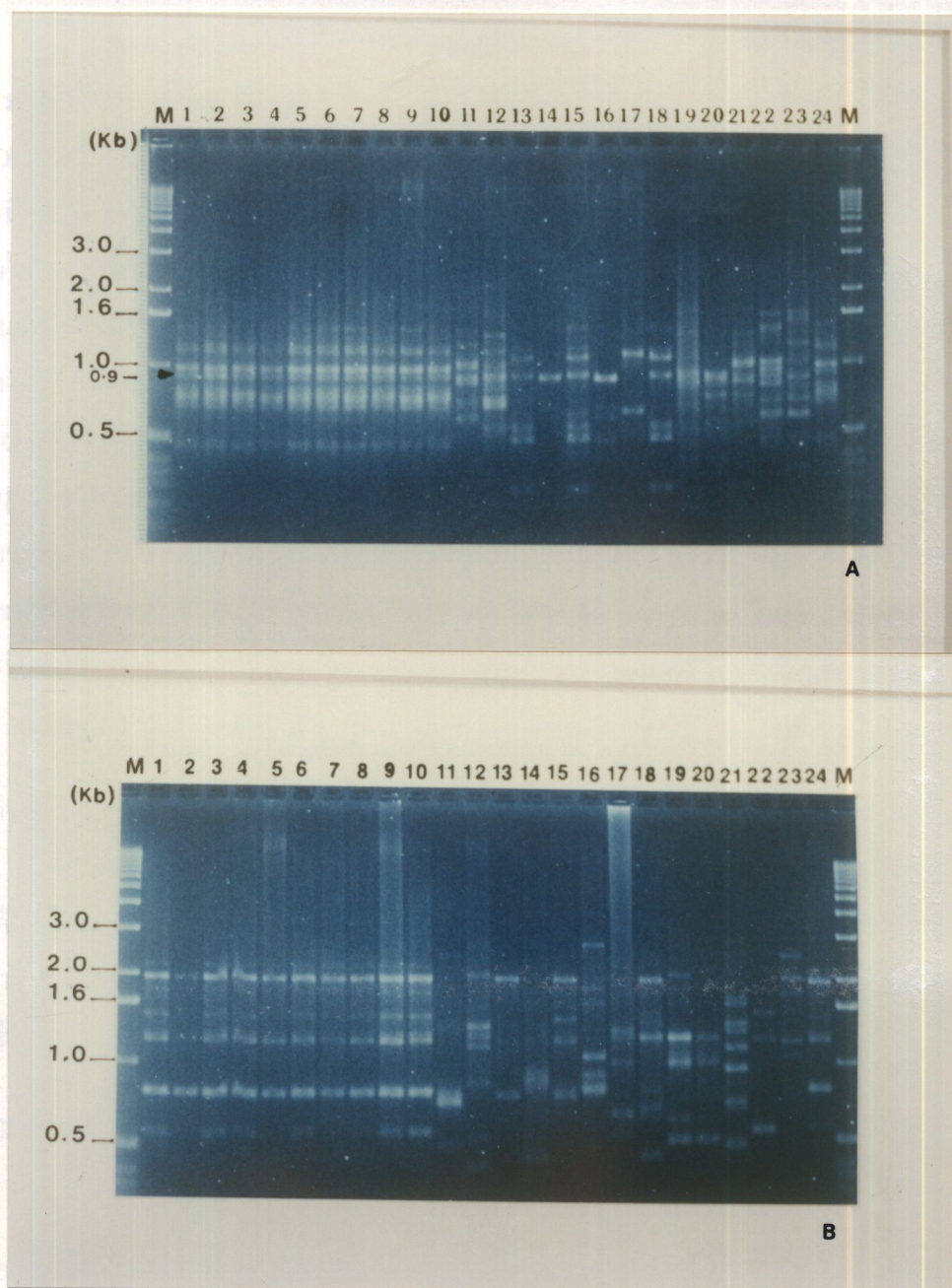
ภาพที่ 3 จีนดิเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์ A.) OPAD 05 B.) OPAD 06 กับพืชสกุลมังกุด และสกุลใกล้เคียง เรียงลำดับดังตารางที่ 1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส



ภาพที่ 4 ชั้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ A.) OPAD 08 B.) OPAD 09 กับพืชสกุลมังกุด และสกุลไค้เคียง เรียงลำดับดังตารางที่ 1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส



ภาพที่ 5 จีนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ A.) OPAD 10 B.) OPAD 11 กับพืชสกุลมั่งคุด และสกุลใกล้เคียง เรียงลำดับดังตารางที่ 1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส



ภาพที่ 6 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ A.) OPAD 12 B.) OPAD 15

กับพืชสกุลมังกุด และสกุลใกล้เคียง เรียงลำดับดังตารางที่ 1 และ M คือ ดีเอ็นเอ

มาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส

จากการแยกความแตกต่างระหว่างพืชในสกุลมังคุด การทดลองพบว่าทุกไพรเมอร์สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดภายในสกุลนี้ได้เกือบทุกชนิด โดยเฉพาะไพรเมอร์ OPAD 01, OPAD 04 และ OPAD 06 ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในทุกชนิด ขณะที่ไพรเมอร์อื่นจะมีบางชนิดที่มีแถบดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์คล้ายกัน และมีบางแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายได้ในบางชนิด เช่น ซีนดีเอ็นเอขนาด 0.76 กิโลเบส จากไพรเมอร์ OPAD 10 อาจจะสามารถใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายของการตรวจสอบแยกมังคุด (*G. mangostana* Linn.) ได้ และซีนดีเอ็นเอขนาด 0.82 กิโลเบส จากไพรเมอร์ OPAD 10 พบเฉพาะในนวล (*G. merguensis* Wight) จึงอาจใช้ในการแยกนวลได้ (ภาพที่ 5 A) และซีนดีเอ็นเอขนาด 0.9 กิโลเบส จากไพรเมอร์ OPAD 12 (ภาพที่ 6 A) ปรากฏเกือบทุกชนิดในสกุลนี้มีเพียง 2 ชนิดที่ไม่ปรากฏแถบนี้ คือ นวลและ G 2 (ตัวอย่างที่ 21) ที่ไม่ทราบชนิด อาจจะเนื่องมาจากนวลมีลักษณะที่ต่างจากชนิดอื่นตรงที่ดอกเป็นช่อดอกแบบ cyme ขณะที่ทุกชนิดเป็นดอกเดี่ยวหรือช่อดอกแบบ raceme (Ridley, 1922) ขณะที่รูปร่างใบของ G 2 แตกต่างจากชนิดอื่น

ในระหว่างสกุลในวงศ์ Guttiferae (Clusiaceae) มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับตัวอย่างพืชสกุลสารภี คือ *Mammea siamensis* Kosterm. และสกุลกระทิง คือ *Calophyllum inophyllum* Linn. ที่ทำให้แตกต่างจากพืชในสกุลมังคุด คือซีนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ OPAD 01 ขนาด 1.8 กิโลเบส (ภาพที่ 2 A) และไพรเมอร์ OPAD 09 ขนาด 1.68 กิโลเบส (ภาพที่ 4 B) และยังพบว่าแถบดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์ในบางไพรเมอร์ของพืชบางชนิดในสกุลมังคุดคล้ายกับสกุลกระทิง คือ ไพรเมอร์ OPAA 10 และไพรเมอร์ OPAD 08

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากผลของอาร์เอฟทีด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

จากการนำข้อมูลของขนาดและจำนวนแถบของซีนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากเทคนิคอาร์เอฟทีซึ่งมีทั้งหมด 107 แถบมาวิเคราะห์และจัดจำแนกด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Phylip โดยการกำหนดสัญลักษณ์เลข “1” กรณีที่พบแถบดีเอ็นเอ และกำหนดสัญลักษณ์เลข “0” กรณีที่ไม่มีแถบดีเอ็นเอ (ตารางผนวกที่ 1) แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างจากสัดส่วนของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน เพื่อคำนวณระดับความเหมือนและความแตกต่างของตัวอย่างที่ละคู่สลับกัน (Similarity Index) จนครบทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 5) จากนั้นนำค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบไปแสดงความสัมพันธ์เป็น Phylogenetic tree (ภาพที่ 7)

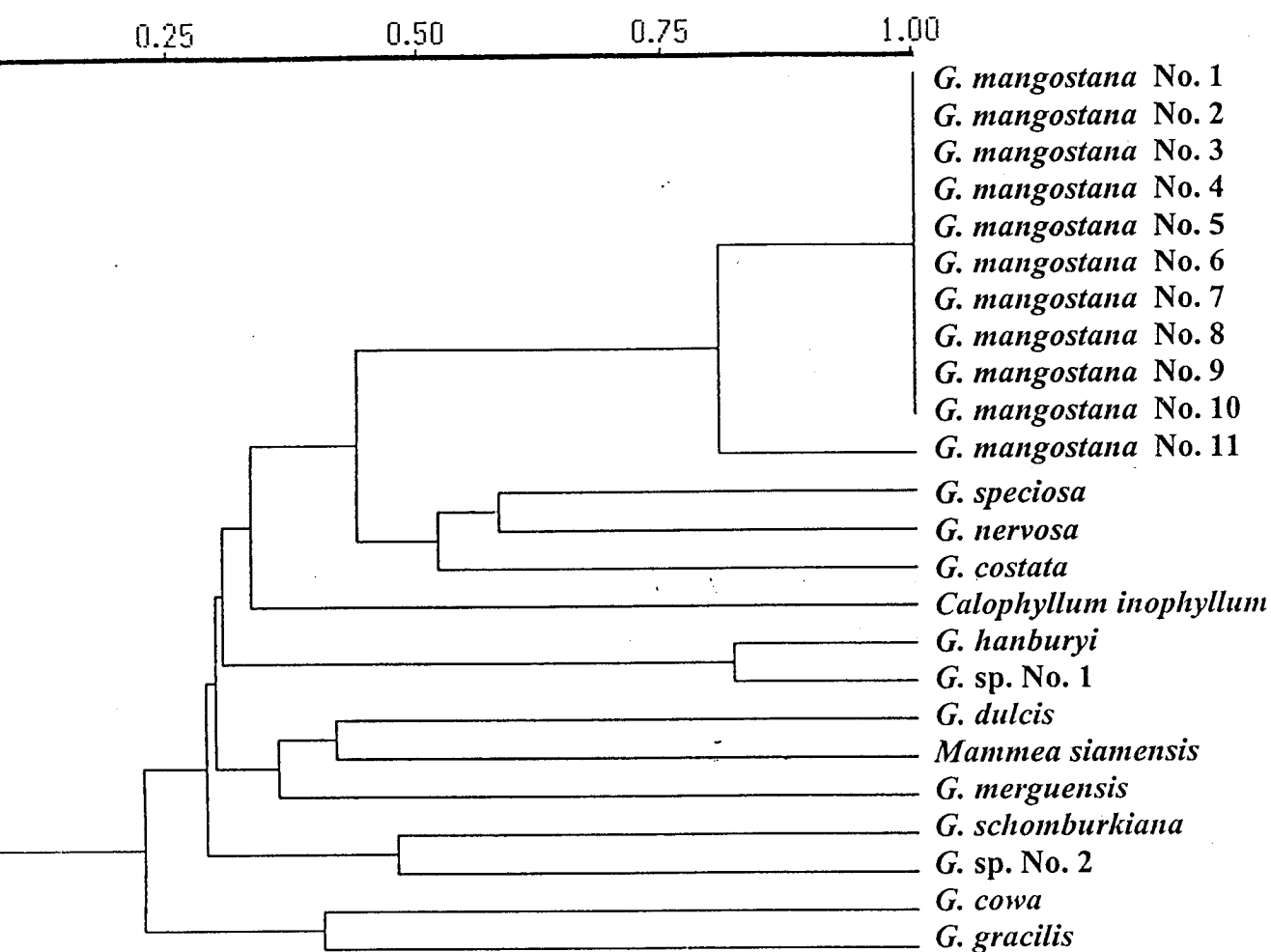
ผลจากการจัดจำแนกพืชในสกุลมังคุดจำนวน 12 ชนิด และพืชสกุลใกล้เคียง 2 ชนิด รวมทั้งสิ้น 24 ตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Phylip นั้น ได้จัดตัวอย่างมังคุดทั้ง 11 ตัวอย่างไว้ในกลุ่มเดียวกัน และตัวอย่างที่ 19 คือ รง (*Garcinia hanburyi* Hook.f.) และตัวอย่างที่ 20 (G 1) มีความสัมพันธ์กันมากโดยมีค่า similarity index สูงที่สุด 0.897 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้งสองตัวอย่างที่คล้ายคลึงกันมาก จึงน่าจะมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน และพืชที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับมังคุดที่สุดคือมังคุดป่า (*Garcinia costata* Hemsl.), พะวา (*Garcinia speciosa* Wall.) และมะพุดป่า (*Garcinia nervosa* Miq.) ตามลำดับ ซึ่งทางด้านสัณฐานวิทยานั้นมังคุดป่า พะวา และมะพุดป่าจะมีความสัมพันธ์กันมากกว่าที่สัมพันธ์กับมังคุด และความสัมพันธ์ระหว่างสกุลพบว่าสกุลกระทิงและสกุลสารภีมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน เนื่องจากมีลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกัน กล่าวคือทั้งสองสกุลนี้เป็นดอกสมบูรณ์เพศและรังไข่มี 1 ช่อง แต่ต่างกันที่พืชสกุลกระทิง (*Calophyllum*) มีอวุล 1 อัน ขณะที่พืชสกุลสารภี (*Mammea*) มีอวุล 4 อัน และพืชสกุลกระทิงมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพืชสกุลมังคุดมากกว่าพืชสกุลสารภี เนื่องจากพืชสกุลกระทิงและพืชสกุลมังคุดมีลักษณะที่คล้ายกันคือมีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ แต่พืชสกุลสารภีมีกลีบเลี้ยง 2 กลีบ และพืชสกุลมังคุดนั้นเป็นดอกเพศเดียวและรังไข่มี 2-12 ช่อง

จากการศึกษาจึงกล่าวได้ว่าอาร์เอพีดีสามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดและสกุลของพืชในวงศ์ Guttiferae (Clusiaceae) ได้ โดยสามารถแยกกลุ่มของมังคุดออกจากพืชชนิดอื่นได้อย่างชัดเจน โดยแยกจากพืชสกุลอื่นได้เนื่องจากลักษณะที่มีดอกเพศเดียว ขณะที่แยกจากพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกันตรงที่มีน้ำยางเหลือง และไม่มีเกสรเพศผู้ ซึ่งมีผู้ทำการศึกษาโดยใช้อาร์เอพีดีกับพืชสกุล *Asphodelus* ร่วมกับลักษณะภายนอกและลักษณะโครโมโซมในการศึกษาวิวัฒนาการของพืชสกุลนี้ (Lifante และ Aguinalge, 1996) และ Swoboda และ Bhalla (1997) ศึกษาพืชสกุล *Scaevola* ระหว่างพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก ซึ่งผลอาร์เอพีดีที่ออกมาจะสอดคล้องกับลักษณะภายนอก จึงสรุปได้ว่าอาร์เอพีดีสามารถใช้หาความผันแปรของพืชสกุลนี้ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ในชนิดเดียวกันและต่างชนิดได้

ขณะที่อาร์เอพีดียังไม่สามารถจำแนกภายในชนิดของมังคุดได้ชัดเจน อาจเนื่องมาจากผลของมังคุดไม่ได้เกิดจากการผสมพันธุ์ แต่เกิดจากเนื้อเยื่อนิวเคลอัสมีการแบ่งตัว เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า ผลแบบ apomixis ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ไม่สามารถจำแนกตัวอย่างมังคุดแต่ละตัวอย่างออกจากกันได้

ตารางที่ 5 แสดงค่า Similarity Index ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของแถบคลื่นของพืชทั้ง 24 ตัวอย่างจากเทคนิคอาร์เอส

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	1.000																							
2	1.000	1.000																						
3	1.000	1.000	1.000																					
4	1.000	1.000	1.000	1.000																				
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000																			
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000																		
7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000																	
8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000																
9	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000															
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000														
11	0.579	0.579	0.579	0.579	0.579	0.579	0.579	0.579	0.579	0.579	1.000													
12	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.589	1.000												
13	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.776	0.533	1.000												
14	0.551	0.551	0.551	0.551	0.551	0.551	0.551	0.551	0.551	0.561	0.682	0.645	1.000											
15	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.608	0.495	0.757	0.664	1.000										
16	0.589	0.589	0.589	0.589	0.589	0.589	0.589	0.589	0.589	0.617	0.635	0.654	0.804	0.617	1.000									
17	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.682	0.608	0.589	0.720	0.589	0.673	1.000								
18	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.608	0.533	0.738	0.607	0.682	0.598	0.570	1.000							
19	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.542	0.533	0.551	0.645	0.514	0.598	0.607	0.570	1.000						
20	0.533	0.533	0.533	0.533	0.533	0.533	0.533	0.533	0.533	0.561	0.561	0.561	0.710	0.542	0.626	0.617	0.561	0.897	1.000					
21	0.551	0.551	0.551	0.551	0.551	0.551	0.551	0.551	0.551	0.673	0.712	0.579	0.654	0.486	0.720	0.654	0.523	0.579	0.626	1.000				
22	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.645	0.551	0.561	0.645	0.533	0.636	0.570	0.570	0.607	0.645	0.551	1.000			
23	0.495	0.495	0.495	0.495	0.495	0.495	0.495	0.495	0.495	0.495	0.617	0.561	0.692	0.561	0.664	0.634	0.579	0.617	0.645	0.626	0.617	1.000		
24	0.860	0.860	0.860	0.860	0.860	0.860	0.860	0.860	0.860	0.860	0.626	0.664	0.645	0.645	0.626	0.654	0.598	0.645	0.561	0.598	0.598	0.617	0.598	1.000



ภาพที่ 7 การจัดจำแนกตัวอย่างพืชในสกุล *Garcinia* และสกุลใกล้เคียง ในลักษณะ

Phylogenetic tree จากผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี ตัวเลข

ในแถวบนแสดงสัดส่วนของความคล้ายคลึงกันของแต่ละตัวอย่าง

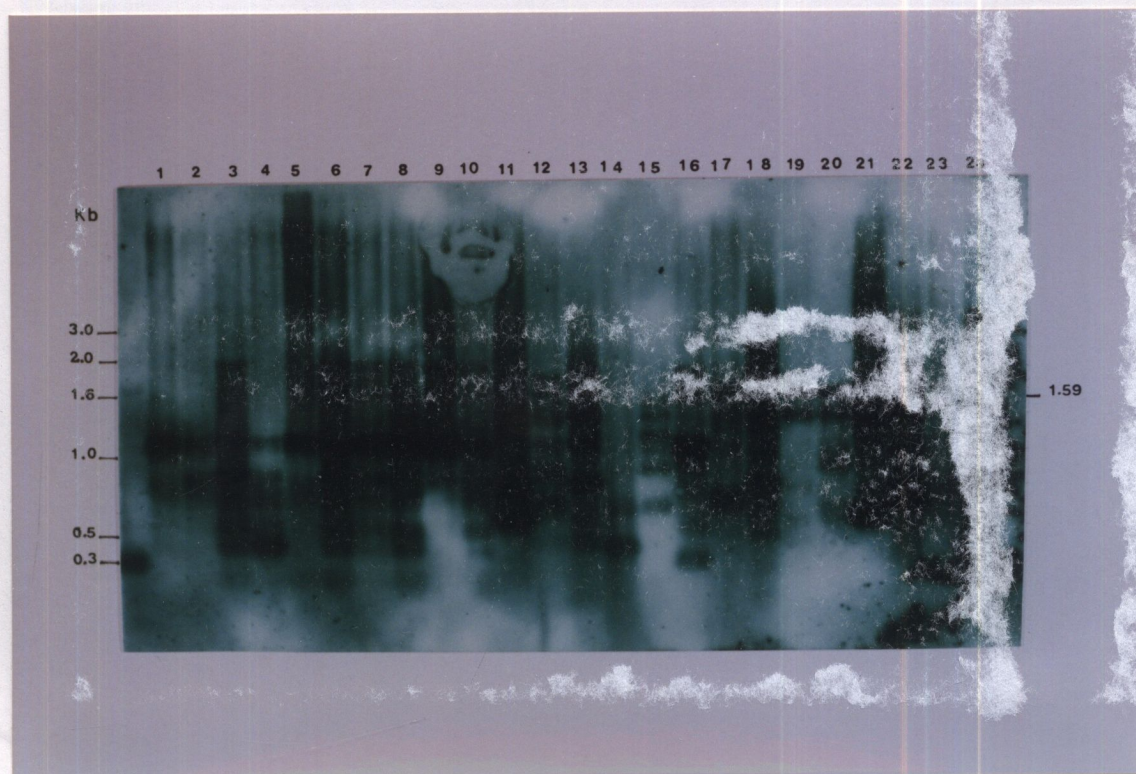
ด้วยเทคนิคอาร์เอฟดีเพียงอย่างเดียว แม้ว่าจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันบ้างก็ตาม โดยลักษณะที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมก็ได้

3. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอฟเอ็มพีโอ

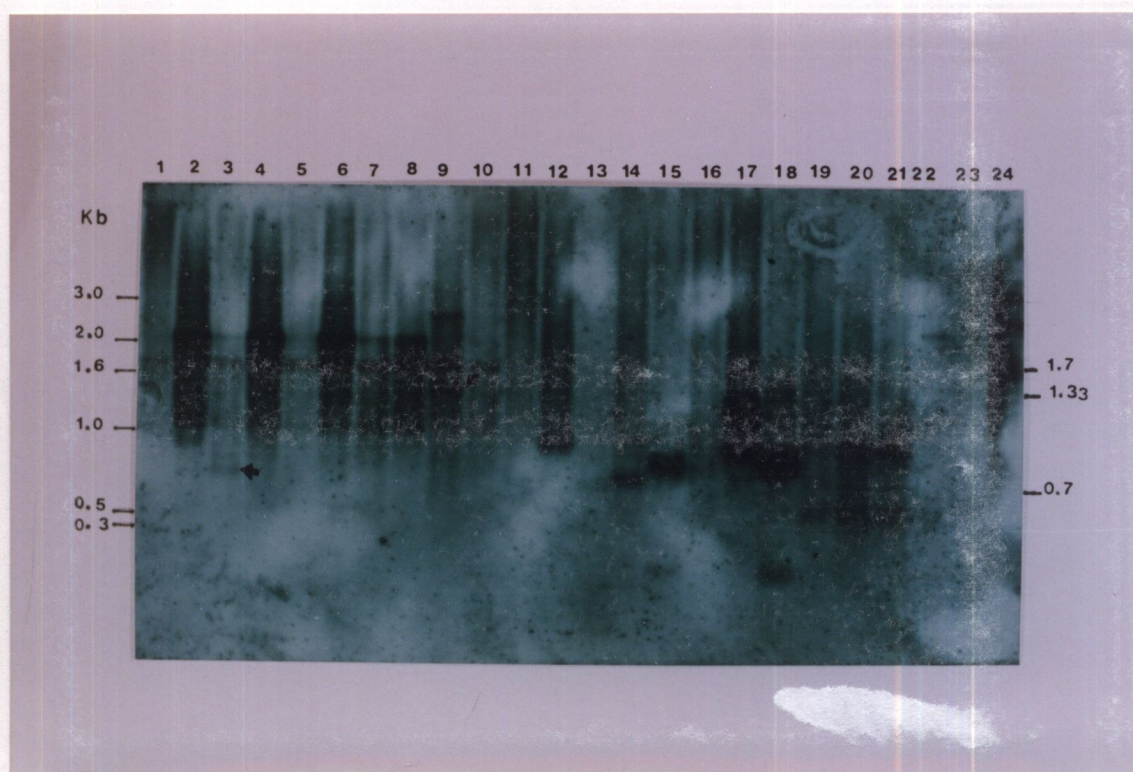
จากการใช้ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอมาเป็นโพรบในการไฮบริไดเซชันกับผลผลิตของอาร์เอฟดีในแต่ละไพรเมอร์ โดยการเลือกใช้ไมโครแซทเทลไลต์โพรบที่เป็นชุดซ้ำของ 2, 3 และ 4 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 11 ชนิด ที่มีความยาวขนาด 20-21 นิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 4) พบว่าไมโครแซทเทลไลต์โพรบจำนวน 9 ชนิด สามารถไฮบริไดซ์กับผลผลิตของอาร์เอฟดีนี้ได้ จากนั้นทำการทดสอบหาคู่ของไพรเมอร์และไมโครแซทเทลไลต์โพรบที่เหมาะสมที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน ผลปรากฏทั้งสิ้น 10 คู่ คือ ไพรเมอร์ OPAA 10 - ไมโครแซทเทลไลต์โพรบ (TGG)₇, OPAA 17 - (AAG)₇, OPAD 05 - (TGG)₇, OPAD 05 - (TAT)₇, OPAD 05 - (TCC)₇, OPAD 06 - (GCC)₇, OPAD 08 - (CA)₁₀, OPAD 08 - (CT)₁₀, OPAD 09 - (AAG)₇, และ OPAD 12 - (AAC)₇ และเมื่อนำไปทำไฮบริไดเซชันแล้ว พบว่าสามารถเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) ได้ในแต่ละชนิด แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะมีขนาดอยู่ระหว่าง 0.2 ถึง 4.0 กิโลเบส จำนวนทั้งหมด 94 แถบ โดยที่ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของไมโครแซทเทลไลต์โพรบและผลผลิตของอาร์เอฟดีจากไพรเมอร์ต่าง ๆ เป็นสำคัญ

รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบภายในชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันในพืชสกุลมังคุด โดยมีพืชต่างสกุลเป็นตัวเปรียบเทียบ ดังแสดงในภาพที่ 8-17 คาดว่าสามารถใช้เป็นตัวแทนหรือเครื่องหมายทางโมเลกุล (genetic marker) ที่จำเพาะในพืชแต่ละตัวอย่างต่อไปได้

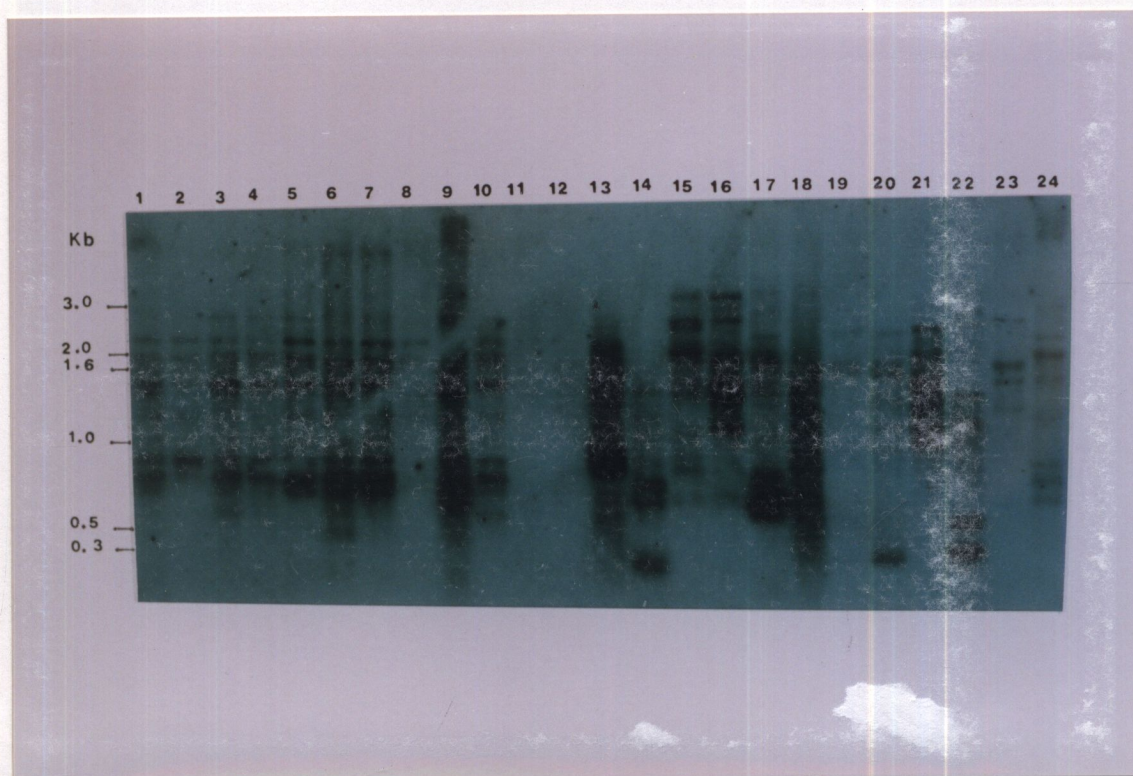
จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของมังคุด 11 ตัวอย่าง พบว่าให้ความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยมี 2 คู่ที่ให้ผลไม่แตกต่างกันในตัวอย่างมังคุด คือ คู่ไพรเมอร์ OPAD 08 - โพรบ (CT)₁₀ และคู่ไพรเมอร์ OPAD 12 - โพรบ (AAC)₇ ขณะที่คู่อื่นจะให้แถบที่ต่างกัน และโพรบบางคู่สามารถไฮบริไดซ์ได้แถบดีเอ็นเอเครื่องหมายสำหรับบางตัวอย่าง เช่น ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.59 กิโลเบส จากไพรเมอร์ OPAA 10 - โพรบ (TGG)₇ จะไม่พบในมังคุดตัวอย่างที่ 4 (ป่าหว่า) (ภาพที่ 8)



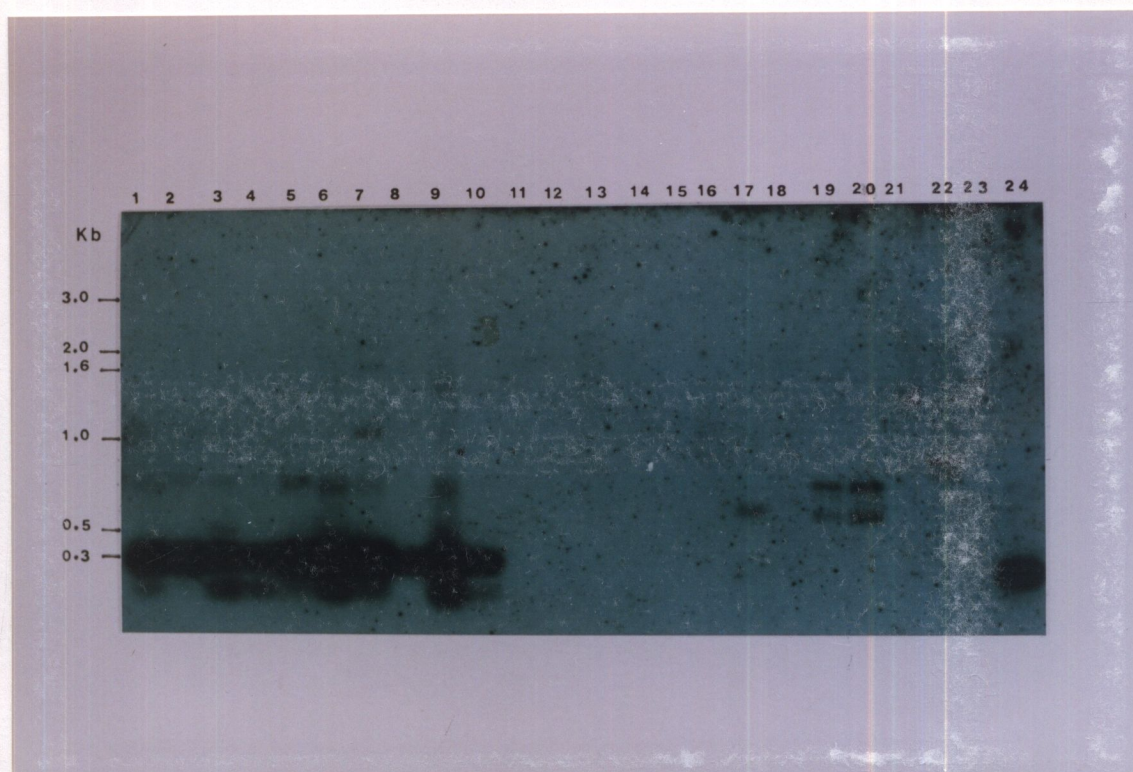
ภาพที่ 8 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีไอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จาก
 การทำไฮบริดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์
 OPAA 10 ด้วยไมโครเซทเทลไลท์โพรบ (TGG)₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน
 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส



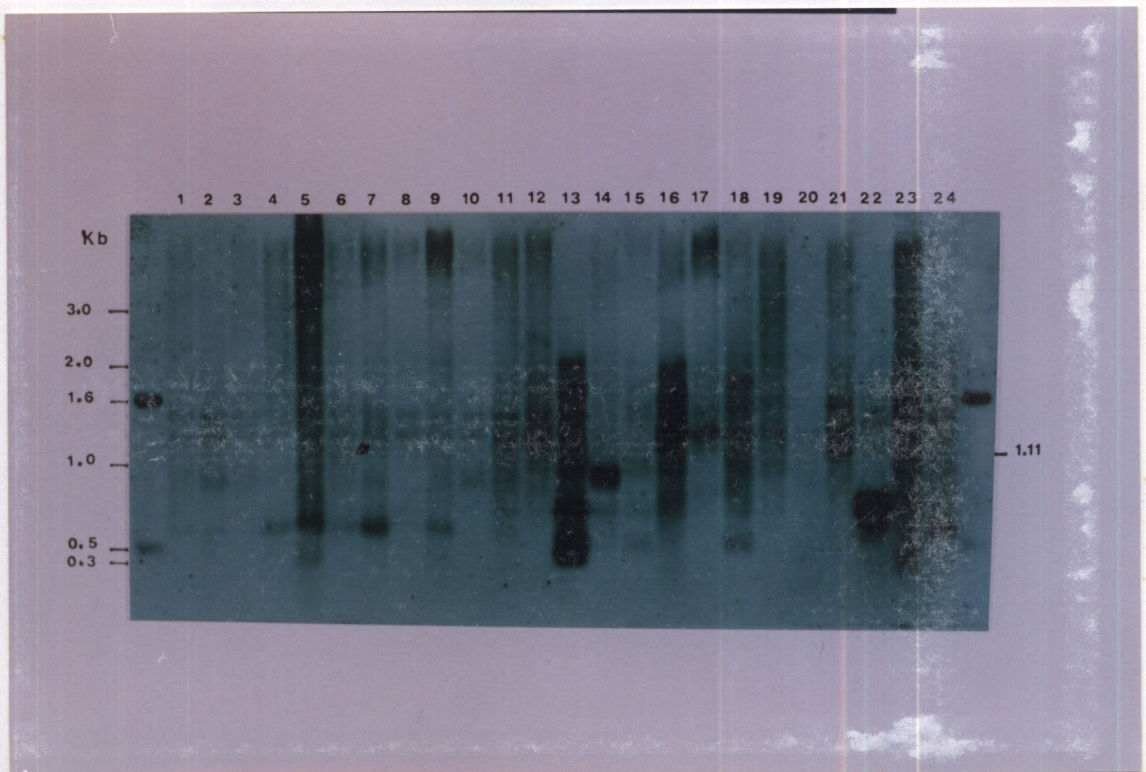
ภาพที่ 9 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จาก
 การทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์
 OPAA 17 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (AAG)₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน
 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส



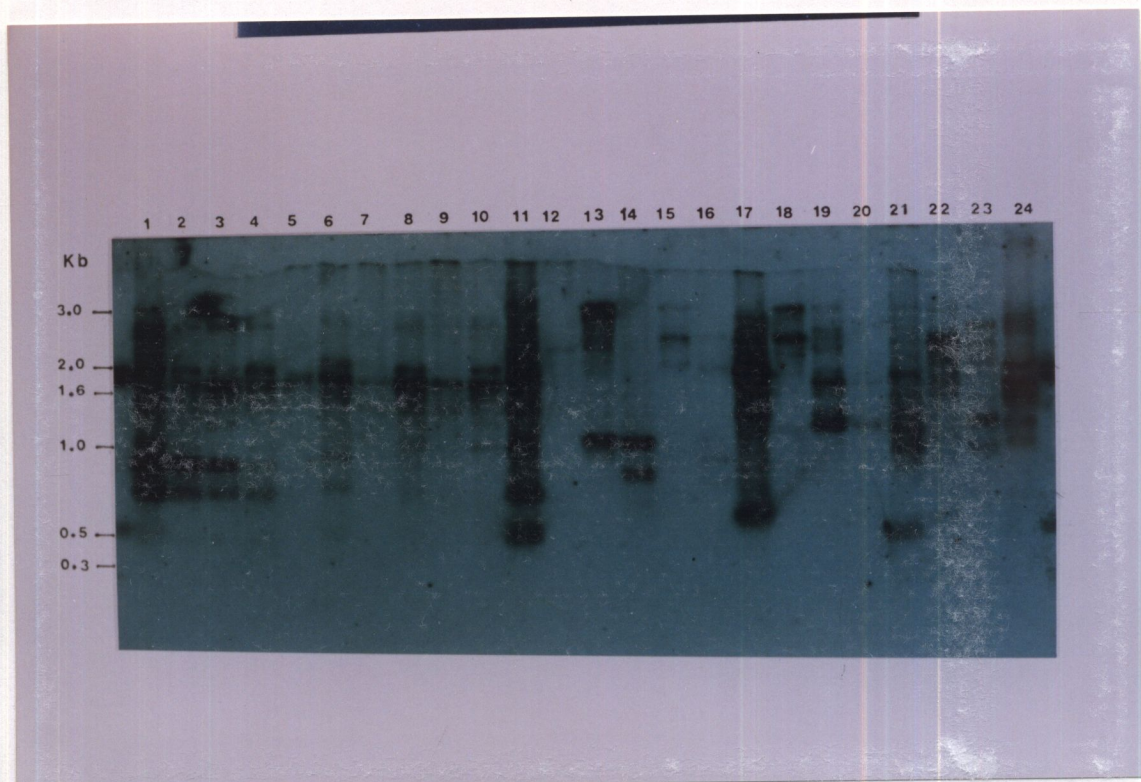
ภาพที่ 10 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 05 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (TGG)₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส



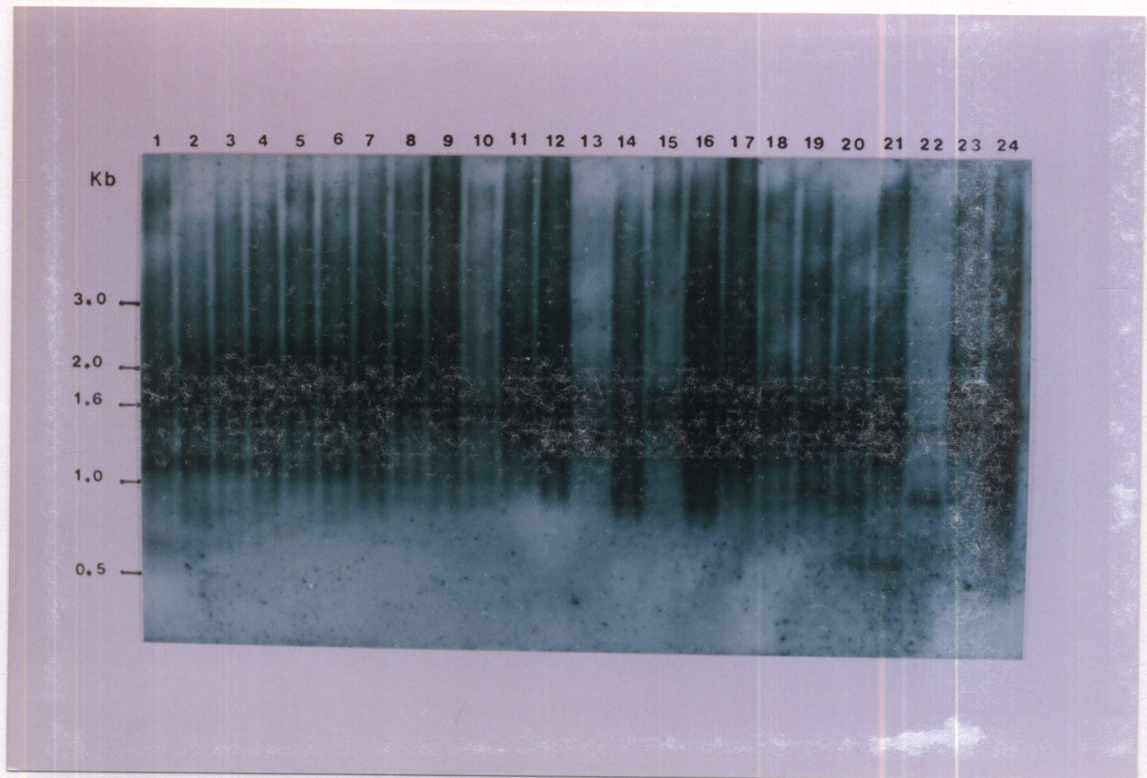
ภาพที่ 11 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 05 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (TAT)₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส



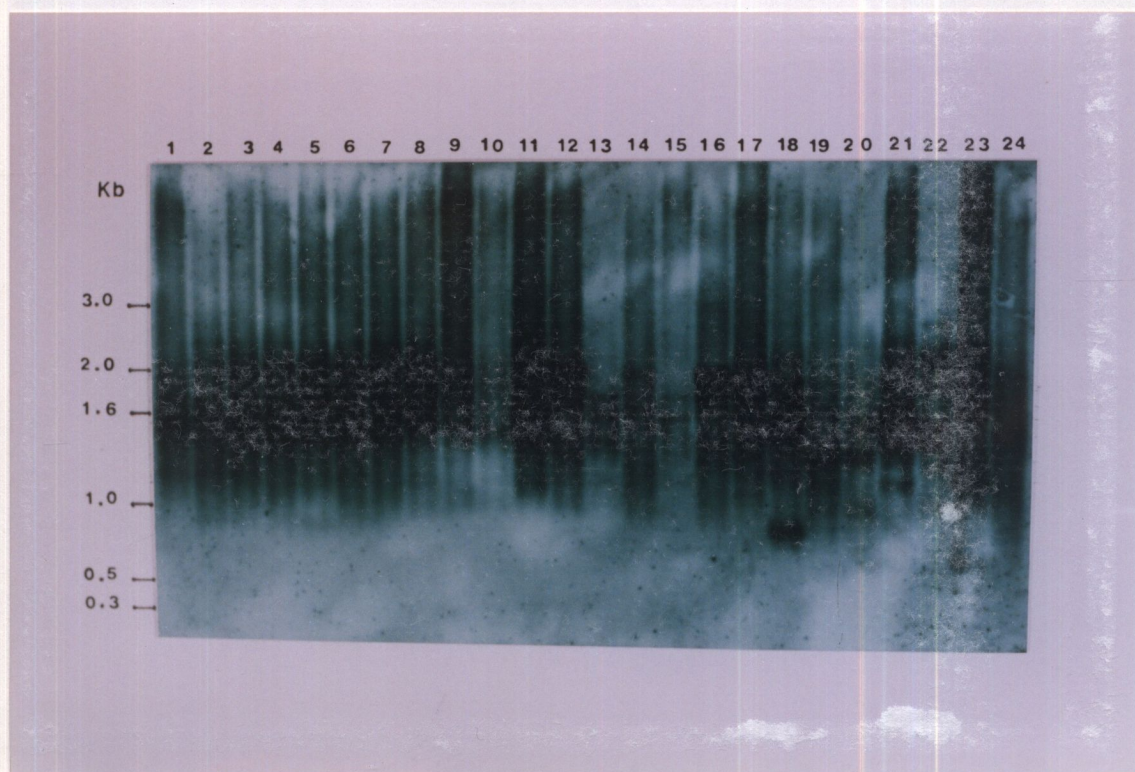
ภาพที่ 12 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 05 ด้วยไมโครแซทเทลไลต์โพรบ (TCC)₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส



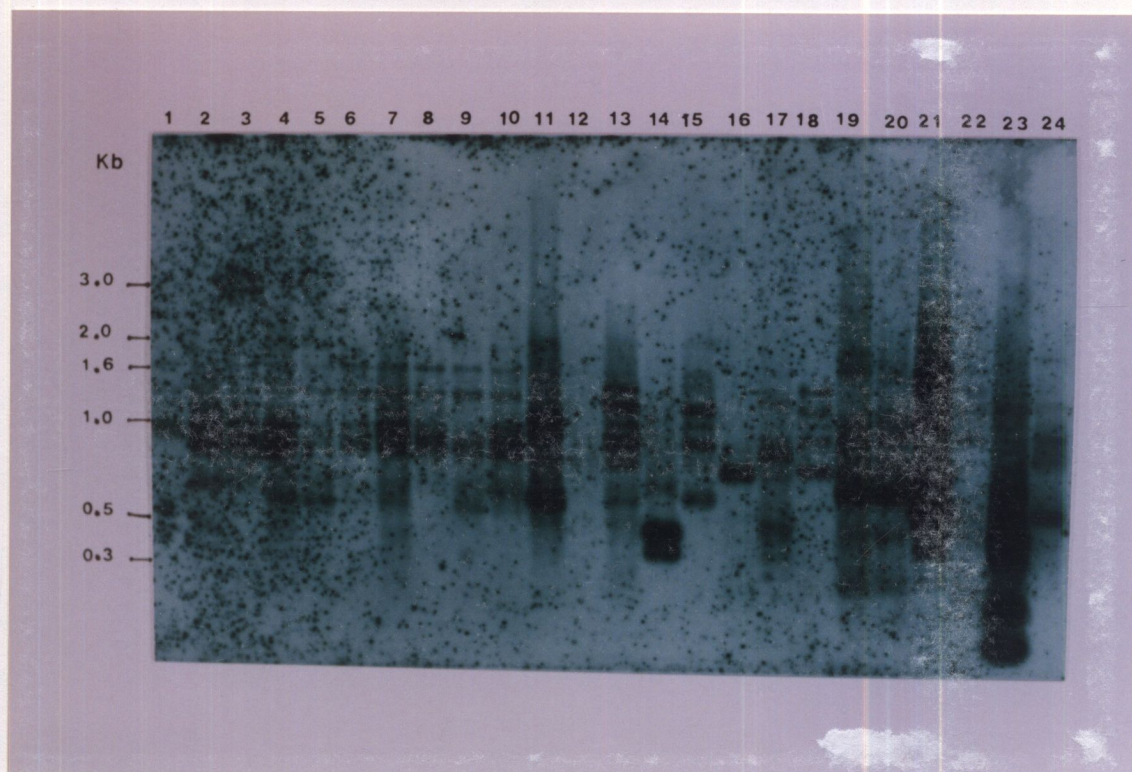
ภาพที่ 13 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 06 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (GCC)₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส



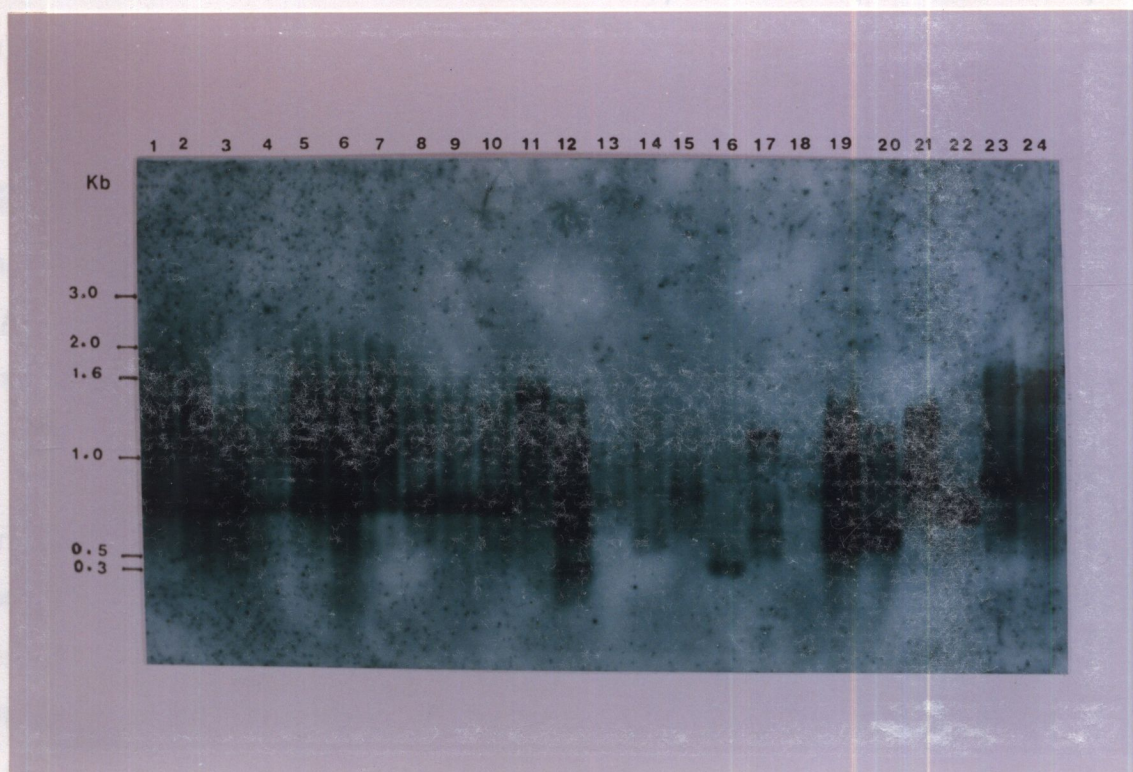
ภาพที่ 14 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 08 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (CA)₁₀ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส



ภาพที่ 15 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริดเซชันของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 08 ด้วยไมโครแซทเทลไลต์โพรบ (CT)₁₀ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบต



ภาพที่ 16 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริดเชชันของดีเอ็นที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ ไพรมเมอร์ OPAD 09 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โพรบ (AAG)₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส



ภาพที่ 17 ผลการวิเคราะห์อาร์เอเอ็มพีโอของพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเป็นผลที่ได้จากการทำไฮบริดเซชันของดีเอ็นที่เป็นผลผลิตจากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPAD 12 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ไพรบ (AAC)₇ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส

ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1.33 และ 0.7 กิโลเบส จากไพรเมอร์ OPAA 17 - โพรบ(AAG)₇ พบเฉพาะในมังคุด ตัวอย่างที่ 9 (ป่าแจ้ว) และ 2 (ประยูร) ตามลำดับ (ภาพที่ 9) ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1.11 กิโลเบส จากไพรเมอร์ OPAD 05 - (TCC)₇ พบเฉพาะมังคุดตัวอย่างที่ 6 (ทุ่งตะโก) (ภาพที่ 12) และขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1.18 กิโลเบส จากไพรเมอร์ OPAD 06 - โพรบ (GCC)₇ พบเฉพาะมังคุดตัวอย่างที่ 11 (มังคุดพวง) (ภาพที่13)

การแยกความแตกต่างระหว่างพืชในสกุลมังคุด จากการศึกษาแบบแผนของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPAA 10 - โพรบ (TGG)₇ พบว่าสามารถไฮบริไดซ์ได้ในทุกตัวอย่าง และแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างในเกือบทุกชนิดอย่างชัดเจน โดยมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างรง (G. hanburyi hook.f.) (ตัวอย่างที่ 19) และ G 1 (ตัวอย่างที่ 20) ไม่ทราบชนิด ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกัน (ภาพที่ 8)

แบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์ OPAA 17 - โพรบ (AAG)₇ พบว่าไม่สามารถไฮบริไดซ์ได้ในผลผลิตอาร์เอพีดีของมะพูด (G. dulcis Kurz) โดยคู่นี้จะพบแถบดีเอ็นเอที่คล้ายกันของตัวอย่างที่ 20 และตัวอย่างที่ 21 ที่ไม่ทราบชนิดทั้งคู่ แต่จากลักษณะภายนอกสองชนิดนี้ต่างกันมาก และสำหรับคู่นี้ยังพบแถบดีเอ็นเอที่น่าจะเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายได้ เช่น ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 2.0 และ 1.7 กิโลเบส พบเฉพาะในตัวอย่างมังคุด ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 0.92 กิโลเบส พบเฉพาะในมะดัน (G. schomburkiana Pierre) และขึ้นดีเอ็นเอขนาด 0.69 กิโลเบส พบเฉพาะในพะวา (G. speciosa Wall) (ภาพที่ 9)

แบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์ OPAD 05 - โพรบ(TGG)₇ พบว่าสามารถไฮบริไดซ์ได้ในทุกตัวอย่าง และแถบที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันในทุกชนิดอย่างชัดเจน และมีขึ้นดีเอ็นเอขนาด 0.9 กิโลเบส ที่ปรากฏเฉพาะในมังคุด (ภาพที่ 10)

แบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์ OPAD 05 - โพรบ (TAT)₇ พบว่าไม่สามารถไฮบริไดซ์ได้ในทุกตัวอย่าง เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอพบว่ารงและ G 1 ไม่ทราบชนิดมีแถบดีเอ็นเอที่คล้ายกัน และแถบดีเอ็นเอที่คาดว่าจะใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายได้ เช่น ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 0.63 กิโลเบส พบเฉพาะในนวล และขนาด 0.3 กิโลเบส พบในมังคุดเท่านั้น (ภาพที่ 11)

แบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ OPAD 05 - โพรบ (TCC)₇ พบว่าสามารถไฮบริไดซ์ได้ในทุกตัวอย่าง และจะให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน แต่มีที่คล้ายกันคือขนาด 100 bp และ 150 bp ไม่ทราบชนิด โดยที่ขนาดและรูปร่างมีลักษณะพื้นฐานวิยาที่แตกต่างกันมาก จะคล้ายกันก็คือดอกเกิดที่ซอกใบ (ภาพที่ 12)

แบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ OPAD 06 - โพรบ (GCC)₇ พบว่าสามารถไฮบริไดซ์ได้ในทุกตัวอย่าง และสามารถจำแนกสกุลมังกุดได้ทุกชนิดที่นำมาวิเคราะห์ (ภาพที่ 13)

แบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ OPAD 08 - โพรบ (CA)₁₀ พบว่าสามารถไฮบริไดซ์ได้ในทุกตัวอย่าง และมีแถบดีเอ็นเอที่คล้ายกัน 2 คู่ คือ มะพูดกับมะดัน ซึ่งลักษณะภายนอกแตกต่างกันมากไม่ว่าจะเป็นจำนวนดอกในช่อดอกเพศเมีย จำนวนช่องในรังไข่ และลักษณะเกสรเพศผู้ (ภาพที่ 14)

แบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ OPAD 08 - โพรบ (CT)₁₀ พบว่าสามารถไฮบริไดซ์ได้ในทุกตัวอย่าง และให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในเกือบทุกตัวอย่าง โดยที่หมักแปม (*G. garcilis* Pierre) และนวลมีแถบดีเอ็นเอที่คล้ายกัน (ภาพที่ 15)

แบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ OPAD 09 - โพรบ (AAG)₇ พบว่าสามารถไฮบริไดซ์ได้ในทุกตัวอย่าง และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันและบางชนิดมีแถบคล้ายกัน คือ ชันดีเอ็นเอ 1.6 กิโลเบส (ภาพที่ 16)

แบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ OPAD 12 - โพรบ (AAC)₇ พบว่าสามารถไฮบริไดซ์ได้ในทุกตัวอย่าง และที่มีแถบดีเอ็นเอคล้ายกัน 4 คู่ คือ มะพูดกับมะพูดป่าที่มียอดเกสรเพศเมียเป็นแฉกเหมือนกัน มะพูดกับมังกุดป่าที่มีกลีบเลี้ยง 4 กลีบและขนาดเท่ากันเหมือนกัน นวลกับ G 2 ไม่ทราบชนิด และ รงกับ G 1 ไม่ทราบชนิด (ภาพที่ 17)

จากความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละไมโครแซทเทลไลท์โพรบ กล่าวได้ว่าไมโครแซทเทลไลท์จัดเป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลที่สามารถนำมาใช้ในการหาความหลากหลายทาง

พันธุกรรมได้ Richardson และคณะ (1995) ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชในสกุลกลอย (*Dioscorea*) ด้วย อาร์เอเอ็มพีโอ พบความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดและทราบว่าผลที่ได้จากการใช้ไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอในการไฮบริไดเซชันนี้ให้ผลที่แตกต่างจากผลอาร์เอฟดี และจากเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอนี้ สามารถนำแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมาใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายได้ โดยที่ Cifarelli และคณะ (1995) ทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอจำเพาะที่ได้จากอาร์เอเอ็มพีโอและตรวจสอบอีกครั้งโดยการทำ Southern blot hybridization จากหัวผักกาดแดงที่ทำการศึกษา พบว่าบางพันธุ์ไม่สามารถตรวจสอบได้โดยใช้อาร์เอฟดี อย่างเดียวต้องทำการไฮบริไดเซชันร่วมด้วย

และสำหรับความสัมพันธ์ระหว่างสกุลนั้น พบว่าแถบดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์ที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ OPAA 10 - โพรบ (TGG)₇ ของสกุลกระทิงคล้ายกับมะดัน และยังพบแถบดีเอ็นเอที่เฉพาะในสกุลนี้ด้วย คือ ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.2 กิโลเบส จากคู่ไพรเมอร์ OPAA 17 - โพรบ (AAG)₇ ชิ้นดีเอ็นเอ 0.89 กิโลเบส จากคู่ไพรเมอร์ OPAD 05 - โพรบ (TAT)₇ และชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.66 กิโลเบส จากคู่ไพรเมอร์ OPAD 12 - โพรบ (AAC)₇ ส่วนสกุลสารภีมีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับสกุลนี้ คือ ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.82 กิโลเบส

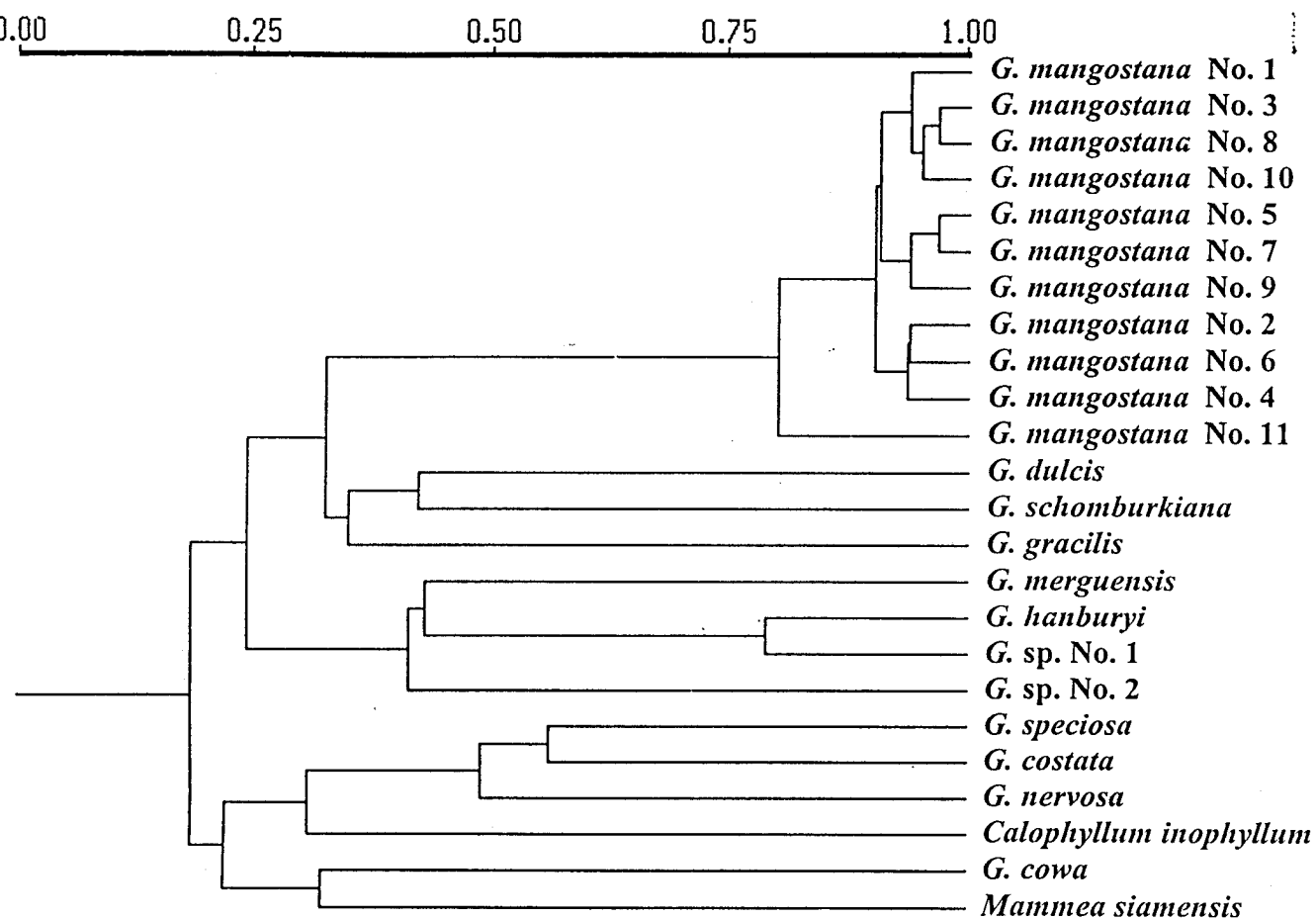
4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากผลของอาร์เอเอ็มพีโอด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

จากการนำข้อมูลของขนาดและจำนวนแถบของชิ้นดีเอ็นเอ ที่เป็นผลจากการไฮบริไดเซชัน ซึ่งมีทั้งหมด 94 ชิ้น มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Phylip โดยการกำหนดสัญลักษณ์เลข “1” กรณีที่พบแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ “0” กรณีที่ไม่มีแถบดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับผลของอาร์เอฟดี (ตารางผนวกที่ 7-16) แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างจากสัดส่วนของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน เพื่อคำนวณระดับความเหมือนและความแตกต่างของตัวอย่างที่ละคู่สลับกัน (Similarity Index) จนครบทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 6) จากนั้นนำค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบไปแสดงความสัมพันธ์เป็น Phylogenetic tree (ภาพที่ 18)

ผลการจัดจำแนกพืชในสกุลมังกุดจำนวน 12 ชนิด และพืชสกุลใกล้เคียง 2 ชนิด รวมทั้งสิ้น 24 ตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Phylip นั้น สามารถใช้แยกความแตกต่างของมังกุดได้เพียงเล็กน้อย โดยที่มังกุดทั้ง 11 ตัวอย่างถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและไม่สามารถ

ตารางที่ 6 แสดงค่า Similarity Index ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของแถบสีเอนของพืชทั้ง 24 ตัวอย่างจากเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	1.000																							
2	0.926	1.00																						
3	0.968	0.936	1.000																					
4	0.926	0.957	0.936	1.000																				
5	0.947	0.936	0.957	0.936	1.000																			
6	0.947	0.957	0.968	0.957	0.957	1.000																		
7	0.947	0.915	0.957	0.915	0.979	0.936	1.000																	
8	0.947	0.936	0.979	0.936	0.936	0.936	0.936	1.000																
9	0.926	0.915	0.936	0.936	0.957	0.936	0.957	0.915	1.000															
10	0.957	0.926	0.968	0.947	0.947	0.947	0.926	0.968	0.936	1.000														
11	0.628	0.660	0.660	0.681	0.660	0.638	0.638	0.681	0.617	0.681	1.000													
12	0.649	0.660	0.660	0.660	0.681	0.638	0.670	0.681	0.638	0.681	0.787	1.000												
13	0.500	0.511	0.512	0.532	0.532	0.512	0.512	0.532	0.489	0.532	0.702	0.723	1.000											
14	0.533	0.585	0.585	0.585	0.638	0.564	0.533	0.617	0.564	0.606	0.734	0.691	0.670	1.000										
15	0.521	0.533	0.533	0.574	0.574	0.532	0.533	0.574	0.532	0.574	0.745	0.681	0.766	0.755	1.000									
16	0.617	0.649	0.649	0.670	0.649	0.649	0.628	0.670	0.606	0.670	0.776	0.734	0.681	0.723	0.776	1.000								
17	0.606	0.585	0.638	0.596	0.628	0.596	0.638	0.660	0.596	0.638	0.723	0.702	0.617	0.734	0.702	0.755	1.000							
18	0.457	0.468	0.489	0.489	0.512	0.489	0.489	0.512	0.489	0.512	0.681	0.681	0.766	0.691	0.766	0.681	0.702	1.000						
19	0.542	0.512	0.532	0.489	0.532	0.479	0.532	0.532	0.489	0.532	0.660	0.638	0.574	0.648	0.617	0.585	0.723	0.574	1.000					
20	0.542	0.532	0.533	0.512	0.533	0.512	0.533	0.533	0.511	0.532	0.733	0.660	0.638	0.670	0.681	0.670	0.745	0.606	0.894	1.000				
21	0.532	0.533	0.574	0.564	0.564	0.533	0.574	0.596	0.532	0.574	0.745	0.617	0.617	0.713	0.660	0.734	723	0.660	0.681	0.723	1.000			
22	0.532	0.564	0.564	0.564	0.574	0.542	0.585	0.585	0.564	0.585	0.734	0.713	0.649	0.702	0.776	0.713	0.695	0.713	0.585	0.670	0.606	1.000		
23	0.574	0.542	0.542	0.574	0.533	0.521	0.532	0.574	0.521	0.574	0.723	0.691	0.723	0.776	0.713	0.670	0.695	0.660	0.660	0.681	0.670	0.670	1.000	
24	0.894	0.883	0.862	0.862	0.862	0.883	0.840	0.862	0.862	0.862	0.628	0.638	0.521	0.574	0.543	0.628	0.606	0.479	0.585	0.561	0.521	0.553	0.543	1.000



ภาพที่ 18 การจัดจำแนกตัวอย่างพืชในสกุล *Garcinia* และสกุลใกล้เคียงในลักษณะ

Phylogenetic tree จากผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอ

ตัวเลขในแถบบนแสดงสัดส่วนของความคล้ายคลึงกันของแต่ละตัวอย่าง

แยกกลุ่มของมังคุดนนท์ มังคุดจันทบุรี และมังคุดปักกิ่งได้ออกจากกันได้ แม้ว่าจะมีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันบ้างก็ตาม ซึ่งลักษณะเหล่านั้นอาจผันแปรตามสภาพแวดล้อมก็ได้ หรือมีการกระจายของต้นพันธุ์มังคุดปะปนกันจนไม่สามารถระบุแหล่งกำเนิดได้แน่นอน และไม่สามารถแยกความแตกต่างของมังคุด 2 ใบและ 3 ใบได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากลักษณะ 3 ใบนี้อาจไม่ได้ถ่ายทอดทางพันธุกรรม และปรากฏให้เห็นเพียงชั่วระยะเวลาใดเวลาหนึ่งเท่านั้น หากมีการทำลายยอดหรือจุดเจริญแล้วใบที่แตกออกมาใหม่ก็จะมีลักษณะ 2 ใบเหมือนเดิม ทำให้ลักษณะ 3 ใบนี้ปะปนกันไปจนไม่สามารถแยกได้เด็ดขาด และจากการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ใกล้กับมังคุดมากที่สุดน่าจะเป็นหมักแปม มะดัน และ มะพุด ซึ่งทั้ง 3 ชนิดก็จัดว่าอยู่ในกลุ่มเดียวกันด้วย

และจากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสกุลพบว่าสกุลกระทิงมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับมะพุดป่า มังคุดป่า และ พะวา และสกุลสารภีมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับชะมวง ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าพืชในสกุล *Garcinia* บางชนิดมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุลอื่นมากกว่าที่จะใกล้ชิดกับมังคุดที่อยู่ในสกุลเดียวกัน อาจเนื่องจากลักษณะภายนอกของมังคุดค่อนข้างจะแตกต่างจากทุกชนิดในสกุลเดียวกัน ไม่ว่าจะเป็นน้ำยางสีเหลืองและไม่มีเกสรเพศผู้ การติดผลเป็นแบบ apomixis และเมล็ดเป็นแบบ polyembryo โดยที่ 1 เมล็ดสามารถปลูกได้หลายต้น

5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากผลของอาร์เอพีดีร่วมกับอาร์เอเอ็มพีไอด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

เมื่อนำผลของอาร์เอพีดีและอาร์เอเอ็มพีไอมาวิเคราะห์รวมกัน โดยใช้โปรแกรม Phylip ได้ค่า similarity index ตามตารางที่ 7 และแสดงความสัมพันธ์ในรูป phylogenetic tree ดังภาพที่ 18 พบว่ามังคุดทั้ง 11 ตัวอย่างจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะภายนอกที่คล้ายกันมาก อาจแตกต่างบ้างก็เพียงมังคุดพวงที่ติดผล 2-3 ผล เพราะมังคุดทั่วไปจะติดผลเพียง 1 ผล แต่ก็จัดว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากในตัวอย่างของมังคุด จึงสมควรที่จะนำเทคนิคอื่น ๆ เข้ามาช่วยในการจำแนกพันธุ์มังคุดนี้ เช่น เทคนิคซีเอฟแอลพี (cleavage fragment length polymorphism : CFLP) หรือเทคนิคเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism : AFLP) ซึ่งจะมีรายละเอียดมากยิ่งขึ้นก็จะให้ผลที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น เช่นเดียวกับที่ Sharma และคณะ (1996) ศึกษาความหลากหลายและสายวิวัฒนาการของพืชสกุล *Lens* พบว่าเอเอฟแอลพีสามารถนำมาวิเคราะห์กับพืชสกุลนี้ได้และให้ผลสอดคล้องกับอาร์เอพีดี แต่จะให้ผลที่ชัดเจนกว่าอาร์เอพีดีและเทคนิคทางโมเลกุลอื่น ๆ และจาก

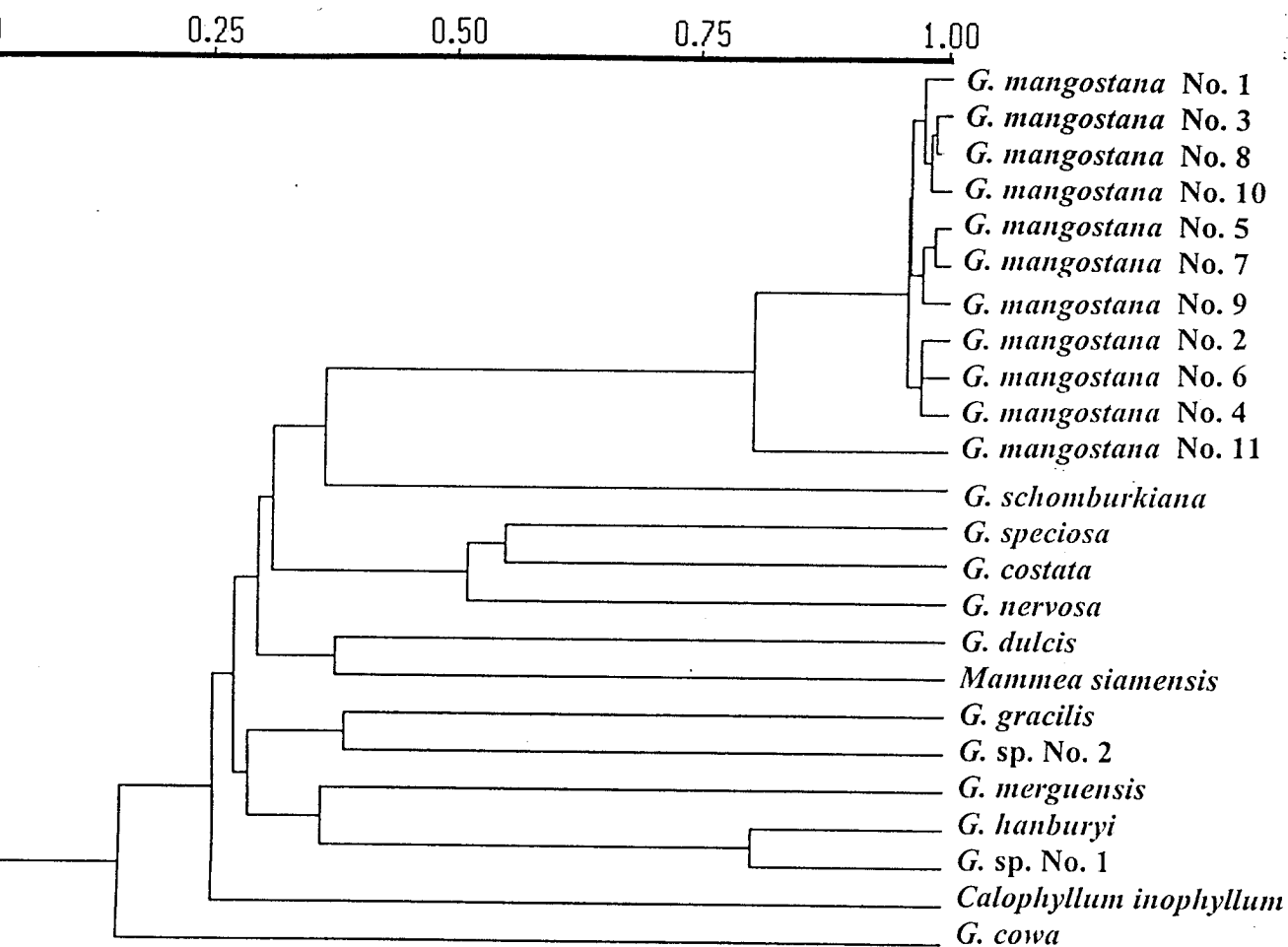
phylogenetic tree พบว่ามะดันมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับมังคุด ซึ่งจากลักษณะภายนอกแล้วพบว่าแตกต่างกันมาก คล้ายกันตรงที่ดอกเกิดที่ซอกใบเหมือนกัน

ความสัมพันธ์ระหว่างรงกับ G 1 ไม่ทราบชนิด จัดว่าใกล้เคียงกันมากโดยมีค่า similarity index เท่ากับ 0.896 ซึ่งจากการศึกษาทั้งอาร์เอพีดีและอาร์เอเอ็มพีไอก็ให้ผลสอดคล้องกันด้วย และความสัมพันธ์ระหว่างพะวา มังคุดป่า และมะพุดป่า ก็จัดว่าใกล้เคียงกัน โดยที่ทั้ง 3 ชนิดนี้มีลักษณะภายนอกที่คล้ายกันบ้างก็คือ กลีบเลี้ยงมีขนาดเท่ากันและเกสรเพศผู้ที่มีจำนวนมาก แต่ก็ยังมีข้อที่แตกต่างกันบ้างในเรื่องของจำนวนของกลีบเลี้ยงโดยที่มะพุดป่ามี 5 กลีบ พะวาและมังคุดป่ามี 4 กลีบ ส่วนลักษณะของเกสรเพศผู้นั้นต่างกันว่าพะวาเกสรเพศผู้จะแยกกันเป็นอิสระ ขณะที่มะพุดป่าและมังคุดป่าจะติดกันเป็นมัด 4-5 มัด

ความสัมพันธ์ระหว่างสกุลพบว่าพืชสกุลมังคุดทุกชนิดที่นำมาศึกษา ยกเว้นมังคุดจะมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสกุลกระทิงและสกุลสารภี จึงสามารถพบความแตกต่างได้ระหว่างสกุล โดย Weising และคณะ (1995) ศึกษาความแตกต่างของพืช 5 สกุล โดยใช้ไพรเมอร์ UBC352 และโพรบ (GT)₈ พบว่าสามารถเห็นความแตกต่างของพืชทุกตัวอย่างใน 5 สกุลนี้ได้ชัดเจน

ตารางที่ 7 แสดงค่า Similarity Index ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของแถบสีเอนของพืชทั้ง 24 ตัวอย่างจากเทคนิค
อาร์โอพีส์รวมกับเทคนิคอาร์เอ็นพีโอ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	1.000																							
2	0.965	1.000																						
3	0.985	0.970	1.000																					
4	0.965	0.980	0.970	1.000																				
5	0.975	0.970	0.980	0.970	1.000																			
6	0.975	0.980	0.985	0.980	0.980	1.000																		
7	0.675	0.960	0.980	0.960	0.990	0.970	1.000																	
8	0.675	0.970	0.990	0.970	0.970	0.970	0.970	1.000																
9	0.965	0.960	0.970	0.970	0.980	0.970	0.980	0.960	1.000															
10	0.980	0.965	0.985	0.975	0.975	0.975	0.965	0.985	0.970	1.000														
11	0.602	0.617	0.617	0.627	0.617	0.607	0.607	0.627	0.597	0.627	1.000													
12	0.602	0.607	0.607	0.607	0.617	0.597	0.612	0.617	0.597	0.617	0.682	1.000												
13	0.562	0.567	0.567	0.577	0.577	0.567	0.567	0.577	0.557	0.577	0.741	0.622	1.000											
14	0.552	0.567	0.567	0.567	0.572	0.557	0.552	0.582	0.557	0.577	0.642	0.687	0.657	1.000										
15	0.572	0.587	0.587	0.597	0.597	0.577	0.587	0.597	0.577	0.597	0.672	0.582	0.761	0.706	1.000									
16	0.602	0.617	0.617	0.627	0.617	0.612	0.607	0.607	0.597	0.627	0.692	0.682	0.667	0.766	0.692	1.000								
17	0.572	0.562	0.587	0.567	0.582	0.567	0.587	0.597	0.567	0.587	0.701	0.652	0.602	0.726	0.642	0.711	1.000							
18	0.542	0.547	0.557	0.557	0.567	0.557	0.557	0.567	0.557	0.567	0.642	0.602	0.751	0.647	0.721	0.637	0.632	1.000						
19	0.542	0.527	0.537	0.517	0.537	0.512	0.537	0.537	0.517	0.537	0.597	0.582	0.562	0.647	0.562	0.592	0.662	0.572	1.000					
20	0.538	0.532	0.542	0.522	0.542	0.522	0.542	0.542	0.532	0.532	0.637	0.607	0.597	0.692	0.607	0.647	0.677	0.582	0.896	1.000				
21	0.542	0.552	0.562	0.557	0.557	0.552	0.562	0.572	0.542	0.562	0.706	0.667	0.597	0.682	0.567	0.726	0.686	0.587	0.627	0.627	1.000			
22	0.547	0.562	0.562	0.562	0.567	0.552	0.572	0.572	0.562	0.572	0.686	0.627	0.602	0.672	0.647	0.672	0.627	0.637	0.597	0.657	0.577	1.000		
23	0.53	0.517	0.517	0.532	0.522	0.507	0.512	0.532	0.507	0.532	0.602	0.652	0.637	0.731	0.632	0.667	0.662	0.617	0.637	0.662	0.647	0.648	1.000	
24	0.876	0.871	0.561	0.861	0.861	0.871	0.856	0.861	0.861	0.861	0.627	0.652	0.587	0.612	0.587	0.642	0.597	0.567	0.572	0.582	0.562	0.587	0.572	1.000



ภาพที่ 19 การจำแนกตัวอย่างพืชในสกุลมังคุดและสกุลใกล้เคียงในลักษณะ Phylogenetic tree โดยใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคอาร์เอเอ็มพีไอ ตัวเลขในแถบบนแสดงสัดส่วนของความคล้ายคลึงกันของแต่ละตัวอย่าง

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานุกรมวิธานและหาวิวัฒนาการของพืชในสกุลมังคุดจำนวน 12 ชนิด โดยรวมมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) จำนวน 11 ตัวอย่างและพืชสกุลใกล้เคียงอีก 2 ชนิด เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ รวมทั้งสิ้น 24 ตัวอย่าง โดยเตรียมดีเอ็นเอจากใบอ่อนด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Agrawal และคณะ (1992) นับว่าให้ผลดีสำหรับพืชที่มีใบหนาและมียาง โดยได้ดีเอ็นเอปริมาณมากและมีคุณภาพค่อนข้างดี แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอ ผลการศึกษาโดยเทคนิคอาร์เอพีดีใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม จำนวน 12 ชนิด ให้ชิ้นดีเอ็นเอจำนวน 107 แถบ จากแบบแผนของดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์เหล่านี้สามารถใช้ในการจำแนกชนิดภายในพืชสกุลมังคุดได้ และสามารถจำแนกระหว่างสกุลได้ผลชัดเจนด้วย แต่ภายในชนิดเดียวกัน คือ ตัวอย่างมังคุดทั้ง 10 ตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกัน (monomorphism) ยกเว้นมังคุดพวงที่ให้ผลแตกต่างเพียงเล็กน้อย และเมื่อนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Phylip สร้างแผนภูมิและลำดับความสัมพันธ์ของทั้ง 24 ตัวอย่างในรูปของ Phylogenetic tree โดยสามารถแยกกลุ่มของมังคุดออกมาจากพืชชนิดอื่นได้อย่างชัดเจน และพบว่าพืชในสกุล *Garcinia* ที่นำมาศึกษาบางชนิด จะมีความใกล้เคียงกับพืชสกุลอื่นมากกว่าที่จะใกล้เคียงกับพืชในสกุลเดียวกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากพืชนั้นยังพบดอกที่สมบูรณ์เพศอยู่บ้าง ไม่ได้แยกเป็นเพศเดี่ยวแบบสมบูรณ์ ขณะที่มังคุดนั้นมีดอกแยกเป็นเพศเดี่ยวโดยสมบูรณ์ และแทบไม่พบดอกที่เป็นเพศผู้ด้วย (Whitmore, 1973)

การตรวจสอบหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะของพืชสกุลมังคุด บางชนิด พบว่าอาร์เอพีดีสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะที่ใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายได้ เช่น ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.76 กิโลเบสจากไพรเมอร์ OPAD 10 สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายสำหรับมังคุดได้ และชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.82 กิโลเบสจากไพรเมอร์ OPAD 10 สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายสำหรับนวลได้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดต่อไป

จากนั้นเมื่อมีการนำเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอเข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ โดยการใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นโพรบในการไฮบริดเชชันกับผลผลิตของอาร์เอพีดี โดยไมโครแซทเทลไลท์โพรบที่สามารถใช้ได้เป็นชุดซ้ำของ 2 และ 3 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 8 ชนิด แล้วทำการจับคู่

ที่เหมาะสมระหว่างไพรเมอร์กับไมโครแซทเทลไลท์โพรบที่ให้ผลชัดเจนในการไฮบริไดเซชัน โดยมีทั้งหมด 10 คู่ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์จำนวนทั้งหมด 94 แถบ และพบว่าไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอบางชนิด ให้ผลที่แตกต่างกันในกลุ่มของตัวอย่างมังคุดที่ไม่สามารถหาความแตกต่างได้โดยเทคนิคอาร์เอฟดีเพียงอย่างเดียว และจากการใช้คู่ไพรเมอร์กับไมโครแซทเทลไลท์ พบว่าจำนวน 8 คู่สามารถพบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในมังคุดทั้ง 11 ตัวอย่างได้ แต่ผลจากเทคนิคอาร์เอฟดีพีไอ นั้นไม่สามารถแยกกลุ่มมังคุดนนท์ มังคุดจันทบุรี และมังคุดปักษ์ใต้ได้ และไม่สามารถหาความแตกต่างระหว่างมังคุดที่มีลักษณะ 3 ใบและ 2 ใบได้ ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิคที่จำเพาะกว่านี้เพื่อช่วยในการจำแนก

จากการศึกษาวิวัฒนาการจากอาร์เอฟดีพีไอ นี้ สามารถหาความแตกต่างของพืชภายในชนิดเดียวกัน ระหว่างชนิด และระหว่างสกุลได้ โดยจะพบว่าพืชบางชนิดในสกุลมังคุด เช่น ชะมวง นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพืชต่างสกุลมากกว่าพืชในสกุลเดียวกัน โดยมีค่า similarity index เท่ากับ 0.78

จากอาร์เอฟดีพีไอ นี้สามารถพบแถบดีเอ็นเอที่คาดว่าจะเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายสำหรับพืชบางชนิดได้ โดยบางไมโครแซทเทลไลท์โพรบก็ให้แถบที่จำเพาะได้ เช่น โพรบ (AAG)₇ สามารถให้แถบที่จำเพาะได้ในมะดันและพะวา และในสกุลกระทิง (*Calophyllum*) โพรบ (TGG)₇ , โพรบ (TAT)₇ และโพรบ (CA)₁₀ พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะในมังคุด และ โพรบ (TAT)₇ ยังมีแถบที่เฉพาะในนวล ส่วนพืชสกุลสารภี (*Mammea*) ก็พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะจากโพรบ (AAC)₇

เมื่อนำผลทั้งอาร์เอฟดีและอาร์เอฟดีพีไอมารวมกัน แล้วนำมาวิเคราะห์พบว่ามะดัน มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับมังคุดมากที่สุด และชะมวง (*G. cowa* Roxb.) มีความสัมพันธ์ห่างไกลกับมังคุดมากที่สุด และพืชสกุลมังคุด บางชนิด เช่น มะปูด (*G. dulcis* Kurz) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพืชในสกุลกระทิงมาก

เอกสารอ้างอิง

- กรมการค้าภายใน. 2530. รายงานการศึกษาเรื่องมังคุด. กองเศรษฐกิจการเกษตร, กรุงเทพฯ. 25 น.
- ชาติชาย พุฒย์รัตนกุล, ธนาภรณ์ ตั้งวิสุทธิจิต, รงนา โรจน์วิโรจน์, วสุ อมฤตสุทธิ และ
อนันชัย กิตติศรีณย์เลิศ. 2532. มังคุดเพื่อการส่งออก. ข่าวสารเกษตรศาสตร์ 34 : 62-63.
- ณพพร คำรังศิริ. 2526. พุทธอนุกรมวิธาน. สาขาพุทธศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยา-
ศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ. 754 น.
- เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์- ชื่อพื้นเมือง).
กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ. 379 น.
- ทวีศักดิ์ วัฒนกุล. 2532. มังคุด : ราจีนีแห่งผลไม้. วารสารราย 6 เดือนของธนาคารเพื่อการเกษตร
และสหกรณ์การเกษตร (เมษายน-กันยายน) : 29-52.
- นุรัชย์ สนธยานนท์. 2536. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยดูจากอาร์เอฟเอลพีและอาร์เอฟดี, น.18.28-18.42.
ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกล็ด และ สรวง อุดมวรรณ (ผู้รวบรวม). คู่มือปฏิบัติการวิจัย
เทคโนโลยีชีวภาพ, เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม, เล่ม II สมาคมเทคโนโลยี
ชีวภาพแห่งประเทศไทย โรงพิมพ์สารานุกรมฐานอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา,
นครปฐม.
- ปราโมช ร่วมสุข. 2532. มังคุด. เอกสารประกอบคำบรรยายวิชาไม้ผลเมืองร้อน สถาบันเทคโนโลยี
ราชมงคล, วิทยาเขตจันทบุรี. 21 น.
- นพรัตน์ บำรุงรักษ์. 2530. มังคุด : ไม้ผลที่ไม่กลายพันธุ์. รุสมิแล 10 : 45-49.
- แผนกพฤกษศาสตร์และสัตวศาสตร์. ม.ป.ป. ไม้ที่มีค่าทางเศรษฐกิจของไทย ตอนที่ 1. กองคั่นคว่ำ
กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ. 247 น.

มงคล แซ่หลิม. 2531. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการขยายพันธุ์มัจฉาด. วารสารสงขลานครินทร์ 10 : 13-17.

มงคล แซ่หลิม, สายัณห์ สดุดี, สมปอง เตชะโต, พิมพ์พรณ ต้นสกุล และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2533. การหาพันธุ์พืชที่เหมาะสมสำหรับทำต้นตอมัจฉาดเพื่อให้ขึ้นได้ในที่แห้งแล้งและความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำในภาคใต้. รายงานวิจัยภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์หาดใหญ่, สงขลา. 65 น.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกตุ. 2536. การวัดปริมาณและคุณภาพกรดนิวคลีอิก, น. 9.1-9.3. ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกตุ และ สรวง อุดมวรณัฏ (ผู้รวบรวม). คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ, เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม, เล่ม II สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย โรงพิมพ์สาธารณสุขมูลนิธิอาเซีย มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา, นครปฐม.

วิจารณ์ พานิช. 2533. ปฏิกริยาอุกโซ่โพลีเมอร์. สงขลานครินทร์เวชสาร 8 : 395-414.

วินิตชาญ รื่นใจชน. 2540. การใช้เทคนิคอาร์เอฟดีในการจัดจำแนกและตรวจหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมของพันธุ์หญ้าแฝกในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมศักดิ์ วรรณศิริ. 2532. มัจฉาด. ศูนย์ตำราเกษตรเพื่อชนบท. กลุ่มเกษตรสัญจรสวนมัจฉาด, กรุงเทพฯ. 63 น.

สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, สุนน มาสุรณ, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2538. การตรวจหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวในสกุล *Oryza* โดยเทคนิคอาร์เอฟดี. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.) 29 : 454-461.

สายัณห์ สดุดี และ มงคล แซ่หลิม. 2532. ผลของการทาบกิ่งที่มีต่อการเจริญเติบโตของมัจฉาด. วารสารสงขลานครินทร์ 11 : 129-134.

สายัณห์ สดุดี, มงคล แซ่หลิม และ สุภาณี ยงค์. 2535. ผลของการเสริมรากที่มีต่อการเจริญเติบโตของมัจฉาด. วารสารสงขลานครินทร์ 14 : 327-335.

ศุมน มาสุชน, สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และ

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2539. การตรวจสอบพันธุ์มั่งคุดโดยเทคนิคอาร์เอพีดี. รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2539, กรุงเทพฯ. 240 น.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2539. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 272 น.

_____. 2540. การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล, น. 57-82. ใน ชีระชัย รัตนันต์ (ผู้รวบรวม). การจำแนกพันธุ์พืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, กรุงเทพฯ.

Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Cheorospondias asillaris* leaves. Biotech. Biodiv. Lett. 2 : 19-24.

Amersham ® Life Science. 1993. ImageGene Random Primer Labelling and Detection Systems. Amersham Place, Buckinghamshire. 83 p.

Backer, C.A. and R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. 1963. Flora of Java (Spermatophyte only). Rijkusherbarium, Lenden. 648 p.

Beck, S. 1992. Nonradioactive detection of DNA using dioxetane chemiluminescence. Meth. Enzymol. 216 : 143-152.

Benemerito, A.N. 1936. The *Garcinia* of South China (Guttiferae). Lingnan Sci. J. 15 : 57-67.

Bierwerth, S., G. Kahl, F. Weigand and K. Weising. 1992. Oligonucleotide fingerprinting of plant and fungal genomes : a comparison of radioactive, colorigenic and chemiluminescent detection methods. Electrophoresis 13 : 115-120.

Brandis, D. 1978. Indian Tree. Perdiccal Experts Book Agency, Delhi. 767 p.

- Bronstein, I. and P. McGrath. 1989. Chemiluminescence lights up. *Nature* 338 : 599-600.
- Castiglione, S., G. Wang, G. Damiani, C. Bandi, S. Bisoffi and F. Sala. 1993. RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. *Theor. Appl. Genet.* 87 : 54-59.
- Caetano-Anolles, G., B.J. Bassam and P.M. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio-Technology* 9 : 553-557.
-
- _____. 1992. DNA fingerprinting : MAAPing out a RAPD redefinition ?. *Bio-Technology* 10 : 937.
- Cifarelli, R.A., M. Gallitelli and F. Cellini. 1995. Random amplified hybridization microsatellites (RAHM) : isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clone. *Nucl. Acids Res.* 23 : 3802-3803.
- Connolly, A.G., I.D. Godwin, M. Cooper and I.H. DeLacy. 1994. Interpretation of randomly amplified polymorphic DNA marker data for fingerprinting sweet potato (*Ipomoea batatas* L. genotypes). *Theor. Appl. Genet.* 93 : 1-5.
- Devos, K.M. and M.D. Gale. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84 : 567-572.
- During, K. 1991. Ultrasensitive chemiluminescent and colorigenic detection of DNA, RNA and proteins in plant molecular biology. *Anal. Biochem.* 196 : 433-438.
- Gupta, M., Y.S. Chyi, J. Romero-Severson and J.L. Owen. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89 : 998-1006.

- Hashmi, G., R. Huettel, R. Meyer, L. Krusberg and F. Hammerschlag. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Reports* 16 : 624-627.
- Ho, C.Y., S.J. McMaugh and A.N. Wilton. 1997. DNA amplification variation within cultivars of turf-type Couch grasses (*Cynodon* spp.). *Plant Cell Reports* 16 : 797-801.
- Hooker, J.D. 1872. The Flora of British India Part I. L. Reeve&co. 5, Henrietta Street, Covent Garden, London. 740 p.
- Inai, S., K. Ishikawa, O. Nunomura and H. Ikehashi. 1993. Genetic analysis of stunted growth by nuclear-cytoplasmic interaction in interspecific hybrids of *Capsicum* by using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 87 : 416-422.
- Iqbal, M.J., N. Aziz, N.A. Saeed and Y. Zafar. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 94 : 139-144.
- Jeffrey, A.J., V. Wilson and S.L. Thein. 1985. Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature* 316 : 76-79
- Kersulyte, D., J.P. Woods, E.J. Kath and W.E. Goldman. 1992. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.* 174 : 7075-7079.
- Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharske and P. Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83 : 108-114.
- Koller, B., A. Lehmann, J.M. McDermott and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85 : 901-904.

- Kurz, S. 1974. Forest Flora of British Burma. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, New Connaught Place, Dehra Dun. 220 p.
- Lanham, P.G., R.M. Brennan, C. Hackett and R.J. McNicol. 1995. RAPD fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars. Theor. Appl. Genet. 90 : 166-172.
- Lecomte, M.H. 1912. Flore Generale de L'Indo-Chine. Masson et C^{ie}, Editeurs, Paris. 1450 p.
- Lifante, Z.D. and I. Aguinagalde. 1996. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the study of taxonomical relationships among species of *Asphodelus* sect. *Verinea* (Asphodelaceae). Amer. J. Bot. 83 : 949-953.
- Manulis, S., N. Kogan, M. Reuven and Y. Ben-Yephet. 1994. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Dianthi* from Canation. Amer. Phytopathol. Soc. 84 : 98-101.
- Meyer, W., E. Lieckfeldt, T. Kayser, P. Nurnberg, J.T. Epplen and T. Borner. 1992. Fingerprinting fungal genomes with phage M13 DNA and oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequence, pp. 241-253. In G. Kahl, H. Appelhans, J. Kompf and A.J. Driesel (eds.). DNA Polymorphisms in Eukaryotic Genomes, Biotech-Forum 10. Adv. Mol. Genet. 5. Huthig Verlag, Heidelberg.
- Meyer, W., E. Lieckfeldt, K. Kuhls, E.Z. Freedman, T. Borner and T.G. Mitchell. 1993. DNA- and PCR-fingerprinting (RAPD) in fungi, pp. 311-320. In S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen and A.J. Jeffreys (eds.). DNA fingerprinting : State of the Science. Birkhauser, Basel.
- Naik, K.C. 1947. South Indian Fruits and Their Culture. P. Varadachary Co., Madras. 477 p.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 5269-5273.

- Nelson, C.D., W.L. Nance and R.L. Doudrick. 1993. A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNAs. Theor. Appl. Genet. 87 : 145-151.
- Neuhaus-Url, G. and G. Neuhaus. 1993. The use of radioactive digoxigenin chemiluminescent technology for plant genomic Southern blot hybridization : a comparison with radioactivity. Transgenic Res. 2 : 115-120.
- Nybom, H. 1991. Applications of DNA fingerprinting in plant breeding, pp. 294-311. In T. Burke, G. Döf, A.J. Jeffreys and R. Wolff (eds.). DNA Fingerprinting : Approaches and Application. Birkhauser, Basel.
- _____. 1993. Applications of DNA fingerprinting in plant population studies, pp. 293-309. In S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen and A.J. Jeffreys (eds.). DNA fingerprinting : State of the Science. Birkhauser, Basel.
- Nybom, H., S.H. Rogstad and B.A. Schaal. 1990. Genetic variation detected by use of M13 "DNA fingerprint" probe in *Malus*, *Prunus* and *Rubus* (Rosaceae). Theor. Appl. Genet. 79 : 153-156.
- Nybom, H. and H.K. Hall. 1991. Minisatellite DNA 'fingerprints' can distinguish *Rubus* cultivars and estimate their degree of relatedness. Euphytica 53:107-114.
- Ramser, J., K. Weising, V. Chikaleke and G. Kahl. 1997. Increased informativeness of RAPD analysis by detection of microsatellite motifs. Biotechniques 23 : 285-290.
- Richardson, T., S. Cato, J. Ramser, G. Kahl and K. Weising. 1995. Hybridization of microsatellite to RAPD : a new source of polymorphic marker. Nucl. Acids Res. 23 : 3798-3799.
- Ridley, H.N. 1922. The Flora of The Malay Peninsula Vol. I-Polypetalae. L. Reeve & co. 6, Henrietta Street, Covent Garden, London. 918 p.

- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning : a Laboratory Manual. 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, New York. 540 p.
- Schnell, R.J., C.M. Ronning and R.J. Knight, Jr. 1995. Identification of cultivars and varidation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD marker. Theor. Appl. Genet. 90 : 269-274.
- Sharma, S.K., I.K. Dawson and R. Waugh. 1995. Relationship among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 91 : 647-654.
- Sharma, S.K., M.R. Knox and T.H.N. Ellis. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 93 : 751-758.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. J. mol. Biol. 98 : 503-517.
- Stiles, J.I., C. Lemme, S. Sondur, M.B. Morshidi and R. Manshardi. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. Theor. Appl. Genet. 85 : 697-701.
- Sun, G., B. Salomon and R. Bothmer. 1997. Analysis of tetraploid *Elymus* species using wheat microsatellite markers and RAPD markers. Genome 40 : 806-814.
- Swoboda, I. and P.L. Bhalla. 1997. RAPD analysis of genetic variation in the Australian fan flower, *Scaevola*. Genome 40 : 600-606.
- Thormann, C.E., M.E. Ferreira, L.E.A. Camargo, J.G. Tivang and T.C. Osborn. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. Theor. Appl. Genet. 88 : 973-980.
- Tinker, N.A., M.G. Fortin and D.E. Mather. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships insping barley. Theor. Appl. Genet. 85 : 976-984.

- Weising, K., F. Weigand, A.J. Driesel, G. Kahl, H. Zischler and J.T. Epplen. 1989. Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genomes. *Nucl. Acids Res.* 17 : 10128.
- Weising, K., J. Ramser, D. Kaemmer, G. Kahl and J.T. Epplen. 1991. Oligonucleotide fingerprinting in plants and fungi, pp. 313-329. *In* T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys and R. Wolff (eds.). *DNA fingerprinting : Approaches and Application*. Birkhauser, Basel.
- Weising, K., D. Kaemmer, J. Ramser, S. Bierwerth and G. Kahl. 1992. Plant DNA fingerprinting with simple repetitive oligonucleotides, pp. 135-156. *In* G. Kahl, H. Appelhans, J. Kompf and A.J. Driesel (eds.). *DNA polymorphisms in Eukaryotic Genomes*, Biotech-Forum 10. *Adv. Mol. Genet.* 5, Huthig Verlag, Heidelberg.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer. 1995a. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press, Boca Raton. 322 p.
- Weising, K., R.G. Atkinson and R.C. Gardner. 1995b. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR : a critical evaluation. *PCR Meth. Appl.* 4 : 249-255.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18 : 7213-7218.
- Wetton, J.H., R.E. Carter, D.T. Parkin and D. Walters. 1987. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature* 327 : 147-149.
- Whitemore, T.C. 1973. *Tree Flora of Malaya*. Forest Department, Ministry of Primary Industries, Malaysia. 444 p.
- William, G.K., A.R. Kubelik, K.L. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18 : 6531-6535.

- Yang, X. and C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 86 : 205-212.
- Yamamoto, T., A. Nishikawa and K. Oeda. 1994. DNA polymorphisms in *Oryza sativa* L. and *Lactuca sativa* L. amplified by arbitrary primed PCR. *Euphytica* 78 : 143-148.
- Yu, L.X. and H.T. Nguyen. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 87 : 668-672.
- Zhou, Z. and J.P. Gustafson. 1995. Genetic variation detected by DNA fingerprint with a rice minisatellite probe in *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 91 : 481-488.
- Zyskind, J.W. and S.L. Bernstein. 1992. *Recombinant DNA Laboratory Manual*. Acad. Press, Inc., California. 224 p.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ขนาดอนุ ต่อน้ำ (Kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
OPAD 01	1.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
1.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
1.6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1
1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
1.16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
1.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
0.92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0.77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPAD 04	2.3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
2.0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
1.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1.58	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1
1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
1.18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
1.1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
0.98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ขนาดของ ข้อมูล (Kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
OPAD 05	2.9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1.75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
	1.63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	1.58	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	1.45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
	0.94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	0.8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
OPAD 06	3.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
	2.8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	1.59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
	1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
	1.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	1.14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
	0.94	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ขนาดหน่วย ข้อมูล (Kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
OPAD 08																								
2.0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
1.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
1.72	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1
1.65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
1.43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1.3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
1.28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
1.23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
OPAD 09																								
2.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1.68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
1.55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
1.32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
1.23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
1.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
0.82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
0.76	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ขนาดหน่วย ข้อมูล (Kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
OPAD 10	1.58	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
	0.9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
	0.82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	0.76	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
	0.67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	0.58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
OPAD 11	1.8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
	1.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	1.38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	1.32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	1.27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	1.19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
	0.88	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	0.92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
	0.67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ 2 แสดงผลการไฮบริดเซชันผลผลิตอาร์เอสดีจากไพรเมอร์ OPA 10 ด้วยไมโครแซทเทลไลต์ไพรบ (TGG)₇ (1) และผลการไฮบริดเซชันผลผลิตอาร์เอสดีจากไพรเมอร์ OPA 17 ด้วยไมโครแซทเทลไลต์ไพรบ (AAG)₇ (2) กับตัวอย่างพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยการทำหาคัดสัญลักษณ์เลข “1” กรณีที่มีแถบตีเอนเอ และกำหนดสัญลักษณ์เลข “0” กรณีที่ไม่มีแถบตีเอนเอ

ขนาดแถบ ดีเอ็นเอ (Kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
(1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
1.8	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
1.59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
1.53	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
1.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1
0.88	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
0.62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
(2)	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3.0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2.0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1.7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1.33	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
1.0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.83	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
0.79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
0.71	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0

ตารางผนวกที่ 4 แสดงผลการไฮบริดเคเซนชั้นผลผลิตอาร์เอพีติจากโปรแกรม OPAD 06 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โปรแกรม (TCC)₇ (1)และผลการไฮบริดเคเซนชั้นผลผลิตอาร์เอพีติจากโปรแกรม OPAD 06 ด้วยไมโครแซทเทลไลท์โปรแกรม (GCC)₇ (2) กับตัวอย่างพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยกำาหนดสัญลักษณ์เลข “ 1 ” กรณีที่มีแถบสีเ็นแ และกำาหนดสัญลักษณ์เลข “ 0 ” กรณีที่ไม่มีแถบสีเ็นแ

ขนาดแถบ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
สีเ็นแ (Kb)																								
(1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1.83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1.77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1.47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1.31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1.11	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
0.96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.65	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0.57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
(2)																								
2.91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
2.67	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
2.48	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
2.39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
2.22	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
2.0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1.86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
1.7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
1.18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
1.09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

ตารางผนวกที่ 5 แสดงผลการไฮบริดเคชันผลผลิตอาร์เอพีดีจากโปรแกรม OPAD 08 ด้วยโมโครแซทเทลไลท์พรีบ (CA)₁₀ (1)และผลการไฮบริดเคชันผลผลิตอาร์เอพีดีจากโปรแกรม OPAD 08 ด้วยโมโครแซทเทลไลท์พรีบ (CT)₁₀ (2) กับตัวอย่างพืชทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยการทำหนดสัญลักษณ์เลข “ 1 ” กรณีที่มีแถบคีนเมอ และกำหนดสัญลักษณ์เลข “ 0 ” กรณีที่ไม่มีแถบคีนเมอ

ขนาดแถบคีนเมอ (Kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
(1)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
2.44	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
1.88	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
1.66	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1
1.46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0
1.11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0.96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
(2)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
1.93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
1.87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
1.73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
1.55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1.34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
1.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0

