



รายงานการวิจัย

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกัญชงในจังหวัดเพชรบูรณ์ด้วย
เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

Genetic diversity of Hemp in Phetchabun Province using
by RAPD marker

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2566

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกัญชงในจังหวัดเพชรบูรณ์ด้วย
เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

Genetic diversity of Hemp in Phetchabun Province using
by RAPD marker

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

สาขาวิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สุมาลี พิมพันธ์

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ทุนอุดหนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
ที่พิจารณาโดยผ่านความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566

(ก)

ชื่อโครงการวิจัย	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยงในจังหวัดเพชรบูรณ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี
ผู้วิจัย	สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง
ผู้ร่วมวิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิมพันธ์
สาขาวิชา	ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ 2566

บทคัดย่อ

กล้วยง เป็นไม้ล้มลุกมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายกล้วยา แต่มีลักษณะแตกต่างกัน มีต่อมน้ำมันของกล้วยงมีน้อยกว่าต้นกล้วยา ลักษณะคล้ายคลึงกับต้นกล้วยาในด้านลักษณะทางพฤกษศาสตร์เท่านั้น กล้วยง และ กล้วยา เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดมาจากพืชชนิดเดียวกัน การจำแนกความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาจึงทำได้ค่อนข้างยาก การใช้เครื่องหมายโมเลกุลจึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี จำแนกกล้วยงและกล้วยา 5 สายพันธุ์ 8 ตัวอย่าง โดยเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยไพรเมอร์ชนิด OPX1 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) ผลการวิเคราะห์ดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ในช่วง 1.00-7.00 จัดกลุ่มตาม SSR UPGMA dendrogram ได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ BLC-001 BLC-002 พันธุ์เมือง2 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พบพระ 1 พบพระ2 พันธุ์เมือง1 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ KU1 KU2 เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี สามารถจำแนกกล้วยงและกล้วยาได้ และสามารถพัฒนาเพื่อการปรับปรุงพันธุ์มีคุณภาพที่ดีต่อไป

คำสำคัญ : กล้วยง ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

Title Genetic diversity of Hemp in Phetchabun Province using by
RAPD marker

Author Surachest Aiumsumang.

Co- author Asst. Prof. Dr. Sumalee Phimphan

Department Biology program, Department of Science and Technology, Phetchabun
Rajabhat University.

Date 2023

ABSTRACT

Hemp is a herbaceous plant whose botanical characteristics are similar to Cannabis, but they are fewer hemp oil glands than the hemp plant. It resembles the Cannabis plant only in terms of its botanical characteristics. The plants that originate from the same plant. Morphological differentiation is therefore quite difficult. The use of molecular markers is therefore an effective method by using the molecular marker RAPD in identify five cannabis cultivars and eight samples for increasing the amount of DNA fragments by polymerase chain reaction with OPX1 type primers. The genetic associations were analyzed by unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA). The results of the genetic proximity index analysis of coffee were in the range of 1.00 -7.00. Grouped according to the SSR UPGMA dendrogram into 3 groups, 1 includes BLC-001, BLC-002 and Culture2, 2 includes Phop Phra 1, Phop Phra 2 and Culture1 and 3 includes KU1 and KU2. The Molecular marker RAPD can distinguish hemp and marijuana and can be further develop for good quality in breeding.

Keywords: Hemp, *Cannabis sativa* L., Genetic diversity, RAPD marker

กิตติกรรมประกาศ

(ค)

วิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือ ความกรุณา และคำปรึกษาจากบุคคลหลายฝ่าย ดังต่อไปนี้คือ ขอกราบขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่เอื้อเฟื้อวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรมและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง

1 กรกฎาคม 2566

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย

ก

บทคัดย่อ

ข

ภาษาอังกฤษ

ค

กิตติกรรมประกาศ

ง

สารบัญตาราง

ฉ

สารบัญภาพ

ช

บทที่ 1	บทนำ	
	1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
	4. ขอบเขตของการวิจัย	2
	5. ขอบเขตระยะเวลา	3
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	2.1 ข้อมูลทั่วไป	4
	2.2 การศึกษาพันธุกรรมในระดับโมเลกุล	5
	2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย	13
	3.1 การสกัดดีเอ็นเอ	13
	3.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ	14
	3.3 การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์	14
	3.4 การตรวจผลปฏิกิริยา PCR ด้วย Agarose gel	16
	3.5 การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล	16
	3.6 การสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram)	18

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 4	ผลการวิจัย
	19
4.1	การตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis
	19
4.2	การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ กัญชงและกัญชา
	20
4.3	การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
	20
4.4	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกัญชง และกัญชาจากเครื่องหมายโมเลกุล RAPD
	21
บทที่ 5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ
	23
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก	29
	ภาคผนวก ก.
	30
	ภาคผนวก ข.
	39
	ภาคผนวก ค.
	44
ประวัตินักวิจัย	46

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.1	ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบและความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายใน ปฏิกิริยาฟิชอาร์	15
ตารางที่ 3.2	ไพรมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรมอร์	16
ตารางที่ 4.1	ค่าดัชนีความเหมือนของกัญชงและกัญชาทั้ง 5 สายพันธุ์ 8 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์จากความต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีค่าอยู่ที่ ช่วง 1.0 – 7.0)	21
ตารางที่ ก2	ช่วงขนาดดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางที่เคลื่อนที่ ไปในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ	35

(ช)

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 4.1	แถบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอกัญชงและกัญชา	19
ภาพที่ 4.2	แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของกัญชงและกัญชาโดยใช้ไพรเมอร์ RAPD OPX1	20
ภาพที่ 4.3	แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของกัญชงและกัญชาทั้ง 5 สายพันธุ์ 8 ตัวอย่างจากการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม Dendrogram	22
ภาพที่ ข1	เครื่องควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Swift™ MaxPro Thermal Cycler)	40
ภาพที่ ข2	ชุดเครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ (UV Transilluminator, ยี่ห้อ UVP, รุ่น LLC Upland, cambridge, UK)	40
ภาพที่ ข3	เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Mupid-EXU® Gel Electrophoresis System)	41
ภาพที่ ข4	เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer, ยี่ห้อ SHIMADZU, รุ่น UV-1700)	41
ภาพที่ ข6	สารละลายต้นตอที่ใช้ในการเตรียม CTAB buffer ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB	42
ภาพที่ ข7	Agarose gel (Invitrogen™)	42
ภาพที่ ข8	DNA Marker หรือ DNA Ladder (VC 100bp Plus DNA Ladder, ViVaantis)	42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กัญชง เป็นไม้ล้มลุกมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายกัญชา แต่มีลักษณะแตกต่างกันคือ ต่อม้ำมันของกัญชงมีน้อยกว่าต้นกัญชา ลักษณะคล้ายคลึงกับต้นกัญชาในด้านลักษณะทางพฤกษศาสตร์เท่านั้น กัญชง และ กัญชา เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดมาจากพืชชนิดเดียวกัน โดยมีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่น ทางตอนใต้ของแคว้นไซบีเรีย ประเทศเปอร์เซีย แคว้นแคชเมียร์ของประเทศอินเดีย และในทางตอนเหนือของประเทศจีน ต้นกัญชง มีลำต้นสูงมากกว่า 2 เมตร ปล้องหรือข้อยาว แตกกิ่งก้านน้อยและแตกกิ่งไปในทิศทางเดียวกัน เปลือกเหนียวลอกง่าย ให้เส้นใยยาวคุณภาพสูง แผ่นใบเป็นสีเขียวอมเหลือง ใบมีแฉกประมาณ 7-9 แฉก เมื่อออกดอกจะมียางที่ช่อดอกไม่มาก เมล็ดมีขนาดใหญ่ และเป็นลายบ้าง ใบมีสาร tetrahydrocannabinol (THC) น้อยกว่า 0.3% แต่ที่สำคัญที่สุดคือ ในเมล็ดของกัญชงมีสารเคมีตัวหนึ่งเรียกว่า CBD (Cannabidiol) ซึ่งสารตัวนี้สามารถสกัดได้จากน้ำมันเมล็ดกัญชง มีประโยชน์ทางการแพทย์เป็นอย่างมาก ใช้รักษาอาการผิดปกติของเซลล์ในร่างกาย โรคพากินสัน โรคสมองเสื่อม อาการนอนไม่หลับ หรือแม้กระทั่งโรคมะเร็ง ซึ่งสาร CBD เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นบ่อเกิดของโรคมะเร็งได้ ปัจจุบันมีการสกัดน้ำมันเมล็ดกัญชงในรูปแบบของ CBD Oil ออกจำหน่ายกันอย่างแพร่หลาย

ปัจจุบันประเทศไทยมีการอนุญาตให้ปลูกกัญชง ซึ่งมีสายพันธุ์ที่ได้รับรองพันธุ์ เพียง 4 สายพันธุ์ คือ RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 เป็นสายพันธุ์ที่มีสาร THC ต่ำกว่า 0.3% (0.072-0.270%) และมีปริมาณ CBD เฉลี่ย 0.824% (0.594 – 1.100 %) อนุญาตปลูกได้ใน 6 จังหวัดทางภาคเหนือ ได้แก่ อำเภอมะนัง อำเภอแม่ริม อำเภอสะเมิง อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่, อำเภอเทิง อำเภอเวียงป่าเป้า อำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงราย, อำเภอนาหมื่น อำเภอสันติสุข อำเภอสองแคว จังหวัดน่าน, อำเภอพบพระ จังหวัดตาก อำเภอเมือง จังหวัดแม่ฮ่องสอน อำเภอหล่มเก่า อำเภอเขาค้อ และอำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งในส่วนของจังหวัดเพชรบูรณ์นี้ ได้มีการเริ่มทดลองเพาะปลูกโดยเกษตรกรและบริษัทเอกชนบางแห่ง แต่เนื่องจากสายพันธุ์ที่มีการเพาะปลูกยังมีข้อมูลที่ไม่แน่ชัดว่าเป็นสายพันธุ์ใด การวิเคราะห์ความถูกต้องของสายพันธุ์จึงจำเป็นต้องมีเครื่องมือในการช่วยวิเคราะห์เพื่อความถูกต้องของสายพันธุ์ ซึ่งวิธีหนึ่งที่เป็นที่นิยมในปัจจุบันคือการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี

เทคนิคอาร์เอฟดี (RAPD, randomly amplified polymorphic DNA) เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอ

ไทด์ จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งทำได้สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย และประหยัด โดยทั่วไปเทคนิคอาร์เอพีดีใช้อุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing) 35-42 องศาเซลเซียส และนอกจากนี้ยังมีเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - randomly amplified polymorphic DNA) ซึ่งได้ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์เป็น 46-62 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนมากขึ้น และมีประสิทธิภาพในการทำซ้ำสูงขึ้น (Anantala-bhochai et al., 2000)

การศึกษาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีความมุ่งหวังในการจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยในจังหวัดเพชรบูรณ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี เพื่อให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ของกล้วยได้อย่างชัดเจน ยังสามารถศึกษาถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกล้วยแต่ละสายพันธุ์ เพื่อเป็นการวางแผนในการปรับปรุงพันธุ์ ให้มีความสามารถในการผลิตสาระสำคัญได้ดียิ่งขึ้น เพื่อพัฒนาสายพันธุ์กล้วยให้มีประสิทธิภาพเชิงเศรษฐกิจในอนาคตอันใกล้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.1 จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กล้วยในจังหวัดเพชรบูรณ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

1.2 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสายพันธุ์กล้วย สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ถึงระดับโมเลกุล

2. เกิดการพัฒนาการผลิตพืชเศรษฐกิจเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและนำไปสู่การแข่งขัน และการพึ่งพาตนเอง

3. เผยแพร่ผลงานวิจัยซึ่งเป็นประโยชน์ด้านวิชาการและเป็นส่วนหนึ่งในการร่วมกันพัฒนาผลงานวิจัยให้มีความก้าวหน้ามากขึ้น

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. รวบรวมพันธุ์กล้วยในจังหวัดเพชรบูรณ์ จำนวน 5 สายพันธุ์

2. สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction ; PCR)

4. วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมจากความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

5. ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้เป็นตัวจำแนกพันธุ์กาแฟและเป็นตัวบ่งบอกเอกลักษณ์ของกัญชงสายพันธุ์นั้น ๆ

1.5 ขอบเขตระยะเวลา

ระยะเวลาในการทำงานวิจัย เริ่มทำการศึกษาตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2565 ถึง เดือน กันยายน พ.ศ. 2566

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไป

กัญชง หรือ เฮมพ์ (Hemp) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. subsp. *Sativa* จัดอยู่ในวงศ์กัญชา (CANNABACEAE) จัดเป็นพรรณไม้ล้มลุกที่มีอายุเพียงปีเดียว ลำต้นเป็นสี่เหลี่ยมตั้งตรง มีความสูงได้ประมาณ 1-6 เมตร มีลักษณะอวบน้ำเมื่อเป็นต้นกล้าและจะเริ่มมีการสร้างเนื้อไม้เมื่ออายุได้ประมาณ 2-3 สัปดาห์ การเจริญเติบโตของต้นจะช้าในช่วง 6 สัปดาห์แรก หลังจากนั้นจะเพิ่มความสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จนมีความสูงโดยเฉลี่ยประมาณ 3 เมตร มีรากเป็นระบบรากแก้วและมีรากแขนงเป็นจำนวนมาก การปลูกต้นกัญชงจะปลูกด้วยการใช้เมล็ด ซึ่งใช้เวลาออกประมาณ 8-14 วัน และสามารถเก็บเกี่ยวได้เมื่อต้นอายุ 3-4 เดือน กัญชงเป็นพืชที่มีแหล่งกำเนิดในเอเชียกลางและแพร่กระจายไปสู่เอเชียตะวันออก อินเดีย และในทวีปยุโรป ใบเป็นใบเดี่ยว ลักษณะของใบเป็นรูปฝ่ามือ แผ่นใบแก่แยกเป็นแฉกประมาณ 7-9 แฉก การเรียงตัวของใบค่อนข้างห่าง ขอบใบจักเป็นฟันเลื่อยและเว้าลึกจนถึงโคนใบปลายใบสอบและเรียวแหลม ก้านใบยาวประมาณ 2-7 เซนติเมตร เมื่อมีการสร้างดอกจำนวนแฉกของใบจะลดลงตามลำดับ ดอกกัญชง ออกดอกเป็นช่อตามซอกใบและปลายยอด ดอกมีขนาดเล็กสีขาว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-4 มิลลิเมตร ดอกเป็นแบบแยกเพศและอยู่ต่างต้นกัน (บางชนิดอยู่ต้นเดียวกัน แต่ที่พบปลูกในบ้านเราคือชนิดที่อยู่ต่างต้นกัน) โดยช่อดอกเพศผู้จะเป็นแบบ panicle ประกอบไปด้วยกลีบเลี้ยง 5 กลีบ แยกจากกันเป็นอิสระ มีสีเขียวอมเหลือง มีเกสรเพศผู้ 5 อัน มีระยะเวลาการบานประมาณ 2 เดือน (ภาพบน) ส่วนดอกเพศเมียจะเกิดตามซอกใบและปลายยอด ในบริเวณช่อดอกจะอัดกันแน่น ช่อดอกจะเป็นแบบ spike ประกอบไปด้วยกลีบเลี้ยงสีเขียวเข้มหุ้มรังไข่ไว้ภายใน stigma 2 อัน สีน้ำตาลแดง อายุของดอกค่อนข้างสั้นประมาณ 3-4 สัปดาห์ก็จะติดผล ผลเป็นเมล็ดแห้งสีเทา ลักษณะเป็นรูปไข่ ผิวเรียบเป็นมันและมีลายประสีน้ำตาล เมื่อแห้งจะเป็นสีเทา มีขนาดกว้างเฉลี่ยประมาณ 4.47 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 5.11 มิลลิเมตร และมีความหนาเฉลี่ยประมาณ 3.75 มิลลิเมตร ภายในเมล็ดมีอาหารสะสมจำพวกแป้งและไขมันอัดกันแน่น โดยมีน้ำมันถึง 29-34%, มีไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูง ประกอบไปด้วย linoleic acid 54-60%, linolenic acid 15-20%, oleic acid 11-13 %

ประเทศไทยมีสายพันธุ์กัญชงที่ได้รับรองพันธุ์ เพียงแค่ 4 สายพันธุ์ คือ RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 ซึ่งมีสาร THC ต่ำกว่า 0.3% (0.072- 0.270%) และมีปริมาณ CBD เฉลี่ย 0.824% (0.594 – 1.100 %) และมีเปอร์เซ็นต์เส้นใยเฉลี่ย 13.9 % (12.9 – 14.7 %) สามารถเจริญเติบโตและในพื้นที่สูงที่มีแตกต่างกันทั้ง 4 พันธุ์ได้รับการคัดเลือกพันธุ์ด้วยวิธีการคัดเลือกรวม (Mass selection) ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2554 มีลักษณะทั่วไปเหมือนกันคือมีดอกแยกเพศ ดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่คนละต้น

(Dioecious plant) รากเป็นระบบรากแก้ว มีกิ่งก้านมากเมื่อปลูกห่าง (1.0 x 1.0 เมตร) และมีจำนวนกิ่งลดลงเมื่อปลูกถี่ (0.1 x 0.1 เมตร) ใบเป็นใบเดี่ยวรูปฝ่ามือมีแฉกจำนวน 3-9 แฉก เป็นพืชขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดลักษณะเมล็ดเป็นรูปทรงรีคล้ายลูกรีบี้ ผิวของเมล็ดเรียบเป็นมัน มีลายประสีน้ำตาล และมีลักษณะเด่นของพันธุ์ ในเมล็ดของกัญชามีสารเคมีตัวหนึ่งเรียกว่า CBD (Cannabidiol) ซึ่งสารตัวนี้สามารถสกัดได้จากน้ำมันเมล็ดกัญชง มีประโยชน์ทางการแพทย์เป็นอย่างมาก ใช้รักษาอาการผิดปกติของเซลล์ในร่างกาย โรคพากินสัน โรคสมองเสื่อม อาการนอนไม่หลับ หรือแม้กระทั่งโรคมะเร็ง ซึ่งสาร CBD เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นบ่อเกิดของโรคมะเร็งได้อีกด้วย ซึ่งในปัจจุบันมีการสกัดน้ำมันเมล็ดกัญชงรูปแบบของ CBD Oil ออกจำหน่ายกันอย่างแพร่หลายแล้ว หากได้รับการส่งเสริมจากภาครัฐอย่างจริงจัง ประเทศไทยจะสามารถนำสารสกัด CBD มาเป็นส่วนผสมของอาหารทุกชนิดที่ขึ้นชื่ออยู่แล้ว ออกจำหน่ายไปทั่วโลก สร้างรายได้ให้กับประเทศได้อย่างมหาศาล องค์ประกอบสำคัญหลัก ๆ ที่พบในพืชตระกูลนี้ คือสารในกลุ่มคานนาบินอยด์ (Cannabinoids) โดยมีโครงสร้างหลักในรูปของเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) มีสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ ได้แก่ (δ -9-tetrahydrocannabinol หรือ Δ 9-THC) คานนาบิไดโอล (Cannabidiol, CBD) คานนาบินอล (Cannabinol, CBN) และอนุพันธ์ของคานนาบินอยด์รูปแบบอื่น ๆ นิยมใช้การตรวจวัด Δ 9-THC เป็นการตรวจเอกลักษณ์ (Identification) กัญชงแยกจากกัญชาได้ กัญชงและกัญชาจึงมีบางส่วนแตกต่างกันที่สำคัญคือ กัญชานั้นจะมีปริมาณสาร THC สูง (ประมาณ 1-10%) แต่กัญชงมีสาร THC ต่ำ เนื่องจากสาร THC เป็นสารที่มีฤทธิ์ต่อจิตประสาท (Psychoactive) กับตัวรับคาร์นาบินอยด์ชนิดที่ 1 (Cannabinoid receptor I, CB1) ในระบบประสาทส่วนกลาง ส่งผลแบบเฉียบพลัน ทำให้ร่างกายผ่อนคลายและมีความรู้สึกสนุก แต่มีอาการข้างเคียงต่อจิตประสาท กระวนกระวาย ซึมเศร้า มีความบกพร่องในความจำและการเรียนรู้ ตลอดจนการทำงานของระบบเคลื่อนไหว การพูดและการใช้ศัพท์ มีผลต่อการเต้นของหัวใจและความดันโลหิต ในขณะที่สาร CBD เมื่อเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางสามารถจับกับ CB1 ได้ไม่ค่อยดี (Non-psychoactive) พบว่า มีฤทธิ์ต้านการชัก ทำให้ง่วง และลดการกระวนกระวายได้

2.2 การศึกษาพันธุกรรมในระดับโมเลกุล

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการศึกษาและปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การจำแนกพันธุ์ปลูกพืช เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ปลูก การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ปลูก เพื่อการรวบรวมพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาคำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม การใช้ประโยชน์ทางด้านการศึกษา

ลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci; QTL) ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางพืชหลาย ๆ ประการ เช่น ผลผลิต และลักษณะการเจริญเติบโตของพืช โดยลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ที่ทำงานร่วมกัน การแสดงออกเช่นนี้สามารถจำแนกยีนแต่ละตัวที่ควบคุมอยู่ออกมาได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอมาช่วยในการทำแผนที่ ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนที่สนใจจนสามารถนำส่วนของยีนที่ต้องการออกมาได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers) คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือใน ออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละพันธุ์ปลูก มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี้เอง ที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ ๆ ได้ 2 ประเภท คือ

1. Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้เทคนิคไฮบริดเซชัน (hybridization) ตัวอย่างได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) (Tanksley *et al.*, 1989, McCouch and Tanksley, 1991, Kochert, G., 1994)

2. PCR-based marker เป็น เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวดีเอ็นเอ หรือ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction (PCR) technique) ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟพีดี (RAPD marker) (William *et al.*, 1990) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) (Vos *et al.*, 1995), และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (Microsatellite) หรือเอสเอสอาร์ (SSR marker) (Brown *et al.*, 1996, Powell *et al.*, 1996) เป็นวิธีที่ใช้ ดีเอ็นเอ ตรวจสอบ (DNA probe) ซึ่งเป็นชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ สายเดี่ยวขนาดเล็กที่ทราบลำดับเบสและทำการติดฉลากสารกัมมันตรังสีเพื่อใช้ในการติดตามผล นำมาทำปฏิกิริยากับ ดีเอ็นเอ ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจที่ถูกแยกเป็นเส้นเดี่ยวและถูกตัดย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) โดยอาศัยความสามารถของ ดีเอ็นเอ ตรวจสอบที่สามารถเข้าคู่หรือจับกับกับสาย ดีเอ็นเอ เป้าหมายตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (DNA hybridization) กันได้

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเป็นการศึกษาถึงกลไกไปถึงความแตกต่างในระดับของยีน ซึ่งทำหน้าที่เป็นส่วนควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายระดับดีเอ็นเอจึงได้นำมาใช้ในงานหลาย ๆ ด้าน เช่น การสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม (DNA fingerprint) การแยก

พันธุ์ปลูก (varietal identification) การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (Genetic mapping) การหาตำแหน่งของยีน (gene tagging) และการนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ การใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA

เทคนิค Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Cherm Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ที่มีความจำเพาะขึ้นในหลอดทดลองโดยทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ จากการทำปฏิกิริยาร่วมกันระหว่าง

1. เอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาย ดีเอ็นเอ
 2. ดีเอ็นเอ สายสั้น ๆ 2 สายหรือไพรเมอร์ (DNA primer) ที่ใช้เป็นจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ สายใหม่ เป็นตัวกำหนดขนาดของ ดีเอ็นเอที่ทำการสังเคราะห์
 3. นิวคลีโอไทด์อิสระ
 4. สายดีเอ็นเอ เป้าหมาย ภายในหลอดทดลอง
- ภายหลังการทำปฏิกิริยาจะได้สาย ดีเอ็นเอ ใหม่จำนวนมากที่ถูกกำหนดขนาดตามระยะห่างของไพรเมอร์ทั้ง 2 สายที่เข้าจับบนสายต้นแบบเมื่อเริ่มปฏิกิริยาสังเคราะห์

เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ ที่ได้รับการพัฒนามาจากเทคนิค PCR สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

- ก. ประเภทที่มี ไพรเมอร์ ชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific primer) เครื่องหมายชนิดนี้มีบริเวณจับบนสาย ดีเอ็นเอ ที่สนใจในตำแหน่งที่แน่นอน ได้แก่ sequence tagged site (STS) และ SSLP (simple sequence length polymorphism) หรือ microsatellite

- ข. ประเภทที่มี ไพรเมอร์ ชนิดที่ไม่จำเพาะเจาะจง (random primer) เครื่องหมายชนิดนี้สามารถจับกับสาย ดีเอ็นเอ ได้หลาย ๆ ตำแหน่ง ได้แก่ RAPDs (random amplified polymorphic DNAs) และ AFLP (amplified fragment length polymorphism)

ผลที่ได้จากการตรวจสอบคือ แถบดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นโดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอจะถูกกำหนดจากตำแหน่งที่ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์จับบนสายดีเอ็นเอจุดจับของไพรเมอร์บนสายดีเอ็นเอที่ต่างกันจึงทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน

หลักการของ PCR ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ สายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลาก ดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกันโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นแรกเรียกว่า denaturing เป็นการแยกสาย ดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95°C ขั้นที่สองเรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็น ดีเอ็นเอ สายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับ เบสเป็นคู่สมกับ ดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60°C และขั้นที่สามเรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบน ดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75°C เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรสที่ใช้ควรคงคุณสมบัติอยู่ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาจากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบสามารถเพิ่มปริมาณสาร ดีเอ็นเอได้ไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า

ปฏิกิริยา PCR จะเกิดในหลอดทดลองเล็ก ปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler (นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ สายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิต ดีเอ็นเอ ขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้ ตั้งโปรแกรมการทำงานได้ และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

ดีเอ็นเอ ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้น เพื่อตรวจหา ดีเอ็นเอ ผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหา ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยก ดีเอ็นเอ ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (agarose gel) โดยระยะทางที่ ดีเอ็นเอ สามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของ ดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอ ที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอัลตราไวโอเล็ตซึ่งจะเห็นแถบ ดีเอ็นเอ เรืองแสงบนแผ่นวุ้น

เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, Randomly Amplified Polymorphic DNA) เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งทำได้สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอ ปริมาณน้อย และประหยัด โดยทั่วไปเทคนิคอาร์เอพีดีใช้อุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing) 35-42 องศาเซลเซียส และนอกจากนี้ยังมีเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - randomly amplified polymorphic DNA) ซึ่งได้ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์เป็น 46-62 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนมากขึ้นและมีประสิทธิภาพในการทำซ้ำสูงขึ้น (Anantala-bhochai et al., 2000)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษางานวิจัยต่างๆ ที่ผ่านมา พบว่ามีผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี ดังนี้

Miano, T. F., & Rabbani, M. G. (2015) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่องความหลากหลายทางพันธุกรรมในกล้วยไม้ที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิกแบบสุ่ม (RAPD) โดยผลที่ได้รายงานว่าการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกล้วยไม้ 30 ชนิดโดยใช้ DNA Polymorphic DNA (RAPD) จากการสุ่มเลือกไพรเมอร์ 30 ตัว ที่คัดเลือกมา 6 ตัว ซึ่งทำให้มี 43 ขึ้น ที่ชัดเจนและสว่าง จากจำนวน 40 ขึ้น ถูกพิจารณาว่าเป็น polymorphic เปอร์เซ็นต์ของภาวะพหุสัณฐานในตัวอย่างทั้งหมดแตกต่างกันไปจาก 83.33 ถึง 100% (ค่าเฉลี่ย 92.75%) ภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) มีค่าสูงสุดในไพรเมอร์ OPA9, OPK19, OPU10 และ OPC17 ในขณะที่ค่าต่ำสุดใน OPW11 และ OPU8 ค่าเฉลี่ยของ 7.16 แถบต่อไพรเมอร์ จำนวนขอแถบต่อไพรเมอร์ คือ 5 - 8 ระยะห่างพันธุกรรมสูงสุด 0.78 พบว่าระหว่างสกุลเข็ม (Ascocentrum garayi) กับ สกุลหวายสีม่วงอมฟ้า (Dendrobium Kultana Blue) และ สกุลหวายสีขาว (Dendrobium Violate White) , PS - 26 กับ สกุลหวายรักตลิลิน (Dendrobium Red Bull), Mokara.Robin red กับ สกุลหวาย (Dendrobium Qasim Gold) , PS - 26 กับ สกุลเข็ม (Ascocentrum garayi) ในขณะที่ระยะห่างทางพันธุกรรมต่ำที่สุดถูกสังเกตระหว่าง

สกุลหวายสีขาว (*Dendrobium Violate White*) และ สกุลหวายสีม่วงอมฟ้า (*Dendrobium Kultana Blue*) วิธี UPGMA dendrogram ที่สร้างขึ้นจากการวิเคราะห์ RAPD ในกล้วยไม้ 30 ชนิด พบว่าถูกจัดกลุ่มใน 7 กลุ่มหลัก กลุ่ม 2 (Cluster II) เป็นวงกว้างซึ่งรวมถึงกล้วยไม้ 7 ชนิด และมีเพียงกล้วยไม้เดียวที่เกิดขึ้นกลุ่ม 3 การวิเคราะห์ RAPD มีศักยภาพสูงในการจำแนกสายพันธุ์ โดยสิ่งที่ผู้วิจัยนำมาจากเอกสารงานวิจัยนี้คือ เทคนิคพีซีอาร์ด้วยเครื่องหมายอาร์เอฟดี เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลของกล้วยไม้ป่า

เบญจวรรณ สิทธิเวช. (2557) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่องการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลฟาแลนนอปซิสด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี รายงานว่าการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิสของ *Phalaenopsis schilleriana*, *Phalaenopsis cornu-cervi* และลูกผสมระหว่าง *P. schilleriana* x *P. cornu - cervi* ด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี โดยลูกผสมที่ได้มีลักษณะของใบที่แตกต่างกัน 4 แบบ คือ แบบที่ 1 ใบอ่อนมีสีเขียว แบบที่ 2 ใบอ่อนมีจุดสีม่วง กระจาย แบบที่ 3 ใบอ่อนมีจุดสีม่วง กระจุกตัวเป็นแถบตามขวางของแผ่นใบ และแบบที่ 4 ใบอ่อนมีปื้นสีม่วง กระจายตัวทั่วแผ่นใบ เปรียบเทียบกับพ่อและแม่ โดยใช้ไพรเมอร์อาร์เอฟดี 80 ไพรเมอร์ พบว่ามี 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA 06, OPC 02, OPC 05, OPC 06, OPG 14 และ OPN 07 ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 76 แถบ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.19 ถึง 0.71 สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ ลูกผสมที่มีใบแบบที่ 1 ใบอ่อนมีสีเขียว และแบบที่ 4 ใบอ่อนมีปื้นสีม่วง กระจายตัวทั่วแผ่นใบ, กลุ่มที่ 2 คือ ลูกผสมที่มีใบแบบที่ 2 ใบอ่อนมีจุดสีม่วง กระจาย และแบบที่ 3 ใบอ่อนมีจุดสีม่วง กระจุกตัวเป็นแถบตามขวางของแผ่นใบ, กลุ่มที่ 3 คือ *P. cornu-cervi* และกลุ่มที่ 4 คือ *P. schilleriana* และการจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่และลูกผสมด้วยวิธี PCA ในกลุ่มลูกผสมแสดงถึงความใกล้ชิดกันในทุกกลุ่ม โดยลักษณะมีการกระจายตัวอยู่ระหว่างพ่อแม่และแม่ โดยสิ่งที่ผู้วิจัยนำมาจากเอกสารงานวิจัยนี้คือ เทคนิคพีซีอาร์ด้วยเครื่องหมายอาร์เอฟดี เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลของกล้วยไม้ป่า

ฐิติพร พิทยาอุทวิจิ (2560) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่องการสำรวจและอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ป่าในสวนสัตว์อุบลราชธานี รายงานว่าการสำรวจและอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ป่าในพื้นที่ปกปักพันธุ์กรรมพืชสวนสัตว์อุบลราชธานี พื้นที่ดำเนินงาน แห่งหนึ่งในโครงการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี โดยการสำรวจกล้วยไม้ป่าบริเวณเส้นทางสำรวจ 7 เส้นทาง ซึ่งเป็นตัวแทนของพื้นที่โดยรวม ในระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือนกันยายน 2558 สำรวจพบกล้วยไม้ป่า 4 ชนิด เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย 3 ชนิดและกล้วยไม้ดิน 1 ชนิด จัดจำแนกอยู่ใน 4 สกุล โดยกล้วยไม้เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestris* Rchb.f.) เป็นกล้วยไม้ชนิดเด่นในพื้นที่การขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดจากฝักที่เก็บจากพื้นที่ สามารถขยายพันธุ์กล้วยไม้เขาแกะให้ เป็นต้นที่

สมบูรณ์ได้ในระยะเวลา 20 สัปดาห์โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยง สูตร $\frac{1}{2}$ VM(VW+MS) เติมน้ำมันฝรั่ง 50 ก./ล. กล้วยหอม 50 ก./ล. และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ กล้วยไม้ที่ขยายพันธุ์ได้จะช่วยเพิ่มจำนวนต้นกล้วยไม้ในพื้นที่ เป็นประโยชน์ทั้งในด้านการอนุรักษ์พันธุ์พืชประจำถิ่นและในด้านการท่องเที่ยว สายพันธุ์กล้วยไม้ที่อนุรักษ์ไว้ ยังเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้ให้มีศักยภาพทางการค้าได้ในอนาคต และสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับงานวิจัยอื่นๆ โดยสิ่งที่ผู้วิจัยนำมาจากเอกสารงานวิจัยนี้คือ ข้อมูลของกล้วยไม้ป่า เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลของความของกล้วยไม้ป่า

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ (2563) ได้ทำการศึกษาเรื่อง Genetic Diversity (Fingerprinting) เป็นการอธิบายการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม การวิเคราะห์ความหลากหลาย และเป็นการอธิบายวิธีการทำงานและใช้โปรแกรม NTSYSpc2.10x เพื่อนำผลที่ได้มาทำการโดยวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม และอธิบายถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Genetic variation) ความหลากหลาย (Genetic diversity) เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์และการนำไปใช้ประโยชน์ในแหล่งทางพันธุกรรมต่างๆ โดยสิ่งที่ผู้วิจัยนำมาจากเอกสารงานวิจัยนี้คือ วิธีการทำงานและใช้โปรแกรม NTSYSpc2.10x เพื่อนำมาใช้ในเทคนิคพีซีอาร์ด้วยเครื่องหมายอาร์เอฟดี

Lakhani และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาเรื่อง RAPD analysis of genetic diversity of castor bean (*Ricinus communis* L.) โดยเป็นการนำละหุ่ง (*Ricinus communis* L.) ที่เป็นพืชที่มีความสำคัญทางการค้าของโลก มีการผลิตใน 30 ประเทศซึ่งอยู่ในแถบเขตร้อนของโลก เป็นพืชสำคัญในการผลิตน้ำมันอุตสาหกรรม โดยการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์พืชเป็นสิ่งจำเป็นในการปรับปรุง ดังนั้นจึงเป็นเรื่องสำคัญที่จะต้องระบุความหลากหลายทางพันธุกรรมของทรัพยากรพันธุกรรมละหุ่งสำหรับการพัฒนาสายพันธุ์ที่ปรับปรุงแล้ว จุดมุ่งหมายของการศึกษาในครั้งนี้คือ การศึกษาความหลากหลายของโมเลกุลสำหรับการระบุชนิดพันธุ์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างจีโนไทป์ของละหุ่ง 13 สายพันธุ์และระบุสิ่งที่มีโปรไฟล์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน มีการใช้ไพรเมอร์ RAPDs 27 ชนิดซึ่งไพรเมอร์โพลีมอร์ฟิก 16 ชนิดเผยให้เห็นความหลากหลาย 100% ในกลุ่มจีโนไทป์ของละหุ่ง Dendrogram สร้างขึ้นโดยใช้วิธี UPGMA ซึ่งเปิดเผยกลุ่มที่แตกต่างกัน ค่าของค่าเนื้อหาข้อมูลหลายรูปแบบ (PIC) อยู่ระหว่าง 0.423 ถึง 0.883 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.705 ความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่งสามารถนำไปใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตสำหรับการผลิตน้ำมันที่เพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองความต้องการที่เพิ่มขึ้นของน้ำมันละหุ่งสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมและการผลิตไบโอดีเซล โดยสิ่งที่ผู้วิจัยนำมาจากเอกสารงานวิจัยนี้คือ ตัวไพรเมอร์เพื่อนำมาใช้ในเทคนิคพีซีอาร์ด้วยเครื่องหมายอาร์เอฟดี

มัลลิกา จินดาชิงห และ สุทธิรักษ์ ผลเจริญ (2022) ได้ศึกษาการระบุความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกัญชง 9 สายพันธุ์ และกัญชา 1 สายพันธุ์ โดยเทคนิคโมเลกุลเครื่องหมายเอสเอสอาร์

จำนวน 11 ไพรเมอร์ สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของกัญชงสูงถึง 100 % ในการศึกษาพบว่า มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างเกิดขึ้นทั้งหมด 41 อัลลีล จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเบื้องต้นโดยใช้วิธี unweighted pair group a arithematic average (UPGMA) จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส SSR เท่ากับ 3.73 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเปลี่ยนแปลงจาก 0.05 ถึง 0.83 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.44 เป็นการบ่งชี้ว่ามีฐานทางพันธุกรรมที่กว้างมาก และมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง จากความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของฐาน SSR UPGMA dendrogram แสดงให้เห็นว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ที่ศึกษาออกเป็น 2 กลุ่ม ที่มีลักษณะเฉพาะดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ พันธุ์สองแคว ปางทอง หวยแลง ปางแก และเวียดนาม และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ พันธุ์พุดพระ ปางอุ้ง แม่ตะละ และหวยหอย

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างใบกัญชงจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ กัญชง รหัส BLC-001 BLC-002 พบพระ กัญชงพื้นเมือง และตัวอย่างใบกัญชา จำนวน 1 ตัวอย่าง ได้แก่ สายพันธุ์ KU หางกระรอก จากแปลงทดลอง คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

สกัดดีเอ็นเอจากด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปของ RBC Bioscience โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและชุดสกัดสำเร็จรูปดังนี้คือ นำใบกาแฟมาชั่งน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ห่อด้วยกระดาษฟอยล์ เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำใบกาแฟมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป RBC bioscience ประเทศไต้หวัน โดยชั่งใบพืชสดหรือใบพืชแช่แข็ง 50-100 มิลลิกรัม (หากเป็นตัวอย่างใบแห้งใช้ 5-10 มิลลิกรัม) หั่นหรือสับเป็นชิ้นเล็กๆ ทุบกับไนโตรเจนเหลว จนเป็นผงละเอียด ตักใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม GPI (หรือ GPXI) 400 ไมโครกรัม และ RNase A 5 ไมโครกรัม ลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตรนำไปปั่นบน vortex นำไปอุ่นใน 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที (กลับหลอดทุก 5 นาที) เติม GP2 100 ไมโครกรัม นำไปปั่นบน vortex นำไปแช่น้ำแข็ง 3 นาที ใส่ Filter column (หัวกรองสีขาว) ลงใน 2 มิลลิลิตร collection tube เตรียมไว้ นำสารละลายจากข้อ 5 (อยู่ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร) เทลงใน Filter column ที่เตรียมไว้ นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ทิ้ง Filter column เทสารละลายที่ได้ใส่ หลอด 1.5 อันใหม่ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน DNA binding โดยเติม GP3 (ซึ่งเติม isopropanol แล้ว) จำนวน 1.5 เท่าของสารที่กรองได้ เช่น สารที่กรองได้ 500 ไมโครกรัม ให้เติม GP3 จำนวน 750 ไมโครกรัม (รวมเป็น 1,250 ไมโครกรัม) เป็นต้น นำไปปั่นบน vortex เป็นเวลา 5 วินาที ใส่หลอด GD column (หัวกรองสีเขียว) ลงใน 2 มิลลิลิตร collection tube อันใหม่ เตรียมไว้ ดูดสารละลายที่เหลือ ประมาณ 700 ไมโครกรัม ลงใน GD column ส่วนที่เหลือ (~550 ไมโครกรัม) นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งเฉพาะสารละลายที่อยู่ใน collection tube นำ GD column ใส่กลับลงใน collection tube อันเดิม ทำซ้ำข้อ 12-14 โดยนำสารละลายจากส่วนที่เหลือใช้ในข้อ 10 (หรือข้อ 12) (~550 ไมโครกรัม) เติมลงใน GD column นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งเฉพาะสารที่อยู่ใน collection tube อันเดิมอีกครั้ง จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการล้างดีเอ็นเอ โดยเติม W1 buffer จำนวน 400 ลงใน GD column นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้งลงใน collection tube อันเดิม เติม Wash buffer ที่เติม ethanol แล้วจำนวน 600 ไมโครกรัม ลงใน GD column นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายใน collection ทิ้งไปนำ GD column ใส่กลับลงใน collection tube อันเดิม นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้สารลงบน GD column (ethanol 96-100เปอร์เซ็นต์) ลงใน GD column แทน buffer) นำ GD column ที่แห้งวางลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่

(ต้องตัดฝาทั้งก่อน) จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน DNA Elution โดยเติม preheated Elution buffer (อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส) จำนวน 100 ไมโครกรัม ลงตรงกลางของ GD column และทำการละลาย DNA อยู่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ถูกตัดฝา ตัดทิ้งไว้ 3-5 นาที (เพื่อให้ Elution buffer ซึมซับไปทั่วกลางของ GD column และทำการละลาย DNA ออกมา) นำไปปั่น 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่ GD column ไปได้สารละลาย DNA อยู่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ถูกตัดฝา ถ่ายสารละลาย DNA ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ถูกตัดฝา ลงในหลอด 1.5 อันใหม่ หรือหลอด PCR ปิดฝาให้สนิท รััดด้วย Para film ให้แน่น ใส่ถุงพลาสติก ชนิดแช่แข็ง ติดฉลากให้เรียบร้อย นำไปแช่ในตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป

3.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

1) วิธี Gel electrophoresis ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบความสว่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder) 1.0 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นำมาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง

2) วิธีวัดการดูดกลืนแสง วัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer และคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ} = 50 \times A_{260} \times \frac{\text{ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด (ไมโครกรัม)}}{\text{ปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้ (ไมโครกรัม)}}$$

ความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอหาจากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm (A_{260}/A_{280}) ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ควรมีอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.6 -1.8 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.6 แสดงว่าดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์อื่นๆ และถ้ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อนอยู่

3.3 การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

1. การหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเป็นแม่แบบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ทดสอบใช้ดีเอ็นเอของกัญชง และกัญชาโดยทดสอบจากปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่ปริมาณ 50 นาโนกรัม เป็นแม่แบบ โดยเลือกไพรเมอร์ 1 เส้น เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเป็นแม่แบบของปฏิกิริยาอาร์เอฟพีดี และนำผลผลิตของอาร์เอฟพีดีมาตรวจสอบผลด้วย agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์

2. ตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์มาทดสอบกับดีเอ็นเอหนึ่งตัวอย่าง เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และทดลองปรับเปลี่ยนสภาวะในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR มีส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบและความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ส่วนประกอบของสารละลาย	ปริมาตรต่อหลอด (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
1. DNA templat (50 ng/ ไมโครกรัม)	1.0	50 ng
3. MgCl ₂ (50 mM)	1.5	2.5 mM
4. dNTP (10 mM)	1.0	200 µM
5. Primer (4 µM /100 ไมโครกรัม)	1.0	2.0 µM
6. Tag Master Mix	25	2x
7. ddH ₂ O ปลอดเชื้อ	20.5	-
รวม	50	-

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ให้เข้ากันในหลอดสำหรับ PCR และนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยมีรายละเอียดของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิดังนี้

ขั้นที่ 1 Pre-denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 1 รอบ	
ขั้นที่ 2 Denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที	} จำนวน 35 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที	

ขั้นที่ 3 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ

เก็บสารละลายผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปตรวจสอบผลบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel

3. นำตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมดมาทำการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 3.2

4. ตรวจสอบผลบน agarose gel 1.0 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.2 ไพร์เมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์

ลำดับ	ชื่อ	Sequence repeat motif (5'-3')	Reference
1	RAPD S5	TGCGCCCTTC	Tang et al. (2002)
2	RAPD S23	AGTCAGCCAC	Tang et al. (2002)
3	RAPD OPF13	GGCTGCAGAA	Darvishzadeh et al. (2010)
4	RAPD OPX1	CTGGGCACGA	Darvishzadeh et al. (2010)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เตรียมสารละลายสำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า (KCl 50 มิลลิโมลาร์; Tris-HCl, pH 9.0 10 มิลลิโมลาร์ และ Triton X-100 0.1 เปอร์เซ็นต์) $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพร์เมอร์ 0.25 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase จำนวน 1 ยูนิต และจีโนมดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Swift.Maxfro.Thermal Cyclers,ESCO,Singapore) ตั้งโปรแกรม นำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (PCR product) มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

ปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้ ปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. สารละลายดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1.0 ไมโครลิตร
2. คู่ไพร์เมอร์ (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร
3. 2 mM dNTP 1.5 ไมโครลิตร
4. 10X PCR buffer 1.25 ไมโครลิตร
5. *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.1 ไมโครลิตร
6. น้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเป็น 12.5 ไมโครลิตร

3.4 การตรวจผลปฏิกิริยา PCR ด้วย Agarose gel

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วย agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมนลงในช่อง agarose gel ที่ละตัวอย่างจนครบ และเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA /HindIII (บริษัท SibEnzyme, Russia) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ทราบขนาดและปริมาณที่แน่นอนเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดของผลผลิตที่ได้จาก

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง electrophoresis โดยใช้แรงดันไฟฟ้า 75 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที นำไปตรวจผลบนเครื่องฉาย UV (UV Transilluminator) และบันทึกภาพการเรืองแสงของดีเอ็นเอด้วยกล้อง polaroid camera โดยทั่วไป การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์หากชิ้นยีนมีขนาดใหญ่ 500-1,000 bp มักเตรียม agarose gel ให้มีความเข้มข้นที่ประมาณ 0.8 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากการทดลองนี้ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 200 bp และ 246 bp การตรวจสอบจึงต้องใช้ความเข้มข้นของ agarose gel ให้มากขึ้นเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความเข้มข้นของ agarose gel ที่มีค่าสูง ช่องว่างระหว่างโมเลกุลในเนื้อสารจะยิ่งมีค่าน้อยลง จึงทำให้ดีเอ็นเอที่ยังมีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไปตามแรงดันกระแสไฟฟ้าได้ลดลง ในขณะที่ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะยังสามารถเคลื่อนผ่านช่องว่างระหว่างโมเลกุลของ agarose gel ได้ ด้วยเหตุนี้การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย electrophoresis บน agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจึงสามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันได้ดีขึ้น

3.5 การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลพันธุกรรมที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในรูปของค่าความผันแปรทางพันธุกรรมต่างๆ ได้แก่ ค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่งของแอลลีลที่ประกอบด้วย averaged number of alleles (N_a), effective number of alleles (A_e) และ allelic richness (R) และรวมถึงค่าเฮเทอโรไซโกซิตี ทั้งค่าสังเกต (observed heterozygosity, H_o) และค่าคาดคะเน (expected heterozygosity, H_e) โดยการวิเคราะห์ ณ แต่ละตำแหน่งที่มีความหลากหลายแบบทางพันธุกรรมด้วยวิธี likelihood ratio test (Yeh *et al.*, 1999) และวิเคราะห์รวมทุกตำแหน่งที่สำรวจด้วยวิธี Chi-square test ตรวจวิเคราะห์ null allele ในทุกตำแหน่งของทุกประชากร โดยจะปรับจีโนไทป์และทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์กใหม่ ณ ตำแหน่งและประชากรที่ตรวจพบ null allele คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของ Nei (1978) พร้อมทั้งวิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (dendrogram) ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม FSTAT version 1.2 (Goudet, 1995) และ POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) ยกเว้นการวิเคราะห์ null allele และปรับจีโนไทป์ใช้โปรแกรม Micro-Checker version 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004)

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยวิธี analysis of molecular variance (AMOVA) โดยระบุกลุ่มประชากรตามที่ปรากฏในโครงสร้างความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์ได้ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างให้ครอบคลุมทุกระดับที่ปรากฏในโครงสร้าง โดยตรวจสอบจากค่า F-statistics (inbreeding coefficients หรือ fixation indexes) ซึ่งคำนวณจากค่า variance components แล้วทดสอบโดยการวิเคราะห์ค่า P ในทุกระดับ และทุกคู่ประชากร ของการตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญของค่า P ที่ 0.02 การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างคู่ประชากรทุกคู่ ใช้การวิเคราะห์ค่า P ของ F_{st} ระหว่างคู่ประชากร (PF_{st}) และวิธี exact test (P_{exact}) ภายใต้ระดับนัยสำคัญของค่า P ที่ได้รับการปรับโดยใช้ Bonferroni correction เพื่อ

ความถูกต้องสำหรับการทดสอบแบบ multiple tests และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Arlequin version 3.1

3.6 การสร้างเดนไดรแกรม (dendrogram)

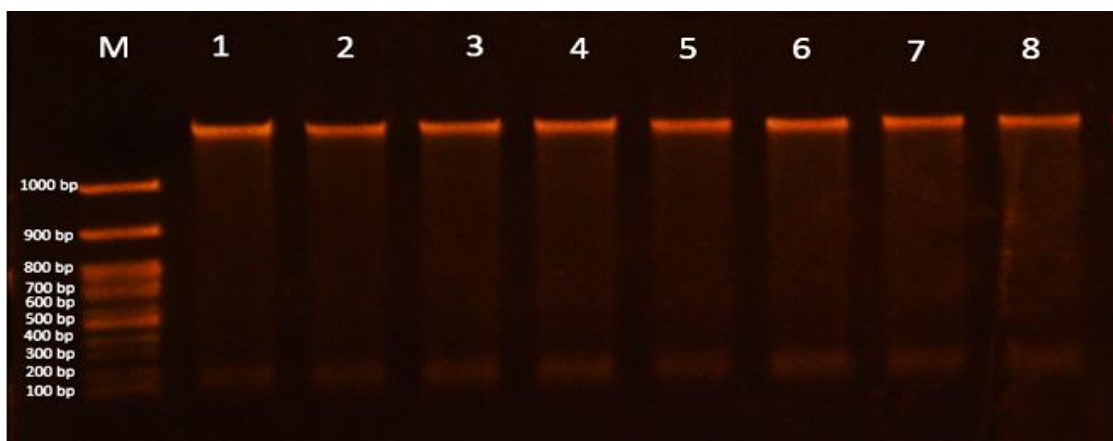
ตรวจสอบคุณภาพพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis) วิเคราะห์ภาพด้วยโปรแกรม PhotoCap นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยสร้างแผนภูมิต้นไม้โดยวิธี Neighbor-joining (NJ) ด้วยโปรแกรม Unweighted Pair Group Method with Arithmetic average (UPGMA) และบันทึกลงในโปรแกรม Microsoft Office Excel 2019

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

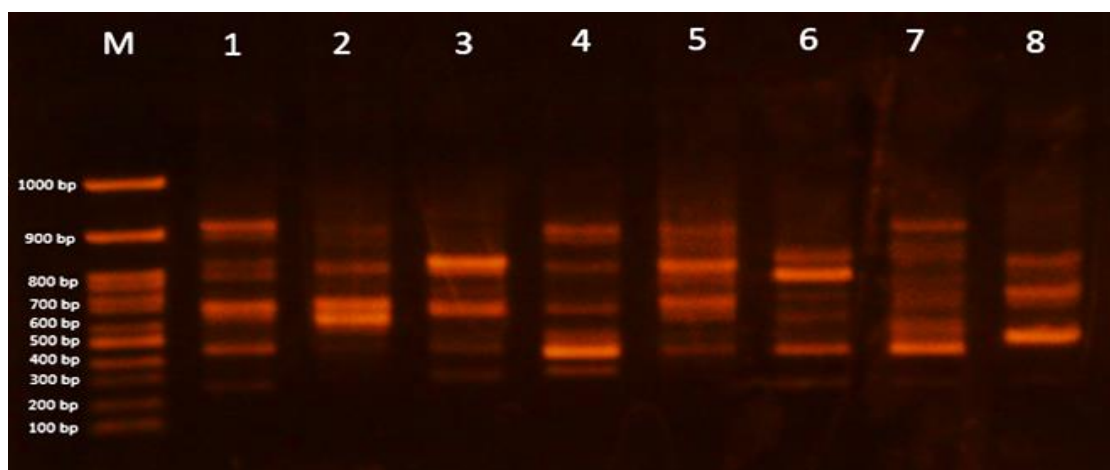
จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยและกล้วยาจำนวน 5 สายพันธุ์ 12 ตัวอย่าง ตรวจสอบผลบน agarose gel 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในขั้นตอน PCR หลังจากการสกัดดีเอ็นเอ หาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร และหาความบริสุทธิ์จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) หากดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.6 -1.8 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.6 แสดงว่าดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์อื่นๆ และถ้ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งจากการตรวจสอบดังกล่าวได้ค่าสัดส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} หลังจากนั้น ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจด้วยไพรเมอร์ที่แตกต่างกันตามความสามารถของไพรเมอร์แต่ละคู่สามารถเข้าจับกับจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของข้าวในแต่ละตัวอย่าง โดยไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จากการนำดีเอ็นเอมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ที่ 100 โวลต์ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลแถบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 แถบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอกล้วยและกล้วยา โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder ลำดับที่ 1 -8 คือ BLC-001 BLC-002 พบพระ1 พบพระ2 พื้นเมือง1 พื้นเมือง2 KU1 และ KU2 ตามลำดับ

4.2 การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกัญชงและกัญชา

จากการเพิ่มปริมาณด้วยด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการใช้เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ชนิด RAPD OPX1 โดยขั้นตอน Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที เพิ่มอุณหภูมิ ช่วง Extension เป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที ทำปฏิกิริยา 35 รอบ และสิ้นสุดปฏิกิริยาที่ Final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที พบว่าขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีขนาด 300 – 800 bp ซึ่งสามารถแสดงชนิดของตัวอย่างได้ดังนี้ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน หมายเลข 1 คือ BLC-001 หมายเลข 2 BLC-002 หมายเลข 3 พบพระ1หมายเลข 4 พบพระ2 หมายเลข 5 พื้นที่เมือง1 หมายเลข 6 พื้นที่เมือง2 หมายเลข 7 KU1 และหมายเลข 8 KU2 ตามลำดับ แสดงผลผลิตภัณฑ์ที่ได้ดังนี้ (ดังภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของกัญชงและกัญชาโดยใช้ไพรเมอร์ RAPD OPX1 โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder ลำดับที่ 1 -8 คือ BLC-001 BLC-002 พบพระ1 พบพระ2 พื้นที่เมือง1 พื้นที่เมือง2 KU1 และ KU2 ตามลำดับ

4.3 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกาแฟทั้งหมด 10 สายต้น โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล SSR นำมาวิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (dendrogram) ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) จากการวิเคราะห์จากความต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ได้ค่าดัชนีความเหมือนหรือความต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีค่าอยู่ที่ช่วง 1.0 – 7.0 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าดัชนีความเหมือนของกัญชงและกัญชาทั้ง 5 สายพันธุ์ 8 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์จากความต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีค่าอยู่ที่ช่วง 1.0 – 7.0

Proximity Matrix

Case	Squared Euclidean Distance							
	BLC-001	BLC-002	พบพระ1	พบพระ2	พื้นเมือง1	พื้นเมือง2	KU1	KU2
BLC-001	0.000	3.000	3.000	3.000	4.000	7.000	6.000	7.000
BLC-002	3.000	0.000	2.000	2.000	3.000	6.000	6.000	7.000
พบพระ1	3.000	2.000	0.000	0.000	1.000	4.000	2.000	4.000
พบพระ2	3.000	2.000	0.000	0.000	1.000	4.000	2.000	3.000
พื้นเมือง1	4.000	3.000	1.000	1.000	0.000	3.000	3.000	2.000
พื้นเมือง2	7.000	6.000	4.000	4.000	3.000	0.000	6.000	4.000
KU1	3.000	2.000	2.000	2.000	3.000	6.000	0.000	3.000
KU2	4.000	3.000	1.000	1.000	0.000	3.000	3.000	0.000

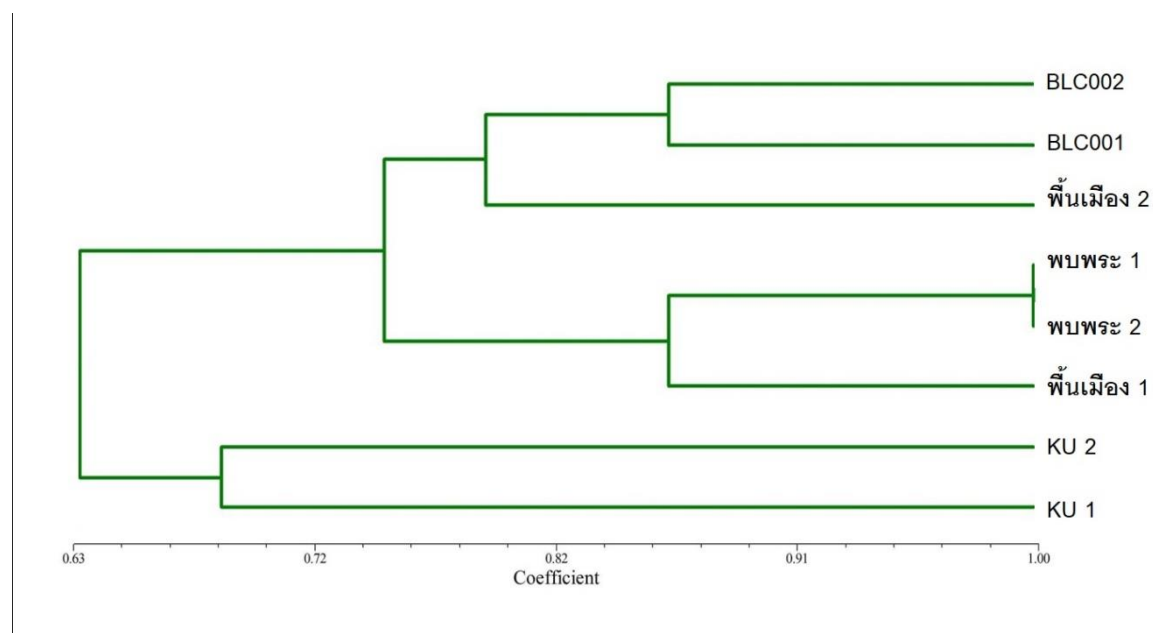
4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกัญชงและกัญชาจากเครื่องหมายโมเลกุล RAPD

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกัญชงและกัญชาทั้ง 5 สายพันธุ์ 8 ตัวอย่าง โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล RAPD ทั้งหมดนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการใช้สูตรคำนวณของ Nei และ Li (1979) (Kiani, G., 2011) และจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA จากนั้นนำมาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA เพื่อสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.63 – 1.00 จากผลเดนโดแกรมสามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 4.2) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ BLC-001 BLC-002 พื้นเมือง2

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พบพระ1 พบพระ2 พื้นเมือง1

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ KU1 KU2



ภาพที่ 4.3 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของกัญชงและกัญชาทั้ง 5 สายพันธุ์ 8 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม Dendrogram ของกัญชงและกัญชา 5 ชนิด 12 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม NTSYS 2.11a

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยงและกล้วยาทั้ง 5 สายพันธุ์ 8 ตัวอย่างจากแปลงทดลอง จากผลการทดลอง พบว่า ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างดังกล่าว ได้แก่ BLC-001 BLC-002 พบพระ1 พบพระ2 พื้นที่เมือง1 พื้นที่เมือง2 KU1 และ KU2 ตามลำดับ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ชนิด RAPD OPX1 (Darvishzadeh et al. 2010) วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล RAPD วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากกล้วยงและกล้วยา เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสร้างเป็น dendrogram และตาราง metrix พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มกล้วยงและกล้วยาออกเป็น 3 โดยกลุ่มที่ 1 ได้แก่ BLC-001 BLC-002 พื้นที่เมือง2 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พบพระ1 พบพระ2 พื้นที่เมือง1 และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ KU1 KU2 จากการวิเคราะห์จากความต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 1.0 – 7.0 จากการข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า แม้กล้วยงและกล้วยา โดยเฉพาะกล้วยา ตัวอย่าง KU1 และ KU2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกัน แต่อาจมีลักษณะทางพันธุกรรมบางประการที่เกิดจากการผสมข้ามจนทำให้เกิดสายต้นใหม่หรือการเปลี่ยนแปลงของยีนบางบริเวณ ซึ่งอาจตรวจพบได้เพียงในระดับโมเลกุลในระยะแรก และอาจค่อยๆ มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาในเวลาต่อมา จากการทดลอง เมื่อต้องการทดสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถทำได้โดยการใช้เครื่องหมาย RAPD ซึ่งอาจเป็นข้อได้เปรียบในการคัดเลือกพืชให้มีความบริสุทธิ์หรือการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมได้โดยไม่ต้องอาศัยการตรวจสอบทางสัณฐานภายนอก จากการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ พบว่า ไพรเมอร์รหัส RAPD OPX1 สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มีความแปรผันทางพันธุกรรมได้มาก จากธรรมชาติของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้ เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบสุ่ม และไพรเมอร์จะเลือกเข้าจับกับบริเวณตำแหน่งของดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม อย่างไรก็ตาม แม้จะเป็นการเข้าจับแบบสุ่ม แต่หากสิ่งมีชีวิตใดๆ มีลักษณะทางพันธุกรรม โดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือตำแหน่งยีนที่คล้ายกันแล้ว การเข้าจับของไพรเมอร์ก็มักจะเข้าจับในตำแหน่งใกล้เคียงกัน ขนาดของดีเอ็นเอ และชั้นดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน เมื่อตรวจสอบจากภาพ gel electrophoresis ก็มักพบว่า แถบดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายกันก็จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกันด้วย และหากตรวจสอบสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะภายนอกต่างกัน ลักษณะทางพันธุกรรมระดับยีนก็จะมี ความแตกต่างกันไปด้วย และในบางกรณี ลักษณะทางพันธุกรรมจะสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาบ้าง ถึงแม้ตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษาจะมีความแตกต่างกันทางสายพันธุ์ในกลุ่มเดียวกัน รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน แต่พบว่ามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมไม่มาก เช่นเดียวกับการศึกษาของ Nhi et al. (2010) ศึกษาพบว่า ถึงแม้เมลอนเวียดนามที่นำมาศึกษาจะมีชนิดที่แตกต่างกันและมีความแตกต่างกันทางด้านสัณฐานวิทยา แต่กลับมีความแปรปรวนทางด้านพันธุกรรมที่ต่ำ น่าจะเกิดจากตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าไปจับบนจีโนมมีความเหมาะสม ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมและการพัฒนาสายพันธุ์อาจต้องใช้จำนวนต้น

และจำนวน เครื่องหมายโมเลกุลที่มาก และต้องมีการทดสอบในหลายรุ่นซึ่งใช้เวลานาน เพื่อให้แน่ใจว่าสายพันธุ์ดังกล่าวเข้าใกล้ความเป็น homozygous lines ซึ่งจากงานวิจัยหลายชิ้นที่ผ่านมา เครื่องหมายโมเลกุล RAPD ได้มีบทบาทอย่างมากในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช เช่นงานวิจัยของ Lakhani และคณะ (2016) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างจีโนไทป์ของละหุ่ง 13 สายพันธุ์ใช้ไพรเมอร์ RAPDs 27 ชนิดซึ่งไพรเมอร์โพลีมอร์ฟิก 16 ชนิดมีความหลากหลาย 100% ในกลุ่มจีโนไทป์ของละหุ่ง Dendrogram แยกกลุ่มที่แตกต่างอยู่ระหว่าง 0.423 ถึง 0.883 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.705 ความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพที่จะนำไปสู่การจำแนกความแตกต่าง หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญอย่างมาต่อการปรับปรุงพันธุ์สิ่งมีชีวิตในอนาคตเพื่อตอบสนองความต้องการในทุกด้าน ทั้งอาหาร ยารักษาโรค เครื่องนุ่งห่ม อุตสาหกรรมต่างๆ ตลอดจนการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติให้เราสามารถปฏิบัติต่อความจำเพาะเจาะจงทางพันธุกรรมของทั้งพืชและสัตว์ได้อย่างถูกต้องต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.
กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัย
อุบลราชธานี. 5 (2): 37-58
- Brown, G., W. N. Frost, and P. A. Getting. 1996. Habituation and iterative enhancement of
multiple components of the Tritonia swim response. *Behav. Neurosci.* 110:478-485.
- Chase, W. M., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, M.J, Kesanakurthi, P. R., Haidar, N. and
Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals.
Philosophical Transactions of the Royal Society B 360: 1889-1895.
- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., van den Berg, C., Madrinan, S., Petersen, G.,
Seberg, O., Jorgensen, T., Cameron, K. M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T. A.
j., Conrad, F., Salazar, G. A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M. L., Barraclough, T. G.,
Kelly, L. and Wilkinson, M. J. 2007. A proposal for a standardized protocol to barcode all
land plants. *Taxon* 56: 295-299.
- CBOL Plant working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the
National Academy of Science of the United States of America* 106: 12794-12797.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of
fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Ebihara, A., Nitta, J.H. & Ito, M. 2010. Molecular species identification with rich floristic
sampling:DNA barcoding the pteridophyte flora of Japan. *PLoS ONE* 5: e15136.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. (2006) Arlequin ver. 3.11: An Integrated Software Package
for Population Genetics Data Analysis. *Computational and Molecular Population Genetics
Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne: Berne, Switzerland*
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G., Husband,

- B. C., Percy, D. M., Hajibabaei, M. and Barrett, S. C. H. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3: e2802.
- Ford, C. S., Ayres, K. L., Toomey, N., Haider, N., Stahl, J. V. A., Kelly, L. J., Wikström, N., Hollingsworth, P. M., Duff, R. J., Hoot, S. B., Cowan, R. S., Chase, M. W. and Wilkinson, M. J. 2009. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 1-11.
- Fu, Y.-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Gonzalez, M.A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S.A., Pétronelli, P., Riéra, B., Roger, A., Thébaud, C. & Chave, J. 2009. Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS ONE* 4: e7483.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 313-321.
- Hebert P.D.N., Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol* 2(10): e312
- Hilu, K. W. and L. A. Alice. 1999. Evolutionary implications of matK indels in Poaceae. *Amer. J. Bot.* 86: 1735-1741.
- Hilu, K.W. & Liang, H. 1997. The matK gene: sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany* 84: 830-839.
- Kochert, G. 1994. RFLP technology. In *DNA-based markers in plants*. Phillips, R.L. and I.K. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. Pp.8-38.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcl* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLoS ONE* 2(6): e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508
- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Papulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G. & Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2923-

- 2928.
- McCouch, S. and S.D. Tanksley. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphisms in rice breeding and genetic. In. Rice biotechnology. Khush, G.S. and Toenniessen, G.H. (eds.) CAB International. Wallingford. Oxon, UK. Pp. 109-133.
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., Steeves, R. A. D. and Janovec, J. 2007. Testing candidates plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources* 8: 480-490.
- Seberg, O. and Petersen, G. 2009. How many loci does it take to DNA barcode a crocus? *PLoS ONE* 4: e4598.
- Plunkett, G.M., Soltis, D.E. and Soltis, P.S., 1997, Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on matK and rbcL sequence data, *Amer. J. Bot.* 84: 565-580
- Powell W, Machray GC, Provan J (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1:215-222.
- Sass, C., Little, D.P., Stevenson, D.M. & Specht, C.D. 2007. DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding makers for species identification of cycads. *PLoS ONE* 2: e1154.
- Soltis, D.E. & Soltis, P.S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In: *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. D.E., Soltis, P.S. Soltis & J.J. Doyle (Eds.), pp.1-42. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Tanksley, S. D., Young, N. D., Patterson, A. H., and Bonierbale, M. W., 1989, RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science, *Bio/Technology* 7:257
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM and Shipley PF (2004) MICRO-CHECKER: For identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535-538.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified

by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531–6535

Yeh Francis C., Yang R.-C., Boyle Timothy B. J., Ye Z.-H. and Mao Judy X. 1999 POPGENE version 1.32, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายต้นต่อ CTAB buffer

1.1 CTAB 10 เปอร์เซ็นต์ (50 มิลลิลิตร)

ชั่ง CTAB	5.0	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

1.2 Tris-HCl 1 โมลาร์ (25 มิลลิลิตร)

ชั่ง Tris base	3.03	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	25	มิลลิลิตร

1.3 EDTA 1 โมลาร์ (20 มิลลิลิตร)

ชั่ง EDTA	7.44	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

1.4 NaCl 3 โมลาร์ (50 มิลลิลิตร)

ชั่ง NaCl	8.77	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

2. การเตรียมเอนไซม์ Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่ง Proteinase K	10	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่น	986.7	ไมโครลิตร
Tris-HCl 1 โมลาร์ (pH 7.5)	10	ไมโครลิตร
NaCl 3 โมลาร์	3.3	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมเอนไซม์ RNase A (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่ง RNase-A	1	มิลลิกรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร
เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส		

4. TE buffer (250 มิลลิลิตร)

ชั่ง Tris base	0.303	กรัม
EDTA	0.093	กรัม
เติมน้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

5. TBE ความเข้มข้น 10 เท่า (1000 มิลลิลิตร)

Tris base (hydroxyl methyl,aminomethane)	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม

EDTA 0.5 โมลาร์ (pH 8.0)	40	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
6. เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (70 มิลลิลิตร)		
ซัง อะกาโรส	0.7	กรัม
ปรับปริมาตรด้วย TBE buffer เข้มข้น 1 เท่า	70	มิลลิลิตร
ต้มจนละลายด้วย hot plate หรือ ไมโครเวฟ		
7. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (100 มิลลิลิตร)		
เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์	95	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร
8. เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (100 มิลลิลิตร)		
เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์	70	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่น	30	มิลลิลิตร
9. คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) (100 มิลลิลิตร)		
เติมคลอโรฟอร์ม	96	มิลลิลิตร
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	4	มิลลิลิตร
เก็บไว้ในขวดสีชา		

10. การเตรียม CTAB buffer สำหรับสกัดดีเอ็นเอ (800 ไมโครลิตร)

ตารางที่ ก1 ความเข้มข้นที่ปริมาณสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาถูกลูโซพอลิเมอเรส

สารละลายต้นต่อ CTAB buffer	ความเข้มข้นที่ต้องการ	ปริมาณต่อตัวอย่าง (ไมโครลิตร)
CTAB 10 เปอร์เซ็นต์	2 เปอร์เซ็นต์	160.00
Tris-HCl 1 โมลาร์	100 มิลลิโมลาร์	80.00
EDTA 1 โมลาร์	20 มิลลิโมลาร์	16.00
NaCl 3 โมลาร์	1.4 โมลาร์	373.33
β -mercaptoethanol	1.2 เปอร์เซ็นต์	1.60
Proteinase-K 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	8.00
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	-	161.07
รวม	-	800

หมายเหตุ เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และอุ่นที่ 60 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน

11. อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ (Agarose Gel Electrophoresis of DNA)

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณ

ของประจุ ขนาดและโครงรูปของโมเลกุลของสาร การแยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส มักทำให้ตัวกลางที่เป็นสารโมเลกุลใหญ่พวกโพลีเมอร์ สำหรับดีเอ็นเอเอนิเมอแยกโดยใช้อะกาโรส หรือโพลีอะคริลาไมด์เป็นตัวกลาง การแยกดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเป็นตัวกลางเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม เพราะเป็นเทคนิคที่ใช้แยก บ่งชี้และทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ซึ่งทำให้สะดวกและรวดเร็ว เนื่องจากการเตรียมอะกาโรสเจลทำได้สะดวกกว่าการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล การตรวจหาแถบของดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันสามารถทำได้โดยการย้อมอะกาโรสเอธิเทียมโบรไมด์ แล้วตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอธิเดียมโบรไมด์กับดีเอ็นเอ ซึ่งจะเรืองแสง (fluorescence) เมื่อส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลต แถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำเพียง 10 นาโนกรัม สามารถถูกตรวจพบได้โดยวิธีนี้ การแยกดีเอ็นเอโดยโพลีอะคริลาไมด์ยุ่งยากกว่า แต่มีอำนาจการแยก (resolving power) สูงกว่าอะกาโรสเจลมากโดยสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียงคู่เบสเดียวออกจากกันได้ จึงใช้ได้ดีในเทคนิคการหาลาดับเบส (DNA sequencing)

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

อะกาโรสเป็นสารโพลีเมอร์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล ถ้ากำหนดให้โครงรูปของดีเอ็นเอเป็นแบบเส้นตรง ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของโมเลกุลกับระยะทางที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถแสดงได้ในรูปของกราฟซึ่งจะเห็นว่าสำหรับแต่ละความเข้มข้นของอะกาโรสเจลจะมีช่วงที่การเคลื่อนที่กับ $\log$ ของขนาดโมเลกุลมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรง ซึ่งช่วงขนาดของดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางนั้นได้รวบรวมไว้

ในปัจจุบันมีการใช้อะกาโรสในงานอิเล็กโตรโฟรีซิสเพิ่มมากขึ้นทั่วโลก ผู้ผลิตหลายบริษัทจึงทำการผลิตอะกาโรสชนิดพิเศษสำหรับใช้ในงานอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยเฉพาะซึ่งเป็นอะกาโรสที่บริสุทธิ์ปราศจากสารเจือปนซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไปหลังจากแยกดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล และปราศจากการปนเปื้อนจากนิวคลีโอเอสซึ่งทำลายกรดนิวคลีอิก

ในการเตรียมเจลจะนำอะกาโรสมาหลอมในบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ประมาณ 8 แล้วเทลงในภาตรองเจลเมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้วจึงทำการหยดดีเอ็นเอลงในหลุมแล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่เจล ดีเอ็นเอ ซึ่งมีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วบวก อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ต่อไปนี้

1. ขนาดของดีเอ็นเอ

อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะแปรผกผันกับ $\log_{10}$ ของจำนวนคู่เบสดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าเพราะมีแรงเสียดทานมากกว่าและโมเลกุลจะเคลื่อนผ่านรูของเจลายากกว่า

2. ความเข้มข้นของอะกาโรส

ขณะที่ให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านรูภายในเจล ถ้ามีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะสูงกว่าเจลที่มีรูขนาดเล็ก ขนาดของรูภายในเจลจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส อะกาโรสยังมีความเข้มข้นมากภายในจะมีขนาดเล็กลง การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรส จะมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรส ตามสมการ

$$\log u = \log u_0 - K_r T$$

u = ระยะทางที่ ดีเอ็นเอ เคลื่อนที่ ในอะกาโรสเจล

u_0 = ระยะทางที่ ดีเอ็นเอ เคลื่อนที่ ในสภาพที่ไม่มีในอะกาโรสเจล

K_r = สัมประสิทธิ์ความหน่วง(retardation coefficient)

ตารางที่ ก2 ช่วงขนาดดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางที่เคลื่อนที่ไปในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล (%)	ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด(กิโลเบส)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

3. โครงรูปของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่อยู่ในโครงรูปที่ต่างกันจะเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลในอัตราที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล ความแรงของกระแสไฟฟ้าและความแรงไอออนของบัฟเฟอร์ โดยทั่วไป สำหรับพลาสมิดดีเอ็นเอ โครงรูปแบบซูเปอร์เฮลิคัล(superhelical) จะเคลื่อนที่เร็วกว่าแบบเส้นตรง (linear) ส่วนแบบวงกลมนิก(nicked circular) จะเคลื่อนที่ช้าที่สุด

4. องค์ประกอบของบัฟเฟอร์

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและความแรงไอออนของบัฟเฟอร์ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้สำหรับอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอมี 4 ชนิด ดังสรุปไว้ใน ตารางที่ 2 นิยมเตรียมบัฟเฟอร์เข้มข้นเก็บไว้ เช่น 10X buffer หมายความว่า เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้จริง TAE, TPE และ TBE ใช้กับดีเอ็นเอสายคู่ ส่วนบัฟเฟอร์ต่าง(alkaline buffer) ใช้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

ตารางที่ 3 บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ

บัฟเฟอร์	ความเข้มข้นที่ใช้ในอิเล็กโทรโฟรีซิส (working solution)	บัฟเฟอร์เข้มข้น/1000 ml (stock solution)
Tris-acetate(TAE)	1X:0.04 M Tris-acetate0.001 M EDTA	10X:48.4 g Tris base11.4 ml glacial aceticacid20 ml of 0.5 M EDTA(pH 8.0)
Tris-phosphate(TPE)	1X:0.09 M Tris- phosphate0.002 M EDTA	10X:108 g Tris base15.5 ml 85% phosphoric acid40 ml of 0.5 M EDTA(pH 8.0)
Tris-borate(TBE)	0.5X:0.045 M Tris-borate0.002 M EDTA	5X:54 g Tris base27.5 ml boric acid20 ml of 0.5 M EDTA(pH 8.0)
AlkalineButter	1X:50mM NaOH1 mM EDTA	10X:5 ml 10 N NaoH2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

วัสดุและอุปกรณ์

1. agarose (electrophoresis grade)
2. 5x TBE buffer
3. Ethidium bromide 10 mg/ml
4. 10 x gel loading buffer
5. electrophoresis chamber(mini gel)
6. power supply
7. UV transilluminator
8. Polaroid Camera

วิธีทำ

1. เตรียมภาตรองเจล (gel mould) วางบนพื้นเรียบ

2. ชั่ง agarose จำนวนที่ต้องการลงในพลาสติก เติม electrophoresis buffer (1 X TBE) ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการโดยทั่ว ๆ ไป mini-gel มักใช้ปริมาณ agarose 35-40 ml ถ้าต้องการเตรียม 0.8 % agarose gel ใช้ agarose 0.32 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 40 ml

3. ทำให้ agarose ละลายโดยแช่พลาสติกในน้ำเดือด หรือในเตาไมโครเวฟจนออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็นลงถึงประมาณ 60 °C เติม ethidium bromide (10 mg/ml) ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 µg/ml (2 ไมโครลิตรต่อ 40 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยการหมุนพลาสติกเบาๆ

4. เท agarose ลงในถาดรองเจลที่เตรียมไว้ พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศวาง comb ลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดรองเจล ให้ซี่ของ comb อยู่ห่างจากปลายของเจลประมาณ 1 ซม. รอให้เจลแข็งตัว

5. หลังจากเจลแข็งตัว นำถาดไปวางใน electrophoresis tank เท buffer (1X TBE) ลงไปจนท่วมเจลให้บัฟเฟอร์ท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 มม. ค่อยๆ ดึง comb ออก

6. ผสม DNA sample กับ gel-loading buffer แล้วหยอดตัวอย่างลงในช่องโดยใช้ disposable micropipette (gel-loading buffer คือบัฟเฟอร์ที่มีสีย้อม 2 ชนิด คือ bromphenol blue กับ xylene cyanol, bromphenol blue จะเคลื่อนที่ในอัตราเร็วพอๆ กับ ดีเอ็นเอ ซึ่งยาวประมาณ 300 คู่เบส และเคลื่อนที่เร็วกว่า xylene cyanol ประมาณ 2.2 เท่า xylene cyanol เคลื่อนที่ในอัตราเร็วพอๆ กับ ดีเอ็นเอ คู่ซึ่งยาวประมาณ 4 kb นอกจากนี้ยังมี glycerol หรือ sucrose ผสมอยู่ เพื่อถ่วงให้ ดีเอ็นเอ ตกลงสู่ก้นหลุม มักจะเตรียม gel - loading buffer ที่เข้มข้นกว่าที่ใช้จริง 10 เท่า ดังนั้น ถ้ามี ดีเอ็นเอ ตัวอย่างอยู่ 10 ไมโครลิตร ใช้ gel - loading buffer 1 ไมโครลิตร ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสทุกครั้งต้องมี ดีเอ็นเอ มาตรฐาน ที่รู้ขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งมักจะหยอด ดีเอ็นเอ มาตรฐาน นี้ลงในหลุมซ้ายมือสุด ดีเอ็นเอ มาตรฐาน ที่นิยมใช้คือ แลมด้า ดีเอ็นเอ ตัดด้วยเอนไซม์ Hind III หรือ Eco RI หรือทั้งสอง

7. เมื่อหยอดตัวอย่างเรียบร้อยแล้วทุกหลุมแล้ว ปิดฝา electrophoresis chamber แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ power supply ตั้ง voltage สูงประมาณ 1-5 โวลต์/ซม. ดีเอ็นเอ จะเคลื่อนที่จาก cathode (ขั้วสีดำ) ไปยัง anode (ขั้วสีแดง) อย่าตั้ง voltage ให้สูงเกินไปจะทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งจะทาลาย ดีเอ็นเอ โดยทั่วๆ ไปสำหรับ mini-gel ใช้ 50-60 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อ bromphenol blue เคลื่อนไปได้ประมาณ 80 % ของความยาวเจล หยุดกระแสไฟฟ้า นำเจลออกมาแล้วนำไปวางบน UV Transilluminator เพื่อตรวจสอบผลการแยก บันทึกภาพด้วยกล้องโพลาไรด์

การเตรียมสารละลาย

1. 5x TBE (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)

54 กรัม Tris base

27.5 กรัม Boric acid

20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ละลายน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

2. 1 x TBE

5 x TBE 1 ส่วน:น้ำ 4 ส่วน

3. 10 mg/ml ethidium bromide

ชั่ง ethidium bromide 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 10 มิลลิลิตร โดยการกวนบน magnetic stirrer 1-2 ชั่วโมง เก็บไว้ในขวดหุ้มอะลูมิเนียมฟอยล์ (ethidium bromide อาจเป็น strong mutagen สวมถุงมือตลอดเวลาที่เกี่ยวข้องกับสารนี้)

4. 10 x gel-loading buffer

0.4 % bromophenol blue

0.4 % xylene cyanol

50 % glycerol in water

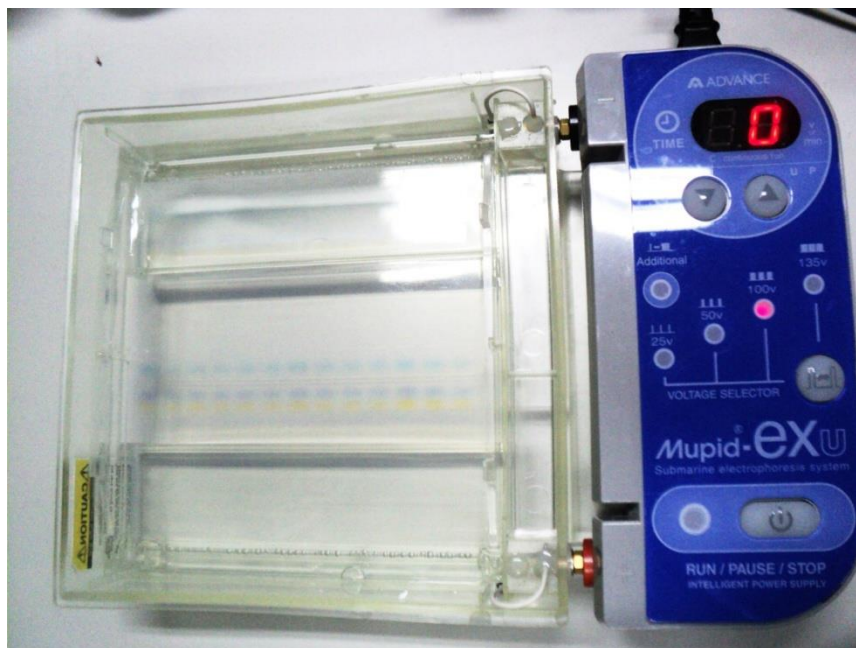
ภาคผนวก ข



ภาพที่ ข1 เครื่องควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Swift™ MaxPro Thermal Cycler)



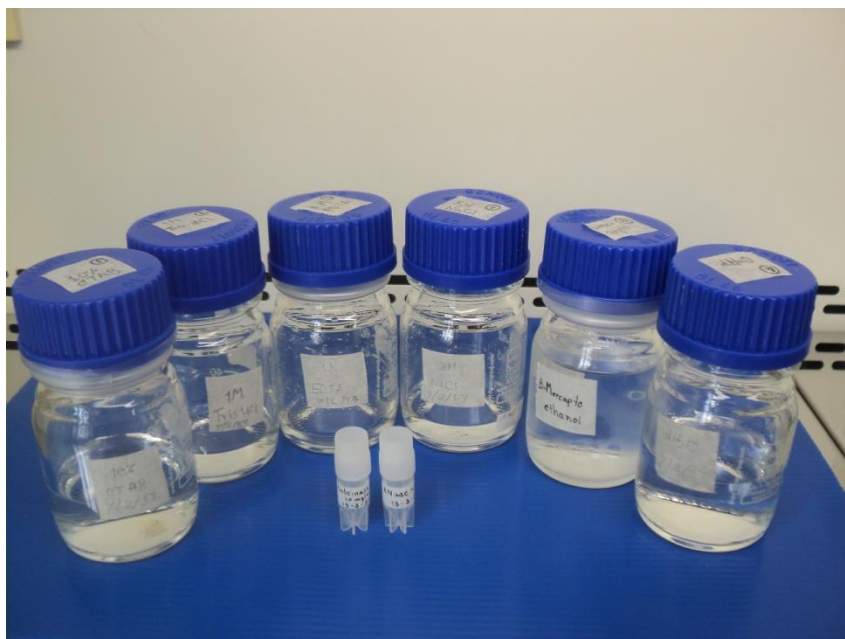
ภาพที่ ข2 ชุดเครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ (UV Transilluminator, ยี่ห้อ UVP, รุ่น LLC Upland, cambridge, UK)



ภาพที่ ข3 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Mupid-EXU® Gel Electrophoresis System)



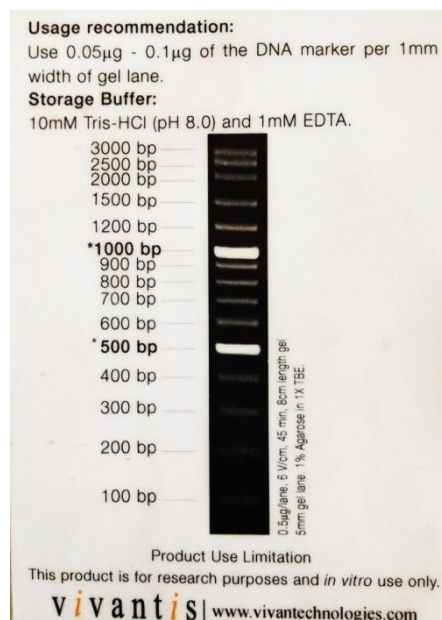
ภาพที่ ข4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer, ยี่ห้อ SHIMADZU, รุ่น UV-1700)



ภาพที่ ข5 สารละลายต้นตอที่ใช้ในการเตรียม CTAB buffer ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB



ภาพที่ ข6 Agarose gel (Invitrogen™)



ภาพที่ ข7 DNA Marker หรือ DNA Ladder
(VC 100bp Plus DNA Ladder, ViVaantis)



ภาพที่ ข8 ชุดสกัดดีเอ็นเอ RBC bioscience DNA plant kit

ภาคผนวก ค

วิธีใช้เครื่องบันทึกภาพ Dark Hood DH-50 รุ่นDH-50

1. เปิดสวิตช์ทางด้านหลังของเครื่อง Dark Hood D-50
2. เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์แล้วไปที่โปรแกรม bio step argusX1 จะมีหน้าต่าง Bio step กดเครื่องหมาย ✓
3. กดปุ่ม camera ด้านซ้ายมือเกิดหน้าต่าง USB Camera
4. กดปุ่ม Live image เพื่อดูสภาพสดในเครื่อง ถ้าไม่มีของอยู่ในเครื่องน่าจจะเป็นสีดำจากนั้นกดปุ่ม Top-light White □ ปุ่มสีขาว จากนั้นกด สีเหลือง
5. ไปที่ Transmission light กดปุ่มขวาสุด □ กดแล้วจะกลายเป็นสีเหลือง จากนั้นภาพของจริงที่อยู่ใน dark hood ปรากฏในจอที่มีด
6. สามารถถ่ายภาพได้โดยกด Exposure (ภาพถ่าย) แล้วกด proceed จะเกิดภาพขยายปิดจอเล็กแล้วไปกด ที่ Export เกิดหน้าจอ Export
7. ขึ้นไปเมนูข้างบนเกิดหน้าจอ Export image ตั้งชื่อไฟล์แล้วกด Save

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ – นามสกุล นายสุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง
Mr. Surachest Aiumsumang

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3679800097588

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ

หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ ไปรษณีย์
อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
83 หมู่ 11 ตำบลสะเดียง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000
โทรศัพท์มือถือ 0899612694
e-mail : tophesun@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ จากคณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับวุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับวุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา สาขาย่อย ชีววิทยาโมเลกุล

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีววิทยาโมเลกุล พันธุศาสตร์โมเลกุล

งานวิจัยที่สำคัญและพิมพ์เผยแพร่แล้ว

1. สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ ดวงกมล แม้นศิริ. 2554. การใช้วิตามินซีในการส่งเสริมความทนต่อ
สภาวะเครียดเกลือในข้าว (*Oryza sativa* L.) การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับ
บัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 12 มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
2. สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ เบญจพร ศรีสุวรรณาศ. 2557. การแสดงออกของยีนไคตินเนสในการ
ต้านทานโรคราในมะขาม. การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 1 สานพลัง
ปัญญา เพื่อพัฒนาสุขภาพ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้สังคมพหุวัฒนธรรม. มหาวิทยาลัยราช
ภัฏอุดรดิตถ์.
3. จรรยา นพรัตน์, สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง และอนุพันธ์ กงบังเกิด. 2557. ผลของสารประกอบอินทรีย์
ต่อการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนข้อเอื้องดินปากพัด (*Cheirostylis spathulata* J.J.Sm.) ใน
หลอดทดลอง. การประชุมวิชาการพะเยาวิจัยครั้งที่ 3 ระหว่างวันที่ 23-24 มกราคม 2557.
มหาวิทยาลัยพะเยา หน้า 689-695.

4. เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, จินตนา สนามชัยสกุล, สมพงษ์ แสนเสนยา, เทพ เพียมะลิ่ง และ **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน**. 2557. การปรับปรุงพันธุ์มะขามต้านเชื้อราด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ยีน *rbcL* ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฉายรังสีแกมมา. ในงานประชุมวิชาการ Next Generation Sequencing for Genetic and Genomic Studies (NGS2014) 29 - 30 กรกฎาคม 2557 หน้า ณ โรงแรมวินเซอร์ สวีทส์ สุขุมวิท กรุงเทพมหานคร.
5. เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, สมพงษ์ แสนเสนยา และ**สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน**. 2558 การตรวจสอบเพื่อระบุข้าวพันธุ์ปลูกพื้นเมืองเพชรบูรณ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL*. ในงานการประชุมวิชาการจีโนมิกส์ ชีวสารสนเทศศาสตร์ และชีววิทยาเชิงระบบ Genomics, Bioinformatics, and System Biology Conference (GBSBC 2015) 10-11 พฤศจิกายน 2558 หน้า 48-54 ณ ไบเทค บางนา กรุงเทพฯ.
6. **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน** และเบญจพร ศรีสุวรรณมาศ. 2558. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ข้าว 10 พันธุ์ปลูกด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์และการใช้ยีน *rbcL*. การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ครั้งที่ 1 ภายใต้หัวข้อ “วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีก้าวไกลสู่ประชาคมอาเซียน (Science and Technology Towards ASEAN)”. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์.
7. **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน** และ กาญจน์ คุ่มทรัพย์. 2558. การใช้สื่อมัลติมีเดียในการเพิ่มศักยภาพการเรียนการสอนเรื่อง การแพร่และกระบวนการออสโมซิสในสิ่งมีชีวิต. การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ครั้งที่ 1 ภายใต้หัวข้อ “วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีก้าวไกลสู่ประชาคมอาเซียน (Science and Technology Towards ASEAN)”. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์.
8. ฉัตรพร แก้วสาร, **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน** และ กาญจน์ คุ่มทรัพย์. 2558. ผลของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ไอยเรศ (*Rhynchostylis retusa* L.) Blume) ในสภาพปลอดเชื้อ. การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 2 "งานวิจัยเพื่อพัฒนาท้องถิ่น". มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
9. กาญจน์ คุ่มทรัพย์, **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน**, อาตุลย์ จงรักษ์ และอาทิตย์ หุ่นเต็ม. 2558. ความหลากหลายทางชีวภาพในระบบนิเวศเกษตรที่สูง กรณีศึกษา ชุมชน ตำบลเขาค้อ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์. ประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา “การวิจัยเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน”
10. ยุติดา สุกุลทอง, กาญจน์ คุ่มทรัพย์ และ**สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน**. 2558. การใช้ BMWP และ ASPT กลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเพื่อตรวจติดตามคุณภาพน้ำในสวนรุกขชาติหนองนารี. ประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ครั้งที่ 2 หน้า 44 – 48.

11. ศิริพร แสนแทน, ปณิตตา ปานเมือง, กาญจน์ คัมภีร์พย์, ธนาวรรณ สุขเกษม และ **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน**. 2560. ความหลากหลายชนิดของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหน้าดิน บริเวณน้ำตกธาราเอราวัณ จังหวัดเพชรบูรณ์. การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ครั้งที่ 4 หน้า 132 – 137.
12. สุวัจน์ สุขเมือง, เนตรนภา แก้วเข้ม, กาญจน์ คัมภีร์พย์, สุวิทย์ วรรณศรี และ **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน**. 2560. สันฐานวิทยาของลูกอ๊อดในพื้นที่น้ำตกธาราเอราวัณ ตำบลตะแบะ อำเภอมือง จังหวัดเพชรบูรณ์. การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ครั้งที่ 4 หน้า 1084 – 1090.
13. วราภรณ์ สมทอง, ศิริธร กองสอน, กาญจน์ คัมภีร์พย์ ธนาวรรณ สุขเกษม และ **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน**. 2560. ความหลากหลายและความชุกชุมของผีเสื้อกลางวันในสวนรุกขชาติหนองนารี อำเภอมือง จังหวัดเพชรบูรณ์. ประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ครั้งที่ 4 หน้า 1091 – 1096.
14. **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน**, เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ และ กาญจน์ คัมภีร์พย์. 2560. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในมะม่วงบางสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*. การประชุมสัมมนาวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยเครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 17 "บูรณาการงานวิจัยสู่การพัฒนาท้องถิ่นที่ยั่งยืน" ณ ศูนย์วัฒนธรรมภาคเหนือตอนล่าง วังจันทน์ริเวอร์วิว มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.
15. **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน** และ สุมาลี พิมพันธ์. 2561. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR. แก่นเกษตร 47 (ฉบับพิเศษ1): 604-610.
16. สุมาลี พิมพันธ์ และ **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน**. 2562. โครโมโซมของอีกรายห้วยใหญ่ (*Xenophys major*) ด้วยการย้อมสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์. รายงานสืบเนื่องการประชุมสัมมนาวิชาการระดับชาติเครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 19. หน้า 73-80. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่.
17. สุรางคณา แสงเอี่ยม ศิลาภรณ์ สุนทรรักษ์ สุมาลี พิมพันธ์ และ **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน**. 2562. การใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวในจังหวัดเพชรบูรณ์. รายงานสืบเนื่องการประชุมสัมมนาวิชาการระดับชาติเครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 19. หน้า ๑๗-๒๕. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่.
18. สลันญา สอนสุภาพ เจนจิรา เชื้อบุญจันทร์ **สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน** และสุมาลี พิมพันธ์. 2562. โครโมโซมของปลาอีสกเทศ (*Labeo rohita*) และปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) ในจังหวัดเพชรบูรณ์. รายงานสืบเนื่องการประชุมสัมมนาวิชาการระดับชาติเครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 19. หน้า ๑๐๙-๑๑๙. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่.

19. สุมาลี พิมพันธ์ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และกาญจน์ คัมทรัพย์. 2564. แคริโอไทป์ และอิตีโอแกรมของ ปลาก้าง (*Channa gachua*) จากจังหวัดเพชรบูรณ์ด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 15 ฉบับที่ 1 มกราคม - มิถุนายน 2564
20. ภัทรวรรณ คงอิม ญัฐนิชา หอมตา สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ สุมาลี พิมพันธ์. 2564. การวิเคราะห์ แคริโอไทป์และอิตีโอแกรมมาตรฐานของปลาสดหางดาบและปลาเซลฟีนมอลลี. แก่นเกษตร 48 (ฉบับพิเศษ1): 121-124.
21. ภาณุมาศ ขวัญทอง ภิราพร วงศ์บุญจันทร์ สุมาลี พิมพันธ์ และ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง. 2564. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ป่าในจังหวัดเพชรบูรณ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล อาร์เอฟดี. แก่นเกษตร 48 (ฉบับพิเศษ1): 342-347.
22. รัชชา อินแนน กมลทิพย์ แก้วแสง สุมาลี พิมพันธ์ และ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง. 2564. การศึกษา เซลล์พันธุศาสตร์ของกบเขาหลังตอมลาญและกบชะง่อนผาใต้. แก่นเกษตร 48 (ฉบับพิเศษ1): 116-120.
23. Hutem A. and **Aiumsamang S.** 2014. Correlation Function of Gaussian-Sine Asymmetric Potential by Shooting Method. Advance Studies in Theoretical Physics; Vol. 8,2014, no 19, 825 – 830.
24. Srisuvoramas, B., **Aiumsamang, S.**, Piamalung, T., Sansenya, S. and Sripanom, L. 2015. DNA Barcodes for cultivar identification of Thailand *Tamarindus indica*. L. International Conference on Science and Technology. RMUTT. 149-152.
25. Srisuvoramas, B., **Aiumsumang, S.**, Pearmalung, T. and Srimuang, V. CES-38 The Effect of Acute Gamma Ray Irradiation through *Rbcl* Gene in Thai Sweet *Tamarindus indica*L. 2016. In TOKYO CONFERENCE PROCEEDINGS pp.47-60.
26. Phimphan S. and **Aiumsumang S.** 2019. Chromosomal characteristics of Taolor's stream frog (*Limnonectes taylori*) (Amphibia, Anura) from Thailand. The Nucleus. doi.org/10.1007/s13237-019-00291-2.
27. Phimphan, S. **Aiumsumang, S.**, Tanomtong, A. and Jantarat, S. 2020. Karyomorphological delineation and linear differentiation of microsatellite patterns, and meiosis in giant Asian river frog (*Limnonectes blyhii*) from Thailand. Nucleus <https://doi.org/10.1007/s13237-020-00315-2>
28. Kasiroek W., Phimphan, S., Pinthong, K., Suwannapoom, C., **Aiumsumang, S.**, Liehr, T., Supiwong, W. and Tanomtong, A., 2021. Comparative cytogenomic analysis of Cardinal fishesb (Perciformes, Apogonidae) from Thailand. The Nucleus.

<https://doi.org/10.1007/s13237-021-00352-5>

29. Thongnetr, W., **Aiumsumang, S.**, Kongkaew, R., Tanomtong, A., Suwannapoom, C. and Phimphan, S. 2021. Cytogenetic characterisation and chromosomal mapping of microsatellite and telomeric repeats in two gecko species (Reptilia, Gekkonidae) from Thailand. *Comparative Cytogenetic*. 15(1): 41-52.
doi:10.3897/compcytogen.v15i1.58208
30. **Aiumsumang S.**, Phimphan S., Suwannapoom C., Chaiyasan P., Supiwong W. and Tanomtong A. 2021. A comparative chromosome study on five Minnow fishes (Cyprinidae, Cypriniformes) in Thailand. *Caryologia* 74(1): 89-96.
doi: 10.36253/caryologia-1017
31. Phimphan S., **Aiumsumang S.** and Tanomtong A. 2021. Characterization of Chromosomal and Repetitive Elements in the Genome of “ *Rana nigrovittata*” (Anura, Ranidae): Revealed by Classical and Molecular Techniques. *Cytology and Genetics*. 55(6): 583–589.
32. Phimphan S., **Aiumsumang S.** and Tanomtong A. 2021. Classical Cytogenetics of Pearl Danio, *Danio albolineatus* (Cyprinidae, Cypriniformes): First Karyomorphological Report. *KKU Science Journal*. 49(2): 203-211.
33. Thongnetr, W., **Aiumsumang, S.**, Tanomtong, A. and Phimphan, S. 2022. Classical chromosome features and microsatellites repeat in Gekko petricolus (Reptilia,Gekkonidae) from Thailand. *Caryologia* 75(2) : 81-88. doi: 10.36253/caryologia-1544

ประวัติผู้วิจัยร่วม

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิมพันธ์
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Asst. Prof. Dr. Sumalee Phimphan
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 1410100065496
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. เวลาที่ใช้ทำวิจัย (16 ชั่วโมง : สัปดาห์)
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
email: joodoof@gmail.com โทร. 056-717122 ต่อ 4507
6. ประวัติการศึกษา

- วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2554
- วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2556
- ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปร.ด.) สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2559

7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
สาขา พันธุศาสตร์เซลล์ (Cytogenetic) และพันธุศาสตร์โมเลกุล (Molecular Genetic)
ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1. **สุมาลี พิมพันธ์ และศุภิกรณ์ อธิบาย.** 2011. ความหลากหลายและความชุกชุมของไรโบโซมในบ่อบำบัดน้ำเสีย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ใน งานประชุมวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีการศึกษา 2553. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. [โปสเตอร์]
2. **Phimphan, S.** and Tanomtong, A. 2012. Standardized Karyotype and Idiogram of Common Indian Toad, *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799) by Conventional Staining and Ag-NOR banding Techniques. In: The 6th Graduate Research Conference. pp. 325-334. Udon Thani Rajabhat University, Udon Thani. [Presentation and full paper proceeding]
3. **Phimphan, S.**, Sangpakdee, W., Supiwong, W., Patawang, I., Tanomtong, A. 2015. Cytogenetics study and characterization of microsatellites d(CGG)₁₀, d(CA)₁₅ and telomeric regions in the genome of Blacktail snapper, *Lutjanus fulvus* (Perciformes, Lutjanidae). In: The 19th National Genetics Conference 2015 –Genetics and Genomics “ from Molecular Studies to Applications” . pp. 78-84. Centara Hotel & Convention Centre, Khon Kaen. [Presentation and full paper proceeding]
4. **สุมาลี พิมพันธ์ และ สุรเชษฐ เอี่ยมสำออง.** 2562. โครโมโซมของอังกরายหัวใหญ่ (*Xenophrys major*) ด้วยการย้อมสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบ NOR. รายงานสืบเนื่องการประชุมสัมมนาวิชาการระดับชาติเครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 19. หน้า 73-80. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่
5. สุรางคณา แสงเอี่ยม ศิลาภรณ์ สุนทรรักษ์ **สุมาลี พิมพันธ์ และ สุรเชษฐ เอี่ยมสำออง.** 2562. การใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวในจังหวัดเพชรบูรณ์. รายงานสืบเนื่องการประชุมสัมมนาวิชาการระดับชาติเครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 19. หน้า 17-25. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่.

6. สลันญา สอนสุภาพ เจนจิรา เชื้อบุญจันทร์ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ **สุมาลี พิมพันธ์**. 2562. โครโมโซมของปลาอีสกเทศ (*Labeo rohita*) และปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) ในจังหวัดเพชรบูรณ์. รายงานสืบเนื่องการประชุมสัมมนาวิชาการระดับชาติเครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 19. หน้า 109-119. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่.
7. สุปรียา ศิริวารินทร์ บุษยาแก้วย้อย สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ **สุมาลี พิมพันธ์**. 2563. โครโมโซมตักแตนลิงจุดเชื่อมและตักแตนหน้าเอียงขาสี่ฟ้าจากจังหวัดเพชรบูรณ์. รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 6. หน้า 324-332. มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว) จ.พิษณุโลก.
8. อารียา แสงลาภ อีรพงษ์ ขุนเกี่ยม สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ **สุมาลี พิมพันธ์**. 2563. โครโมโซมจิ้งหรีดทองคำ จิ้งหรีดทองแดง และจิ้งโกร่งในจังหวัดเพชรบูรณ์. รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 6. หน้า 349-358. มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว) จ.พิษณุโลก.
9. ณัฐฉินันท์ วันเพ็ญ อาภาณุช วังศิริ **สุมาลี พิมพันธ์** และ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง. 2563. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของตักแตนโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด. รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 6. หน้า 333-340. มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว) จ.พิษณุโลก.
10. รัชชา อินแนน กมลทิพย์ แก้วแสง **สุมาลี พิมพันธ์** และ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง. 2564. การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของกบหลังตองมลายูและกบชะง่อนผาใต้. วารสารแก่นเกษตร ฉบับเพิ่มเติม 1: 116-120.
11. ภัทรวรรณ คงอิม ณัฐนิชา หอมตา สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ **สุมาลี พิมพันธ์**. 2564. การวิเคราะห์แคโรไทป์และอิดีโอแกรมมาตรฐานของปลาสดหางดาบและปลาเซลฟีนมอลลี. วารสารแก่นเกษตร ฉบับเพิ่มเติม 1: 121-125.
12. สุธิศา ปานนูน **สุมาลี พิมพันธ์** และ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง. 2565. ความหลากหลายทางพันธุกรรมมะม่วง (*Mangifera indica* L.) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์. รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 7 (วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2565). หน้า 283 - 289. มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว) จ.พิษณุโลก.
13. เกวลี นนทะภา สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ **สุมาลี พิมพันธ์**. 2565. การศึกษาโครโมโซมของปลาตุกอุย (*Clarias macrocephalus*) และปลาตุกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*). รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 7 (วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2565). หน้า 355 - 360. มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว) จ.พิษณุโลก.

14. นิภาพร คำตก สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน และ **สุมาลี พิมพันธ์**. 2565. การวิเคราะห์แคโรไทป์ของอิ่งน้ำนอง (*Occidozyga martensii*) อิ่งชาคำ (*Microhylla pulchra*) และอิ่งหลังจุด (*Micryletta inornata*) ด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดา. รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติพืบลสงครามวิจัย ครั้งที่ 7 (วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2565). หน้า 403 - 410. มหาวิทยาลัยราชภัฏพืบลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว) จ. พืชนโลก.
15. ณัฐวุฒิ วิชิตนาค **สุมาลี พิมพันธ์** และสุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน. 2565. การจำแนกสายพันธุ์ของไผ่ที่เจริญเติบโตในจังหวัดเพชรบูรณ์โดยใช้เทคนิค RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD). รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติพืบลสงครามวิจัย ครั้งที่ 7 (วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2565). หน้า 361 - 366. มหาวิทยาลัยราชภัฏพืบลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว) จ.พืชนโลก.
16. เบญจมาพร ณะกองแก้ว สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน และ **สุมาลี พิมพันธ์**. 2566. การศึกษาโครโมโซมของอิ่งกรายหัวแหลม (*Pelobatrachus nasuta*) อิ่งกรายหัวมน (*Xenophrys aceras*) และอิ่งแม่หนาว (*Microhylla berdmorei*). ในการประชุมวิชาการระดับชาติพะเยาวิจัย 12 (25-27 มกราคม 2566) หน้า 1-11. ณ มหาวิทยาลัยพะเยา จ.พะเยา.
17. ดารินทร์ สาพู สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน และ **สุมาลี พิมพันธ์**. (2566). การวิเคราะห์แคโรไทป์ของปาดเขียวตีนดำ (*Rhacophorus nigropalmatus*) และปาดกระป้า (*Raorchestes parvulus*). ในการประชุมวิชาการระดับชาติพะเยาวิจัย 12 (25-27 มกราคม 2566) หน้า 12-20. ณ มหาวิทยาลัยพะเยา จ.พะเยา.
18. จักรกริช กาจันทร์ **สุมาลี พิมพันธ์** และ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาฉิว โดยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์. ในการประชุมวิชาการระดับชาติพะเยาวิจัย 12 (25-27 มกราคม 2566) หน้า 31-37. ณ มหาวิทยาลัยพะเยา จ.พะเยา.
19. **Phimphan, S.**, Tanomtong, A., Chuaynkern, Y., Pratumtong, D. 2015. Karyological Analysis of Red Junglefowl (*Gallus gallus gallus* Linnaeus, 1758) Using Egg Fibroblastic Cell Culture. *KKU Science Journal* 43(1): 39-48. (T-JIF 0.134, 2557)
20. **Phimphan, S.**, Supiwong, W. and Khakhong, S. 2015. Standardized Karyotype and Idiogram of False Clown Anemonefish, *Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830 (Amphiprioninae, Perciformes). *Journal of Fisheries Technology Research* 9(1): 43-52. (T-JIF 0.078, 2557)
21. ศิริพร แสนศักดิ์, อลงกลด แทนอมทอง, **สุมาลี พิมพันธ์** และ อิสสระ ปะทะวัง. 2560. พันธุศาสตร์เซลล์ของแมวดาว (*Prionailurus bengalensis*) ในประเทศไทยด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบบอร์. *วารสารวิทยาศาสตร์ คชสาส์น* 39(2): 96-108.

22. **สุมาลี พิมพันธ์** วิวรรณ แสงภักดี กฤติยา แสงภักดี และ อลงกลด แทนอมทอง. 2560. โครโมโซมและการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของตั๊กแตนสีน้ำตาล (*Cyrtacanthacris tatarica* Linnaeus, 1758) ในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. KKU Science Journal 43(1): 469-477. (T-JIF 0.134, 2557)
23. **สุมาลี พิมพันธ์** และ วิวรรณ แสงภักดี. 2561. แคริโอไทป์ของตั๊กแตนข้าวปึกสั้น (*Pseudoxya Diminuta* Walker, 1871) ในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี 14(2): 38-44.
24. สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ **สุมาลี พิมพันธ์**. 2561. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR. เกษตร 47 (ฉบับพิเศษ1): 604-610.
25. สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ **สุมาลี พิมพันธ์**. 2563. การใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยาสูบ 9 สายพันธุ์. เกษตร 48 (43). 515-524.
26. **Phimphan, S.**, Rojrung R., Aiumsumang, S., Koomsab, K. and Tanomtong, A. 2020. Karyological Analysis of Lesser Bamboo Rat, *Cannomys badius* (Rodentia, Rhizomyinae) by Classical and Molecular Cytogenetic Techniques. KKU Science Journal 48(3): 318-325.
27. **สุมาลี พิมพันธ์** สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และกาญจน์ คุ่มทรัพย์ 2564. แคริโอไทป์และอิดิโอแกรมของปลาก้างจากจังหวัดเพชรบูรณ์ด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดาและแบนเนอร์. วารสารวิจัยและเทคโนโลยีการประมง 15 (1): 37-47
28. **สุมาลี พิมพันธ์** สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ อลงกลด แทนอมทอง. 2021. รายงานครั้งแรกทางพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาซิวใบไม้แถบขาว (*Danio albolineatus*). วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 49(2): 203-211.
29. ณัฐริการ์ นวลศรี นภัส นุ่มสกุล **สุมาลี พิมพันธ์** สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง. 2565. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ 1(2): 60-67.
30. Aiumsumang, S., **Phimphan, S.**, Tanomtong, A. and Supiwong, W. 2022. Chromosome study of *Rasbora trilineata* and *Rasbora borapetensis* (Cyprinidae, Cypriniformes): Reveal by conventional staining technique. Science Technology and Engineering Journal 8(2): 29-39.
31. **สุมาลี พิมพันธ์** และ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง. 2565. การศึกษาโครโมโซมและลักษณะการแบ่งเซลล์ของตั๊กแตนหนวดยักษ์ไฮโรไกลฟัส (*Hieroglyphus banian*). วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ 1(1): 23-28.
32. **Phimphan, S.**, Tanomtong, A., Patawang, I., Kaewsri, S., Jantararat, S. and Sanoamuang, L. 2013. Cytogenetic Study of Northeastern Butterfly Lizard, *Leiolepis reevesii rubritaeniata*

- (Squamata, Agamidae) in Northeast Thailand. *Cytologia* 78(2): 133-140. 80(2): 167-172. [IF 0.913 (2016), Q4].
33. Siripiyasing, P., Tanomtong, A., Jumrusthanasan, S., Patawang, I., **Phimphan, S.**, Sanoamuang, L. 2013. First cytogenetic study of Malayan snail-eating turtle, *Malayemys macrocephala* (Testudines, Geoemydidae) in Thailand. *Cytologia* 78(2): 125-132. [IF 0.913 (2016), Q4].
34. **Phimphan, S.**, Tanomtong, A., Jumrusthanasan, S., Supiwong, W., Siripiyasing, P. and Sanoamuang, L. 2013. First Report of NOR Polymorphism and Chromosome Analysis of John's Snapper, *Lutjanus johnii* (Perciformes, Lutjanidae) in Thailand. *Cytologia* 78(4): 335-344. [IF 0.913 (2016), Q4].
35. Patawang, I. , Tanomtong, A. , **Phimphan, S.** , Chuaynkern, Y. , Chuaynkern, C. , Phaengphairee, P., Khruanet, W., Nithikulworawong, N. 2014. The identification of sex-chromosomes and karyological analysis of rice frog, *Fejervarya limnocharis*, (Anura, Ranidae) from northeast Thailand. *Cytologia* 79(2): 141-150. [IF 0.913 (2016), Q4].
36. **Phimphan, S.**, Tanomtong, A., Supiwong, W., Khongcharoensuk, H., Suvarnaraksha, A. and Kaewsri, S. 2014. Karyological analysis of the Barramundi, *Lates calcarifer* (Perciformes, Latidae). *Cytologia* 80(2): 167-172. [IF 0.913 (2016), Q4].
37. Sangpakdee, W. **Phimphan, S.** , Tanomtong, A. , Patawang, I. , Pinthong, K. and Neeratanaphan, L. 2015. Karyological study of *Lutjanus ehrenbergii* and *L. carponotatus* (perciformes, lutjanidae) by classical and Ag-NOR staining techniques. *Nucleus* 59(1): 53-59. (SCOPUS, SNIP 0.620, 2014)
38. Patawang, I., Pinthong, K., **Phimphan, S.**, Chuaynkern, Y., Duengkae, P., Tanomtong, A. 2016. Karyological characteristics of the Koh Tao caecilian, *Ichthyophis kohtaoensis* (Amphibia: Gymnophiona: Ichthyophiidae) by conventional staining and Ag-NOR banding techniques. *Rendiconti Lincei-Scienze Fisiche e Naturali*; DOI: 10.1007/s12210-016-0534-6 [IF 0.750 (2014), Q4].
39. Sangpakdee, W., **Phimphan, S.**, Liehr, T., Fan, X., Pinthong, K., Patawang, I., Tanomtong, A. 2016. Characterization of chromosomal rearrangements in pileated gibbon (*Hylobates pileatus*) using multiplex-FISH technique. *The Nucleus* 59(2) : 131-135. DOI: 10.1007/s13237-016-0171-6 (SCOPUS SNIP 0.620, 2014)

40. **Phimphan, S.**, Sangpakdee, W., Sangpakdee, K. and Tanomtong A. 2016. Chromosomal analysis and meiosis studies of *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acrididae) from Thailand. *The Nucleus*. 60(1): 9-15 (SCOPUS SNIP 0.620, 2014)
41. Sangpakdee, W., **Phimphan, S.**, Tengjaroenkul, B., Pinthong, K., Neeratanaphan, L. and Tanomtong, A. 2017. Cytogenetics Study of Three Microhylid Species (Anura, Microhylidae) from Thailand. *Cytologia* 82(1): 67-74. [IF 0.913 (2016), Q4].
42. Patawang, I., Tanomtong, A., **Phimphan, S.**, Pinthong, K., Neeratanaphan, L. 2017. Standardized karyotype and idiogram of Bengal monitor lizard, *Varanus bengalensis* (Squamata, Varanidae). *Cytologia* 82(1): 75-82. [IF 0.913 (2016), Q4].
43. **Phimphan, S.**, Supiwong, W., Tanomtong, A., Pinthong, K., Sangpakdee W. and Kaewsri, S. 2017. Karyotypic Study of Five Lutjanid Species Using Conventional and Ag-NORs Banding Techniques. *Cytology and Genetics* 51(4): 315–324. [IF 0.324 (2016), Q4].
44. Rattanayuvakorn, S., Tanomtong, A., **Phimphan, S.**, Sangpakdee, W., Pinmongkhonkul, S. and Phintong, K. 2017. Karyological Study of Tusker and Tuskless Male Asian Elephant (*Elephas maximus*) by Conventional, GTG-, and Ag-NOR Banding Techniques. *Cytologia* 82(4): 349–354. [IF 0.913 (2016), Q4].
45. Supiwong, W., **Phimphan, S.**, Kaewmad, P., Saenjundaeng, P., Jantarat, S. and Tanomtong, A. 2017. First Cytogenetic Study of the Whitecheek Monocle Bream, *Scolopsis vosmeri* (Perciformes, Nemipteridae) from Thailand. *Cytologia* 82(5): 481-484. [IF 0.913 (2016), Q4].
46. Supiwong, W., Getlakha, N., Chaiphech, S., Pinthong, K., **Phimphan, S.** and Tanomtong, A. 2018. Nucleolar Organizer Regions Polymorphism and Karyological Analysis of Black Lancer, *Bagrichthys majusculus* (Siluriformes, Bagridae) in Thailand. *Cytologia* 83(2): 193–199. [IF 0.913 (2016), Q4].
47. **Phimphan, S.**, Tanomtong, A., Saengphan, N. and Sangpakdee, W. 2018. The First Karyological Study in Freshwater Prawn, *Macrobrachium lanchesteri* (Decapoda, Palaemonidae) from Thailand. *Nucleus* 62: 77-82. [SCOPUS SNIP 0.620 (2014)]
48. Saenjundaeng, P., Oliveira, A.E., Tanomtong, A., Supiwong, W., **Phimphan, S.**, Collares-Pereira, M.J., Sember, A., Yano, C.F., Hatanaka, T., ; Bertollo, L.A.C., Rab and Cioffi, M.B. 2018. The Asian paleotetraploid cyprinid fishes: Chromosomal investigations in two

- endangered species of the small Probarbini tribe. PLOS ONE. doi.org/10.1186/s13039-018-0399-8. [IF 2.806 (2016)]
49. Supiwong, W., Getlakha, N., Chaiphech, S., Pinthong, K., **Phimphan, S.** and Tanomtong, A. 2018. Nucleolar Organizer Regions Polymorphism and Karyological Analysis of Black Lancer, *Bagrichthys majusculus* (Siluriformes, Bagridae) in Thailand. Cytologia 83(2): 193–199
 50. Supiwong, W., Pinthong, K., Seetapan, K., Sanjundaeng, P., Oliveira, E.A., Yano, C.F., Liehr, T., **Phimphan, S.**, Tanomtong, A., Cioffi, M.B. 2019. Karyotype diversity and evolutionary trends in the Asian swamp eel *Monopterus albus* (Synbranchiformes, Synbranchidae). A biodiversity approach on 22 allopatric populations. BMC Evolutionary Biology. 19: 73. doi.org/10.1186/s12862-019-1393-4 [IF 3.221 (2016)].
 51. **Phimphan, S.** and Aiumsumang, S. 2019. Karyotype Analysis of Taolor's stream frog (*Limnonectes taylori*) (Amphibia, Anura) by conventional straining and Ag-NOR banding techniques from Thailand. The Nucleus. doi.org/10.1007/s13237-019-00291-2 0399-8. [IF 2.806 (2016)]
 52. **Phimphan, S.**, Aiumsumang, Tanomtong, A. and Jantararat, S. 2020. Karyomorphological delineation and linear differentiation of microsatellite patterns, and meiosis in giant Asian river frog (*Limnonectes blythii*) from Thailand. Nucleus 64(2) : 249-254 <https://doi.org/10.1007/s13237-020-00315-2>
 53. Pissaparn, M., **Phimphan, S.**, Chaiyasan, P., Tanomtong, A., Liehr, T., Suwannapoom, C., Reungsing, M. and Supiwong, W. 2020. First chromosome analysis of Thai pufferfish *Pao cochinchinensis* (Steindachner, 1866). Biodiversitas 21(9): 4309-4316.
 54. **Phimphan, S.**, Chaiyasan, P., Suwannapoom, C., Reungsing, M., Juntaree, S., Tanomtong, A. and Supiwong W. 2020. Comparative karyotype study of three Cyprinids (Cyprinidae, Cyprininae) in Thailand by classical cytogenetic and FISH techniques. Comparative Cytogenetic 14(4): 597–612.
 55. **Phimphan, S.**, Aiumsumang, S. and Tanomtong, A. 2021. Characterization of Chromosome and Repetitive elements in the Genome of Frog *Rana nigrovittata* (Anuran, Ranidae) from Thailand: Revealed by conventional, Ag-NOR banding, C-banding and FISH techniques. Cytology and Genetics. Cytology and Genetics 55(6): 583-589.

56. Thongnetr, W., Aiumsumang, S., Kongkaew, R., Tanomtong, A., Suwannapoom, C. and **Phimphan, S.** 2021. Cytogenetic characterisation and chromosomal mapping of microsatellite and telomeric repeats in two gecko species (Reptilia, Gekkonidae) from Thailand. *Comparative Cytogenetic*. 15(1): 41-52. doi:10.3897/compcytogen.v15i1.58208
57. Kasiroek W., **Phimphan, S.**, Pinthong, K., Suwannapoom, C., Aiumsumang, S., Liehr, T., Supiwong, W., Tanomtong, A., 2021. Comparative cytogenomic analysis of Cardinal fishes (Perciformes, Apogonidae) from Thailand. *The Nucleus*. <https://doi.org/10.1007/s13237-021-00352-5>
58. Aiumsumang S., **Phimphan S.**, Suwannapoom C., Chaiyasan P., Supiwong W., Tanomtong A 2021. A comparative chromosome study on five Minnow fishes (Cyprinidae, Cypriniformes) in Thailand. *Caryologia* 74(1): 89-96. doi: 10.36253/caryologia-1017
59. Chaiyasan, P., **Phimphan, S.**, Sarasan, T., Juntaree, S., Tanomtong, A., Pinmongkhonkul, S., & Supiwong, W. (2021) . First report on Nucleolar Organizer Regions (NORs) polymorphism and constitutive heterochromatin of Moonlight Gourami, *Trichopodus microlepis* (Perciformes, Osphronemidae) . *Caryologia*, 74(2) , 111-119. <https://doi.org/10.36253/caryologia-775>
60. Thongnetr, W., Aiumsumang, S., Tanomtong, A. and **Phimphan, S.** 2022. Classical chromosome features and microsatellites repeat in *Gekko petricolus* (Reptilia, Gekkonidae) from Thailand. *Caryologia* 75(2): 81-88. doi: 10.36253/caryologia-1544
61. Chaiphech, S., Patawang, I, **Phimphan, s.**, Ditcharoen, S. Suwannapoom, C. and Tanomtong. 2022. Cytotoxic Evaluation of *Eurycoma longifolia* Jack Root Extract on Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes *In vitro*. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology* 7(2) DOI: 10.22146/jtbb.70543
62. Aiumsumang, S., Chaiyasan, P., Khoomsab, K., Supiwong, W., Tanomtong, A., and Phimphan, S. (2022) . Comparative chromosome mapping of repetitive DNA in four minnow fishes (Cyprinidae, Cypriniformes). *Caryologia*, 75(2), 71–80.
63. Thongnetr, W. , Prasopsin, S. , Aiumsumang, S. , Ditcharoen, S. , Tanomtong, A. , Wongchantra, P., Bunnaen, W. and **Phimphan, S.** 2023. First report of chromosome and karyological analysis of *Gekko nutaphandi* (Gekkonidae, Squamata) from Thailand: Neo-diploid chromosome number in genus *Gekko*. *Caryologia*, 75(4) . 103-109. <https://doi.org/10.36253/caryologia-1875>