# การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ *(Nephelium lappaceum)* ด้วยเทคนิค SRAP

# GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF RAMBUTAN *(Nephelium lappaceum)* USING SRAP


เจนจิรา อรทัยวัฒนากุล
พรชนก วรพันธโยธิน
สุวิมล บุญสนอง


โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

# การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ (*Nephelium lappaceum*) ด้วยเทคนิค SRAP

# GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF RAMBUTAN (*Nephelium lappaceum*) USING SRAP

เจนจิรา อรทัยวัฒนากุล
พรชนก วรพันธโยธิน
สุวิมล บุญสนอง

b.0026587 7
i.....
TB00204

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF RAMBUTAN (*Nephelium lappaceum*) USING SRAP

JANEJIRA ORATAIWATTANAKUL
PORNCHANOK WORAPANTAYOTHIN
SUWIMON BOONSANONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ (*Nephelium lappaceum*) ด้วยเทคนิค SRAP<br>Genetic diversity analysis of Rambutan (*Nephelium lappaceum*) using SRAP |
| **ชื่อนักศึกษา** | นางสาวเจนจิรา อรทัยวัฒนากุล รหัสนักศึกษา 55051069<br>นางสาวพรชนก วรพันธโยธิน รหัสนักศึกษา 55051131<br>นางสาวสุวิมล บุญสนอง รหัสนักศึกษา 55051208 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยา |
| **ปีการศึกษา** | 2558 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม |

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2558

| คณะกรรมการสอบ | ลายมือชื่อ |
|---|---|
| ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม<br>ประธานกรรมการ | |
| ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์<br>กรรมการ | |
| ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม<br>กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา | |

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อโครงงานพิเศษ** การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ (*Nephelium lappaceum*) ด้วยเทคนิค SRAP

**ชื่อนักศึกษา** นางสาวเจนจิรา อรทัยวัฒน์กุล รหัสนักศึกษา 55051069
นางสาวพรชนก วรพันธโยธิน รหัสนักศึกษา 55051131
นางสาวสุวิมล บุญสนอง รหัสนักศึกษา 55051208

**ปริญญา** วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

**ภาควิชา** ชีววิทยา

**คณะ** วิทยาศาสตร์

**มหาวิทยาลัย** สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

**ปีการศึกษา** 2558

**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

## บทคัดย่อ

เงาะ (*Nephelium lappaceum*) เป็นหนึ่งในผลไม้ที่ได้รับความนิยมในประเทศไทย ในการปรับปรุงพันธุ์ทำให้เกิดลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม มีข้อมูลเกี่ยวกับเงาะอยู่น้อยมาก งานศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเงาะ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์บริเวณยีน *ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase /oxygenase* Large subunit (*rbc*L) และเทคนิค Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) โดยเก็บตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี และสวนละอองฟ้า จังหวัดนครนายก ผลการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 860 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI พบว่ายีน *rbc*L ไม่สามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะในระดับสปีชีส์ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เงาะที่ผ่านการคัดเลือก 13 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยใช้ 5 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นทั้งหมด 93 แถบ โดยเป็น polymorphic bands 50 แถบคิดเป็น 53.76 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.11X และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี simple matching พบว่าค่าที่ได้อยู่ในช่วง 0.75-0.91

**คำสำคัญ :** ความหลากหลายทางพันธุกรรม เงาะ ลำดับนิวคลีโอไทด์ SRAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Title** | Genetic diversity analysis of Rambutan (*Nephelium lappaceum*) using SRAP |
| **Students** | Miss Janejira Orataiwattanakul Student ID 55051069 |
| | Miss Pornchanok Worapantayothin Student ID 55051131 |
| | Miss Suwimon Boonsanong Student ID 55051208 |
| **Degree** | Bachelor of Science (Biotechnology) |
| **Department** | Biology |
| **Faculty** | Science |
| **University** | King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) |
| **Academic Year** | 2015 |
| **Advisor** | Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim |


## Abstract


The rambutan (*Nephelium lappaceum*) is one of the popular fruits in Thailand. The great morphological variation is observed among cultivar improvement. However, there are few available informations about this plant. So, the objective of this work was to determine the diversity and genetic relationships of rambutan based on molecular markers obtained from Chanthaburi Horticultural Research Center, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi Province and Laongfah Orchard, Nakorn Nayok Province. The DNA sequences of chloroplast on *ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase /oxygenase* Large subunit (*rbc*L) genes and Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) were studied. PCR product was fully amplified to 860 bp in size. Four sequences were aligned and compared with public sequences available in the GenBank database from NCBI. The results present the nucleotide sequence of *rbc*L gene could not identity in species level of rambutan. For SRAP marker were used to estimate genetic diversity among 13 from 20 samples of rambutan. The SRAP results showed that 5 selected primer combinations generated 93 amplified bands, of which 50 were polymorphic (53.76%). The genetic relationship was analyzed using Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average (UPGMA) by NTSYSpc software version 2.11X, and the similarity coefficients were calculated using simple matching ranging from 0.75-0.91.


**Keyword :** Genetic diversity, Rambutan, Sequence, SRAP

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ที่ได้รับการคุ้มครองตามกฎหมาย ได้รับอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และคอยช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษเป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ และ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณสวนละอองฟ้า จังหวัดนครนายก ศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี และมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างพืชที่นำมาใช้ในการศึกษา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับการทดลองในโครงงานพิเศษนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบิดา มารดา ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ ที่มีส่วนช่วยในการสนับสนุนเป็นกำลังใจ และสร้างบรรยากาศที่ดีเสมอมาตลอดการทำโครงงานพิเศษนี้ จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เจนจิรา อรทัยวัฒนากุล
พรชนก วรพันธโยธิน
สุวิมล บุญสนอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
**บทที่ 1 บทนำ** ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ ..... 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ ..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 2
**บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** ..... 3
2.1 เงาะ ..... 3
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเงาะ ..... 3
2.1.2 แหล่งที่มาและประวัติ ..... 3
2.1.3 สายพันธุ์เงาะที่นิยมปลูกเพื่อการค้า ..... 4
2.2 เทคนิค SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) ..... 6
2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ ..... 7
2.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbc*L (*ribulose bisphosphate carboxylase/oxygen* Large subunit) ..... 8
**บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย** ..... 9
3.1 การเก็บตัวอย่าง ..... 9
3.2 อุปกรณ์ ..... 10
3.2.1 การเก็บตัวอย่าง ..... 10
3.2.2 การสกัด การวัดปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอ ..... 10
3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ และ SRAP ..... 11
3.2.4 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ..... 11
3.2.5 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย GF-1 AmbiClean Kit ..... 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


3.3 สารเคมี ..... 11
3.3.1 การสกัด การวัดปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอ ..... 11
3.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ และ SRAP ..... 12
3.3.3 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ..... 13
3.4 วิธีการทดลอง ..... 13
3.4.1 การศึกษาลักษณะของใบ ..... 13
3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชโดยใช้วิธี CTAB ..... 13
3.4.3 การตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอ ..... 14
3.4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ในบริเวณยีน *rbc*L ..... 15
3.4.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP ..... 15
3.4.6 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GF-1 AmbiClean Kit ..... 16
3.4.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ..... 17
**บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล** ..... 18
4.1 ผลการศึกษาลักษณะของใบ ..... 18
4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล ..... 19
4.2.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน *rbc*L ..... 19
4.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP ..... 24
4.2.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP ..... 25
**บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ** ..... 29
5.1 สรุปผลการวิจัย ..... 29
5.2 ข้อเสนอแนะ ..... 30
เอกสารอ้างอิง ..... 31
ภาคผนวก ..... 34
ภาคผนวก ก ..... 35
ภาคผนวก ข ..... 39


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


ตารางที่ หน้า

3.1 ชื่อตัวอย่าง สายพันธุ์ และแหล่งที่มาของเงาะที่ใช้ในการศึกษา..... 9

3.2 ชนิดไพรเมอร์ ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในเทคนิค SRAP..... 12

4.1 การจัดกลุ่มของตัวอย่างตามลักษณะของใบเงาะ..... 18

4.2 ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอ และจำนวน polymorphic bands ของเงาะ 13 ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP ..... 25


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | ผลเงาะพันธุ์โรงเรียน | 4 |
| 2.2 | ผลเงาะพันธุ์สีชมพู | 5 |
| 2.3 | ผลเงาะพันธุ์พลิ้ว 3 | 6 |
| 4.1 | แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน *rbc*L | 19 |
| 4.2 | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ในตัวอย่าง LM01, LM05, LM09 และ LM13 โดยใช้ไพรเมอร์ *rbc*lN และ *rbc*L840R | 20 |
| 4.3 | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ในตัวอย่าง LM01, LM05, LM09 และ LM13 เปรียบเทียบกับเงาะขนสั้น (*N. mutabile*) | 22 |
| 4.4 | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ในตัวอย่าง LM01, LM05, LM09 และ LM13 เปรียบเทียบกับเงาะ (*N. lappaceum*) จากฐานข้อมูล NCBI | 23 |
| 4.5 | ดีเอ็นเอโปรไฟล์ของเงาะที่ได้จากการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค SRAP (1) ไพรเมอร์ Me1-Em1 (2) ไพรเมอร์ Me1-Em3 | 24 |
| 4.6 | แสดงลักษณะผล (1) ลักษณะเนื้อ (2) ของเงาะพันธุ์โรงเรียน | 25 |
| 4.7 | แสดงลักษณะผล (1) ลักษณะเนื้อ (2) ของเงาะพันธุ์สีชมพู | 26 |
| 4.8 | แสดงลักษณะผล (1) ลักษณะเนื้อ (2) ของเงาะพันธุ์พลิ้ว 3 | 27 |
| 4.9 | เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิค SRAP ของเงาะ 13 ตัวอย่าง | 28 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

เงาะ (Rambutan) ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Nephelium lappaceum* อยู่ในวงศ์ Sapindaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับลิ้นจี่และลำไย มีรสหวานอมเปรี้ยว (พีรศักดิ์, 2544) มีถิ่นกำเนิดในคาบสมุทรมลายูทางเขตที่ราบตะวันตก จากนั้นจึงแพร่ขยายไปในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศเขตร้อนอื่นๆ เช่น ศรีลังกา และไปไกลถึงเกาะซานซิบาร์ ทวีปแอฟริกา ชาวมลายูเรียกผลไม้ชนิดนี้ว่า "rambut" หมายถึง "ผม" หรือ "ขน" ต่อมามีการเรียกเพี้ยนไปเป็น "rambutan" เงาะจากมลายูนำเข้ามาปลูกทางภาคใต้ของประเทศไทย แต่ไม่มีหลักฐานแน่ชัดว่าตั้งแต่เมื่อใด (นิดดา, 2550) เงาะที่พบอยู่ในประเทศไทยมีมากกว่า 10 สายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่นิยมปลูกเพื่อการค้า ได้แก่ พันธุ์โรงเรียน และพันธุ์สีชมพู ส่วนตัวอย่างสายพันธุ์ที่ไม่นิยมปลูก หรือไม่เป็นที่รู้จัก เช่น พันธุ์สีทอง เจ๊ะมง น้ำตาล กรวด บางยี่ขัน ชาลังงอ อากร สีนาก สีชาด ปีนัง และตาวี เป็นต้น การรับประทานเงาะสดสามารถแก้อาการ ท้องร่วงชนิดรุนแรงได้ผลดี นอกจากนี้ น้ำที่ได้จากการต้มผลเงาะ สามารถนำมาเป็นยาแก้อักเสบฆ่าเชื้อแบคทีเรีย รักษาอาการอักเสบในช่องปาก และโรคบิดท้องร่วง แต่ในเมล็ดเงาะนั้นมีพิษ แม้ว่าจะเอาไปคั่วจนสุกแล้ว หากรับประทานเข้าไปมากๆ จะทำให้มีอาการปวดท้อง เวียนศีรษะ มีไข้ คลื่นไส้ และอาเจียน (นฤมล, 2552)

เงาะเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยม และมีผู้บริโภคกันอย่างแพร่หลาย ในปีหนึ่งๆ จะมีเงาะออกสู่ตลาดเพียงครั้งเดียว ด้านการตลาดของเงาะในช่วงแรกที่เงาะเริ่มออกสู่ตลาดราคาจะสูงมาก แต่เมื่อทยอยออกสู่ตลาดมากขึ้นราคาก็จะลดลงอย่างรวดเร็ว สำหรับการส่งเงาะออกจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศจะทำในรูปของเงาะสด และเงาะกระป๋อง การส่งเงาะแปรรูปชนิดนี้สามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศได้มูลค่านับหลายล้านบาทต่อปี (นฤมล, 2552)

เงาะเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย แต่ยังมีงานวิจัยจำนวนน้อยมากที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะด้วยเทคนิคทางโมเลกุล ซึ่งการใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการศึกษาจะทำให้ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือ เนื่องจากเป็นการศึกษาในระดับดีเอ็นเอ นอกจากนี้การทราบข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ และสามารถพัฒนาสายพันธุ์เงาะให้ดียิ่งขึ้น ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะโดยการศึกษาลักษณะของใบ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน *rbc*L (*ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase/oxygen* Large subunit) และการใช้เทคนิค SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ

## 1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เก็บตัวอย่างเงาะทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยรวบรวมจากศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี จำนวน 15 ตัวอย่าง มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรีจำนวน 2 ตัวอย่าง และสวนละอองฟ้า จังหวัดนครนายกจำนวน 3 ตัวอย่าง นำมาศึกษาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน *rbc*L และศึกษาลักษณะของใบ

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ

1.4.2 ใช้เป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของเงาะเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์และจำแนกสายพันธุ์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 เงาะ

### 2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเงาะ

เงาะ (Rambutan) ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Nephelium lappaceum* อยู่ในวงศ์ Sapindaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับลิ้นจี่และลำไย เป็นต้นไม้ขนาดกลางสูงราว 4-7 เมตร มีลักษณะเป็นพุ่มแผ่กว้าง ใบเรียงสลับ ใบประกอบแบบขนนก ไม่มีใบยอด มีใบย่อยถึง 6 ใบ ใบย่อยรูปไข่ เงาะเป็นไม้ผลที่ดอกเพศเมีย และดอกเพศผู้อยู่คนละต้น ในแปลงปลูกมีการเลือกปลูกเฉพาะต้นเพศเมียที่มีดอกเพศผู้ที่มีลักษณะสมบูรณ์เพียง 0.05-0.50 เปอร์เซ็นต์ แต่ก็จัดว่ามีปริมาณเพียงพอสำหรับการผสมเกสรในบริเวณที่มีผึ้งจำพวก Trigonoid และแมลงที่เป็นพาหะในการผสมเกสรอื่นๆ อาศัยอยู่ อย่างไรก็ตาม เงาะพันธุ์โรงเรียน และพันธุ์สีชมพูไม่มีดอกเพศผู้ จึงควรปลูกต้นเพศผู้เพื่อช่วยในการผสมเกสรตลอดจนการฉีดพ่นช่อดอกด้วยสารฮอร์โมนพืชเพื่อกระตุ้นให้มีการติดผลมาก (พีรศักดิ์, 2544) ผลของเงาะจะเกิดในช่อเดียวกันหลายๆ ผลติดอยู่บนก้านช่อดอก ลักษณะค่อนข้างกลมสีแดง และมีขนขึ้นปกคลุมอยู่ทั่วผล มีทั้งขนสั้นและยาวแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ เนื้อเงาะมีลักษณะใสอ่อนนุ่ม สีขาวอมเหลือง หุ้มเมล็ด เมล็ดเงาะมีลักษณะเป็นรูปแบนยาวรี หรือ กลมเป็นรูปไข่ ผิวด้านนอกจะห่อหุ้มด้วยผิวเปลือกบางๆ สีน้ำตาลอ่อน (นิดดา, 2550)

การรับประทานเงาะสดสามารถแก้อาการท้องร่วงชนิดรุนได้ผลดี นอกจากนี้ น้ำที่ได้จากการต้มผลเงาะ สามารถนำมาเป็นยาแก้อักเสบฆ่าเชื้อแบคทีเรีย รักษาอาการอักเสบในช่องปาก และโรคบิดท้องร่วง แต่ในเมล็ดเงาะนั้นมีพิษแม้ว่าจะเอาไปคั่วจนสุกแล้ว หากรับประทานเข้าไปมากๆ จะทำให้มีอาการปวดท้อง เวียนศีรษะ มีไข้ คลื่นไส้ และอาเจียน (นฤมล, 2552)

### 2.1.2 แหล่งที่มาและประวัติ

เงาะเป็นไม้ผลเมืองร้อน คนไทยเรียกผลไม้ชนิดนี้ว่า "เงาะ" เพราะมีลักษณะภายนอกของผลมีขนขึ้นตามเปลือกคล้ายกับผมบนหัวของคนป่าที่มีผมหยิกที่เราเรียกว่า "เงาะซาไก" เงาะมีถิ่นกำเนิดในคาบสมุทรมลายูทางเขตที่ราบตะวันตก จากนั้นจึงแพร่ขยายไปในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศเขตร้อนอื่นๆ เช่น ศรีลังกา และไปไกลถึงเกาะซานซิบาร์ ทวีปแอฟริกา ชาวมลายูเรียกผลไม้ชนิดนี้ว่า "rambut" หมายถึง "ผม" หรือ "ขน" ต่อมามีการเรียกเพี้ยนไปเป็น "rambutan" เงาะจากมลายูนำเข้ามาปลูกทางภาคใต้ของประเทศไทย แต่ไม่มีหลักฐานแน่ชัดว่าตั้งแต่เมื่อใด (นิดดา, 2550) เงาะที่พบอยู่ในประเทศไทยมีมากกว่า 10 สายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่นิยมปลูกเพื่อการค้า ได้แก่ พันธุ์โรงเรียนและพันธุ์สีชมพู ส่วนตัวอย่างสายพันธุ์ที่ไม่นิยมปลูก หรือไม่ค่อยเป็นที่รู้จัก เช่น พันธุ์สีทอง เจ๊ะมง น้ำตาลกรวด บางยี่ขัน ซาลังงอ อากร สีนาก สีชาด ปีนัง และตาวี เป็นต้น (นฤมล, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.3 สายพันธุ์เงาะที่นิยมปลูกเพื่อการค้า

2.1.3.1 พันธุ์โรงเรียน

เงาะสายพันธุ์นี้มีลักษณะทรงพุ่มค่อนข้างเลื้อย มีใบลักษณะเล็กและกลม ใบย่อยประมาณ 3-4 คู่ ก้านใบสั้น ปลายใบงอเล็กน้อย เปลือกผลอ่อนมีสีเหลืองอมชมพู เมื่อแก่จะมีสีแดงจัด โคนขนอ่อนมีสีเขียวอ่อน และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อโคนแก่จัด ปลายขนมีสีเขียวอ่อน เนื้อสีขาวขุ่นปนเหลือง เนื้อมีลักษณะย่นเล็กน้อย รสหวาน เนื้อกรอบ และร่อนจากเมล็ด เมล็ดแบนยาวรูปไข่เปลือกบางไม่แข็ง (นฤมล, 2552) ดังรูปที่ 2.1 คุณสมบัติเด่นของเงาะโรงเรียน คือ เป็นพันธุ์ที่มีรสชาติดีมาก แต่มีข้อเสีย คือ ไม่ทนต่อโรคจุดสนิม และต้องปลูกในพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง มีการให้ปุ๋ยและธาตุอาหารที่เพียงพอ และสม่ำเสมอ ที่สำคัญคือ ต้องมีน้ำเพียงพอในขณะที่ติดผล เพราะถ้าหากขาดน้ำในระยะที่ผลกำลังใกล้สุกผลจะแตก และร่วงหล่นเสียหายเป็นจำนวนมาก (กลุ่มเกษตรสัญจร, 2543)

เงาะโรงเรียน หรือ เงาะนาสาร เป็นพันธุ์เงาะที่นำมาจากประเทศมาเลเซีย โดยนาย เค หว่อง ซึ่งเป็นเจ้าของเหมืองแร่อยู่ในอำเภอนาสาร จังหวัดสุราษฎ์ธานี ได้นำมาปลูกไว้ในบริเวณบ้านเพื่อรับประทาน ต่อมานาย เค หว่อง ได้ขายที่ดินทำเหมืองแร่นั้นให้รัฐบาลเมื่อปี พ.ศ. 2497 และรัฐบาลได้ใช้พื้นที่นี้สร้างโรงเรียนบ้านนาสารขึ้น โดยมีเงาะที่นาย เค หว่อง ปลูกไว้ ต่อมาปี พ.ศ. 2580 ครูแย้ม พวงพันธุ์ ได้ทำการทาบกิ่งและตอนกิ่งจากต้นเงาะขายให้ชาวบ้านนำไปปลูก ชาวบ้านจึงตั้งชื่อเงาะนั้นว่า "เงาะโรงเรียน" หรือ "เงาะพันธุ์โรงเรียน" ตามสถานที่ที่ได้รับพันธุ์มา และเนื่องจากเงาะโรงเรียนมีรสชาติหวาน และกรอบดี จึงมีผู้นำพันธุ์ไปปลูกตามจังหวัดต่างๆ เช่น จังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช จันทบุรี และระยอง เป็นต้น (นฤมล, 2552)

**รูปที่ 2.1** ผลเงาะพันธุ์โรงเรียน
(ที่มา : รูปภาพโดย ธชาพล สมสิบ, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.2 พันธุ์สีชมพู

พันธุ์สีชมพู ต้นมีลักษณะทรงพุ่มค่อนข้างทึบมีใบยาว และหนากว่าเงาะโรงเรียน สีของใบเข้มน้อยกว่าขอบใบ และมีลักษณะห่อเข้าหากันเล็กน้อย ผลดก และมีขนยาว เมื่อผลสุกจะมีสีชมพู เปลือกหนา รสหวาน เนื้อร่อนจากเมล็ด ดังรูปที่ 2.2 เป็นพันธุ์ที่ปลูกง่าย มีการเจริญเติบโตดี ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศ (นฤมล, 2552) แต่ปัญหาที่พบคือ เก็บไว้ไม่ได้นาน เนื่องจากเปลือกและขนอ่อน บอบช้ำง่าย ไม่ทนทานต่อการขนส่งระยะไกล (กลุ่มเกษตรสัญจร, 2543)

**รูปที่ 2.2** ผลเงาะพันธุ์สีชมพู
(ที่มา : รูปภาพโดย ธชาพล สมสิบ, 2558)

2.1.3.3 พันธุ์สีทอง

พันธุ์สีทองเป็นพันธุ์ที่ทรงพุ่มมีการแตกตัวดี ลำต้นเกลี้ยง ใบยาว และใหญ่ เมื่อต้นสมบูรณ์เต็มที่ใบจะใหญ่ และหนาขึ้น สามารถทนทานต่อโรคได้ดี ผลมีขนาดใหญ่ และยาว ขนจะมีลักษณะแข็ง เมื่อผลสุกจะมีสีแดงเข้มขึ้น และเมื่อผลสุกงอม โคนขนจะเป็นสีแดง ปลายขนสีเขียวอ่อน เนื้อสีขาวค่อนข้างใส เนื้อร่อนออกจากเมล็ดแต่ไม่หมดเพราะจะมีเนื้อติดอยู่บ้างเล็กน้อย รสหวานอมเปรี้ยว แต่หากทิ้งไว้ประมาณ 1-2 คืน จะมีรสหวานแหลม และมีกลิ่นหอม เมล็ดค่อนข้างแบน สีเขียวขาวปนน้ำตาล ปัญหาที่พบคือ เมื่อขาดน้ำในช่วงฤดูร้อนผลจะแตกตัวได้ยาก (นฤมล, 2552)

2.1.3.4 พันธุ์พลิ้ว 3

เงาะพันธุ์พลิ้ว 3 เป็นเงาะลูกผสมระหว่างเงาะพันธุ์สีทอง และพันธุ์สีชมพู มีคุณลักษณะเด่นกว่าต้นลูกผสมอื่น โดยจะแทงช่อดอกและติดผลค่อนข้างง่าย ผลผลิตสามารถเก็บเกี่ยวได้ต้นฤดู กรมวิชาการเกษตรแนะนำพันธุ์เมื่อวันที่ 24 พฤศจิกายน 2540 ให้ชื่อ “พันธุ์จันทบุรี” (ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี, 2559) ดังรูปที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 2.3** ผลเงาะพันธุ์พลิ้ว 3
(ที่มา : รูปภาพโดย ธชาพล สมสิบ, 2558)

## 2.2 เทคนิค SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการศึกษาโดยการใช้เทคนิคทางโมเลกุล เป็นต้น แต่การศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะเป็นการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกเท่านั้น เช่น ความสูง สีของลำต้น ขนาด รูปร่าง และสีของเมล็ด ลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อมซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการศึกษาได้ (สุรีพร, 2546) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการใช้เทคนิคทางโมเลกุล จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยให้มีความถูกต้อง และแม่นยำมากยิ่งขึ้น (สรพงศ์, 2554) ตัวอย่างเทคนิคทางโมเลกุล ได้แก่ เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Wlliam *et al.*, 1990) เทคนิค SSR (Simple Sequence Repeat) (Brown *et al.*, 1996) และเทคนิค SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) (Li and Quiros, 2001) ซึ่งมีงาน วิจัยที่ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค SRAP, RAPD, SSR และ ISSR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช พบว่าเทคนิค SRAP มีประสิทธิภาพมากที่สุด (Li *et al.*, 2016) ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เทคนิค SRAP ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ โดยเทคนิค SRAP เป็นเทคนิคที่นำเอาเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction : PCR) มาใช้ซึ่งคิดค้นและพัฒนาโดย Li และ Quiros (2001) โดยการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตมาทำการเพิ่มปริมาณในส่วนของ Open Reading Frame (ORF) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือไพรเมอร์ส่วนหน้า (forward primer) และไพรเมอร์ส่วนหลัง (reverse primer) ที่มีขนาดประมาณ 17-18 นิวคลีโอไทด์ (โองการ, 2557) ข้อดีของเทคนิค SRAP คือ ทำได้ง่ายและรวดเร็ว ไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาและเป็นการตรวจสอบดีเอ็นเอครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกันใกล้เคียงกับการตรวจสอบโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) แต่ทำได้ง่าย และรวดเร็วกว่า (สุรินทร์, 2552)

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการนำเทคนิค SRAP มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดต่างๆ ดังนี้

ดลรัตน์ และคณะ (2553) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวันจากแหล่งพันธุกรรม Plant Gene Resources of Canada จำนวน 47 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 12-37 แถบ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.33 แถบ ซึ่งมี polymorphic bands 10-36 แถบ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 21.11 แถบ โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 95-2,000 คู่เบส และ Polymorphism Information Content (PIC) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.955 จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแก่นตะวันด้วยวิธี Un-weighted Pair-Group Mean Algorithm (UPGMA) พบว่าแบ่งแก่นตะวัน 47 สายพันธุ์ ออกเป็น 7 กลุ่ม แสดงให้เห็นว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาด้วยเทคนิค SRAP สามารถบ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี

Abedian *et al.* (2012) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่าง mahaleb cherry (*Prunus mahaleb*) 47 สายพันธุ์ และ sweet cherry (*Prunus avium*) 6 สายพันธุ์ โดยใช้จำนวนไพรเมอร์ 30 ไพรเมอร์เทคนิค SRAP เมื่อนำมาวิเคราะห์แล้วจะพบแถบ polymorphic bands 1-10 แถบ โดยเฉลี่ย 4.23 แถบต่อไพรเมอร์ ค่าเฉลี่ยของ PIC หรือค่าแสดงความหลากหลายของประชากร เท่ากับ 0.42 แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ต่อโดยการใช้โปรแกรม UPGMA และค่าสัมประสิทธิ์ของ Dice ในการจัดกลุ่มของสปีชีส์ทั้ง 2 กลุ่ม โดยแปลผลออกมาเป็นเดนโดรแกรม ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกันตั้งแต่ 0.16-0.93 จากนั้นวิเคราะห์ค่าการกระจายตัว โดยแสดงค่าเป็น principle component analysis (PCA) 3 กลุ่ม โดยมีค่าความแปรผันทั้งหมด 65.64 เปอร์เซ็นต์ และแสดงผลการวิเคราะห์กลุ่มในตาราง Analysis of Molecular Variance (AMOVA) การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกของการใช้เทคนิค SRAP เป็นเครื่องมือในการศึกษาค่าการผันแปรทางพันธุกรรมของเชอร์รี่ *P. mahaleb* และ *P. avium*

## 2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ

ในปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะมีจำนวนน้อย เช่น

Clyde *et al.* (2005) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะโดยใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และเทคนิค Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) โดยใช้ข้อมูลเงาะ 24 ตัวอย่างจากฐานข้อมูล MARDI พบว่าในการใช้เทคนิค ISSR มีค่า polymorphic 87.10 เปอร์เซ็นต์ และเทคนิค RAPD มีค่า polymorphic 97.33 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ยของความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมจากเทคนิค RAPD เท่ากับ 0.408 และจากเทคนิค ISSR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 0.561 จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เทคนิคทั้งสองชนิดนี้ในการศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเงาะได้

## 2.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbc*L (*ribulose bisphosphate carboxylase/oxygen* Large subunit)

ยีน *rbc*L เป็นยีนที่ไม่มีส่วนอินทรอน เมื่อถอดและแปลรหัสได้เป็น Large subunit ของ ribulose bisphosphate carboxylase/oxygen หรือที่เรียกว่าเอนไซม์รูบิสโกทำหน้าที่ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ส่วน Small subunit ของเอนไซม์รูบิสโก (rubisco) นั้นถูกถอดรหัสจากยีน *rbc*S ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในนิวเคลียส ยีนนี้มักนิยมใช้ในการจำแนกพืชระดับวงศ์หรือเหนือกว่าระดับวงศ์ได้ดีที่สุด และสามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับสปีชีส์ได้ในพืชบางชนิด มีรายงานว่าการใช้ยีน *mat*K ร่วมกับยีน *rbc*L จะช่วยทำให้การจัดกลุ่ม และการพิสูจน์เอกลักษณ์มีความชัดเจนยิ่งขึ้น (สุชาดา, 2553)

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้ยีน *rbc*L ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชชนิดต่างๆ ดังนี้

นฤมล และคณะ (2557) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *rbc*L และ *rpo*C1 เพื่อตรวจสอบข้าวมีสี 10 พันธุ์ ซึ่งเป็นข้าวเจ้า 8 พันธุ์ และข้าวเหนียว 2 พันธุ์ ผลการศึกษา พบว่าข้าวมีสีมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสูง และยีน *rbc*L และ *rpo*C1 สามารถประยุกต์ใช้ในการจำแนกพันธุ์ข้าวมีสีได้

ปิยดา และคณะ (2558) จำแนกสายพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยโดยใช้ยีน *rbc*L และ *rpo*C1 โดยรวบรวมตัวอย่างมะม่วงที่พบในประเทศไทยจำนวน 18 สายพันธุ์ มาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1 พบว่าไม่สามารถแยกมะม่วงทั้ง 18 พันธุ์ออกจากกัน ดังนั้นจึงควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นร่วมด้วย เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรเหมาะสมสำหรับจำแนกสายพันธุ์มะม่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินงานวิจัย

## 3.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างใบเงาะสายพันธุ์ต่างๆ ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยเก็บจากศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรีจำนวน 15 ตัวอย่าง จากมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี จำนวน 2 ตัวอย่าง และจากสวนละอองฟ้า จังหวัดนครนายกจำนวน 3 ตัวอย่าง และระบุชื่อตัวอย่างเป็น LM ดังตารางที่ 3.1 โดยตัดเอาส่วนของใบและผลเงาะ จากนั้นนำตัวอย่างมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปาแล้วซับให้แห้ง เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์เพื่อนำมาถ่ายรูปและสแกนด้วยเครื่องพิมพ์ Epson Stylus TX101 และเก็บตัวอย่างทั้งหมดใส่ถุงซิปล็อคไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำใบมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

**ตารางที่ 3.1** ชื่อตัวอย่าง สายพันธุ์ และแหล่งที่มาของเงาะที่ใช้ในการศึกษา

| ลำดับที่ | ชื่อตัวอย่าง | สายพันธุ์ | แหล่งที่มา |
|---|---|---|---|
| 1 | LM01 | สีชมพู | มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี |
| 2 | LM02 | โรงเรียน | มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี |
| 3 | LM03 | โรงเรียน | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 4 | LM04 | โรงเรียน | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุร จังหวัดจันทบุรี |
| 5 | LM05 | สีทอง | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 6 | LM06 | พลิ้ว 4 | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 7 | LM07 | พลิ้ว 1 | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 8 | LM08 | พลิ้ว 5 | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 9 | LM09 | พลิ้ว 6 | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 10 | LM10 | พลิ้ว 3 | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 11 | LM11 | พลิ้ว 8 | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 12 | LM12 | พลิ้ว 2 | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 13 | LM13 | ไม่ทราบสายพันธุ์ (ตัวผู้) | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 14 | LM14 | สีชมพู | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 15 | LM15 | สีชมพู | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 16 | LM16 | ไม่ทราบสายพันธุ์ (ตัวผู้) | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |
| 17 | LM17 | พลิ้ว 6 | ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 3.1** ชื่อตัวอย่าง สายพันธุ์ และแหล่งที่มาของเงาะที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

| ลำดับที่ | ชื่อตัวอย่าง | สายพันธุ์ | แหล่งที่มา |
|---|---|---|---|
| 18 | LM18 | ไม่ทราบสายพันธุ์ต้น A | สวนละอองฟ้า จังหวัดนครนายก |
| 19 | LM19 | ไม่ทราบสายพันธุ์ต้น B | สวนละอองฟ้า จังหวัดนครนายก |
| 20 | LM20 | ปีนัง | สวนละอองฟ้า จังหวัดนครนายก |

## 3.2 อุปกรณ์

### 3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

3.2.1.1 กรรไกรตัดกิ่ง (Pruning shears)

3.2.1.2 ถุงซิปล็อค (Ziploc bag)

3.2.1.3 กล้องถ่ายรูป (Camera)

3.2.1.4 เครื่องพิมพ์ (Printer); Epson stylus TX101

### 3.2.2 การสกัด การวัดปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอ

3.2.2.1 โกร่ง (Mortar) และที่บด (Pestle)

3.2.2.2 กรรไกร (Scissors)

3.2.2.3 ปากคีบ (Forceps)

3.2.2.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)

3.2.2.5 บีกเกอร์ (Beaker)

3.2.2.6 หลอดทดลอง (Tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.2.2.7 Rack สำหรับใส่หลอดทดลอง

3.2.2.8 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) และทิป (Micropipette tips)

3.2.2.9 ตู้ดูดควัน (Fume hood)

3.2.2.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.2.2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge); HettichMikro 22R

3.2.2.12 เครื่องผสมสาร (Vortex)

3.2.2.13 ตู้บ่ม (Incubator)

3.2.2.14 Heat block

3.2.2.15 ตู้เย็น (Refrigerator)

3.2.2.16 ตู้แช่แข็ง (Freezer)

3.2.2.17 พาราฟิล์ม (Parafilm)

3.2.2.18 กระดาษทิชชู่ (Tissue paper)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.19 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer); Eppendorf BioPhotometer™

3.2.2.20 คิวเวตควอตซ์ (Quartz semi-cuvette)

**3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ และ SRAP**

3.2.3.1 หลอดทดลอง (Tube) ขนาด 0.5 และ 0.2 มิลลิลิตร

3.2.3.2 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Thermal cycler); EppendorfMastercycler®ep Gradient S

3.2.3.3 เครื่องผสมสาร (Vortex)

3.2.3.4 Spin down

**3.2.4 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส**

3.2.4.1 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.2.4.2 เครื่องชั่ง (Balance)

3.2.4.3 ฟลาสก์ (Flask)

3.2.4.4 ไมโครเวฟ (Microwave oven)

3.2.4.5 ชุดอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis); Mupid®-exUsubmarine electrophoresis system

3.2.4.6 ถาดเจล (gel tray)

3.2.4.7 หวี (combs)

3.2.4.8 ถุงมือยาง (Rubber glove)

3.2.4.9 คอมพิวเตอร์ (Computer)

3.2.4.10 ชุดถ่ายภาพเจล (Gel document system); SYNGENE InGenuis Bio Imaging

**3.2.5 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยชุด GF-1 AmbiClean Kit**

3.2.5.1 ชุด GF-1 AmbiClean Kit ; Vivantis

3.2.5.2 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes)

3.2.5.3 ทิป (Micropipette tips) ขนาดต่างๆ

## 3.3 สารเคมี

**3.3.1 การสกัด วัดปริมาณดีเอ็นเอ**

3.3.1.1 2X CTAB

3.3.1.2 ไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen)

3.3.1.3 β-mercaptoethanol

3.3.1.4 Chloroform :Isoamyl alcohol (24 : 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.5 20 mg/ml RNase A

3.3.1.6 Isopropanol

3.3.1.7 Absolute ethanol

3.3.1.8 70% Ethanol

3.3.1.9 10% CTAB ใน 0.7 M NaCl

3.3.1.10 TE buffer

3.3.1.11 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

**3.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ และ SRAP**

3.3.2.1 Deionzed water (DI water)

3.3.2.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์ ตามงานศึกษาของ Tamura *et al*. (2004) คือ *rbc*LN (5'-ATGTCACCACAAACAGAAACT-3') และ *rbc*L840R (5'-TTGTCGCGGCAATAATGAGCC-3')

3.3.2.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิคSRAP (Li and Quiros, 2001) สังเคราะห์จากบริษัท 1st BASE Custom Oligos ลำดับนิวคลีโอไทด์ดัง ตารางที่ 3.2

**ตารางที่ 3.2** ชนิดไพรเมอร์ ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในเทคนิค SRAP

| ชนิดไพรเมอร์ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|---|---|---|
| Forward primer | Me1 | 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3' |
| | Me2 | 5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3' |
| | Me3 | 5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3' |
| | Me4 | 5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3' |
| | Me5 | 5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3' |
| Reverse primer | Em1 | 5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3' |
| | Em2 | 5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3' |
| | Em3 | 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3' |
| | Em4 | 5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3' |
| | Em5 | 5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3' |
| | Em6 | 5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3' |

(ดัดแปลงจาก Li and Quiros, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.3.3 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส**

3.3.3.1 อะกาโรส (Agarose)

3.3.3.2 Tris-Borate EDTA buffer (TBE buffer)

3.3.3.3 3X Loading dye

3.3.3.4 Deionized water

3.3.3.5 DNA marker ขนาด 100 คู่เบส

3.3.3.6 DNA marker ขนาด 1 กิโลเบส

3.3.3.7 เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide: EtBr)

3.3.3.8 น้ำกลั่น

## 3.4 วิธีการทดลอง

**3.4.1 การศึกษาลักษณะของใบ**

ศึกษาลักษณะของใบเงาะ โดยสังเกตลักษณะรูปร่างใบ (Leaf shape) ปลายใบ (Leaf tip) ฐานใบ (Leaf base) การจัดเรียงของใบบนต้น (Arrangement) ขอบใบ (Leaf margin) แล้วจัดจำแนกกลุ่มตามลักษณะความสัมพันธ์ที่สังเกตได้จากรูปร่างใบ

**3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชโดยใช้วิธี CTAB (ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle, 1987)**

นำตัวอย่างใบที่บดด้วยไนโตรเจนเหลวใส่ลงในโกร่งแล้วเติม 2X CTAB 700 ไมโครลิตร แล้วบดตัวอย่างกับ 2X CTAB ให้เข้ากันใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เข้ากันดีแล้ว 700 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และเติม β-mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำพาราฟิล์มพันรอบฝาหลอด แล้วนำหลอดตัวอย่างใส่ Rack สำหรับลอยในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส กลับหลอดตัวอย่างไปมาเบาๆ ทุก 15 นาที จนครบเวลา 90 นาที เมื่อครบเวลาแล้วเช็ดหลอดตัวอย่างให้แห้ง ดึงพาราฟิล์มออก นำหลอดตัวอย่างเข้าตู้ดูดควันแล้วเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นกลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำมาเติม 10 เปอร์เซ็นต์ CTAB ใน 0.7 M NaCl ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในตู้ดูดควัน แล้วนำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol ที่เย็น ปริมาตร 1 : 1 โดยปริมาตร (v/v) ของสารละลายส่วนใสกลับหลอดไปมาแล้วนำไปบ่มในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (over night) จากนั้น

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มหลอด TE buffer ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ในเครื่อง Heat block ทิ้งเอาไว้ แล้วนำหลอดตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ และคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชู่เพื่อซับสารละลายส่วนใสที่ยังเหลืออยู่ออกให้หมด จากนั้นเติม 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ และคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชู่เพื่อซับสารละลายส่วนใสที่ยังเหลืออยู่ออกให้หมด จากนั้นเติม Absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ และคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชู่เพื่อซับสารละลายส่วนใสที่ยังเหลืออยู่ออกให้หมด แล้วนำเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เพื่อระเหย Absolute ethanol ที่เหลืออยู่ออกให้หมดแล้วเติม TE buffer ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50-150 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณของตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมดโดยใช้เวลาไม่เกิน 12 ชั่วโมง และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**3.4.3 การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอ**

**3.4.3.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง**

ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 495 ไมโครลิตร (Dilution factor เท่ากับ 100) เปิดเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Eppendorf BioPhotometer™ กด Dilution ตั้งปริมาตรตัวอย่าง (Sample) เท่ากับ 5 ไมโครลิตร จากนั้นกด Enter ตั้งปริมาตรน้ำกลั่น (Diluent) เท่ากับ 495 ไมโครลิตร กด Enter ใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคิวเวตควอตซ์ กด Blank ล้างคิวเวตควอตซ์แล้วเช็ดให้แห้ง ดูดสารละลายที่เตรียมได้ไว้ใส่ลงในคิวเวตควอตซ์ แล้วใส่ลงในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยกด Sample จดบันทึกค่าการดูดกลืนแสงหรือค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร อัตราส่วนระหว่างค่าความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และปริมาณดีเอ็นเอในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตรที่อ่านได้ คำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และปริมาณดีเอ็นเอในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl) หรือไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) ทำซ้ำอีกครั้งเพื่อตรวจสอบความถูกต้องจากสูตรดังนี้

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (µg/ml) = OD260 x 50 µg/ml x dilution factor

**3.4.3.2 เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส**

ชั่งผงอะกาโรสตามปริมาณที่คำนวณ จากนั้นเติม TBE buffer ตามปริมาณที่ต้องการ ตัวอย่างเช่น เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้ชั่งผงอะกาโรส 0.2 กรัม เติม TBE buffer 20 มิลลิลิตร แล้วทำการละลายสารที่ได้โดยใช้ไมโครเวฟจนเป็นสารละลายเหลวใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ขุ่น รอจนกว่าอุณหภูมิจะลดลงเหลือประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทสารละลายที่ได้ลงในถาดเจล (gel tray) ที่มีหวี (combs) เสียบอยู่เพื่อทำให้เจลเกิดเป็นหลุมสำหรับหยอดดีเอ็นเอ

เมื่อเจลแข็งตัวแล้วให้นำเจลที่ได้ไปใส่ลงใน chamber ที่มี TBE buffer อยู่ และทำการต่อ chamber เข้ากับตัวจ่ายกระแสไฟฟ้า ผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หรือดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับสีย้อม (loading dye) ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร จากนั้นหยอดลงไปในหลุมของเจลอะกาโรสเมื่อหยอดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หรือดีเอ็นเอครบทุกหลุมแล้ว เปิดเครื่องปล่อยกระแสไฟฟ้าตั้งกำลังไฟ 100 โวลต์ เวลา 30 นาที และทำการปล่อยกระแสไฟฟ้าเมื่อครบเวลาแล้วนำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออก จากนั้นนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต และถ่ายภาพเจลด้วยชุดถ่ายภาพเจล SYNGENE INGenuis Bio Imaging

### 3.4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ ในบริเวณยีน *rbc*L

คำนวณปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบเงาะให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในเทคนิคพีซีอาร์ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ใช้คู่ไพรเมอร์ตามข้อ 3.3.2.2 โดยส่วนประกอบของสารเคมี 25 ไมโครลิตร จะประกอบด้วย 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต dNTP 0.25 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์แต่ละชนิด 0.8 พิโครโมล ดีเอ็นเอแม่แบบประมาณ 100 นาโนกรัม จากนั้นนำส่วนผสมที่ผสมได้ในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตรเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง EppendorfMastercycler® ep. Gradient S เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนการทำงานแสดงดังนี้ขั้นตอน initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบขั้นตอน denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นตอน annealing 50 องศาเซลเซียส ขั้นตอน extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที โดยทั้งสามขั้นตอนนี้จะทำซ้ำทั้งหมด 37 รอบ และขั้นตอน final extension 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเสร็จแล้วทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่แสดงวิธีการในข้อ 3.4.6 ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker ขนาด 1 กิโลเบส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยชุด GF-1 AmbiClean Kit ที่แสดงวิธีในข้อ 3.4.7 ก่อนส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ให้นำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมต่อไป

### 3.4.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP

การวิเคราะห์โดยเทคนิค SRAP ตามคำอธิบายของ Li และ Quiros (2001) เริ่มจากการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ทำได้โดยการนำไพรเมอร์ส่วนหน้า (Forward primer) จำนวน 5 ไพรเมอร์ และไพรเมอร์ส่วนหลัง (Reverse primer) จำนวน 6 ไพรเมอร์ (ดังตารางที่ 3.2) มาจับคู่กันจนครบ 30 คู่ เช่น ไพรเมอร์ส่วนหน้า “ME1” จับคู่กับไพรเมอร์ส่วนหลัง “EM1” (ME1-EM1) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพรเมอร์ส่วนหน้า “ME1” จับคู่กับไพรเมอร์ส่วนหลัง “EM2” (ME1-EM2) เป็นต้น จากนั้นนำแต่ละคู่ไพรเมอร์มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเงาะ 3 ตัวอย่าง คือ LM03, LM05 และ LM09 เพื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่แสดงถึงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน เมื่อได้คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมแล้วนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเงาะทุกตัวอย่าง เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP จะมีส่วนประกอบของสารเคมี 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต dNTP 0.25 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์แต่ละชนิด 0.8 พิโครโมล และดีเอ็นเอแม่แบบประมาณ 50 นาโนกรัม จากนั้นนำส่วนผสมที่ผสมได้ในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในหลอดทดลอง EppendorfMastercycler® ep. Gradient S เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนการทำงาน ดังนี้ เริ่มต้นด้วย Intitial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที เข้า Cycle ที่ 1 โดยมีขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอน Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นตอน Annealing ที่ 35 องศาเซลเซียส 1 นาที และขั้นตอน Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที โดยทั้ง 3 ขั้นตอนนี้จะทำซ้ำทั้งหมด 5 รอบเข้า Cycle ที่ 2 โดยมีขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอน denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นตอน annealing 50 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นตอน extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที โดยทั้ง 3 ขั้นตอนนี้ดำเนินการ 35 รอบและขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเสร็จแล้วทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังที่แสดงวิธีการในข้อ 3.4.3.2 แต่ใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE buffer และใช้ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 40 นาที โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker ขนาด 100 คู่เบส

**3.4.6 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยชุด GF-1 AmbiClean kit**

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส แล้วพบว่ามีแถบดีเอ็นเอ เฉพาะที่ต้องการเพียงแถบเดียวมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร โดยทำในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรใส่ DB buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ Absolute ethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำการผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา จากนั้นดูดสารละลายใส่ลงในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g 1 นาที เมื่อครบเวลาแล้วให้เทสารละลายด้านล่างทิ้งใส่ wash buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาแล้วให้เทสารละลายด้านล่างทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้งเพื่อกำจัด Ethanol ที่หลงเหลืออยู่ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 30 – 200 ไมโครลิตร โดยเติมลงไปตรงๆที่แผ่นเมมเบรน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอดทดลองด้านล่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ก่อนจะส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

**3.4.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม**

**3.4.7.1. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์**

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ (BLAST) ในฐานข้อมูล NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) จากนั้นนำมาทำการ mutiple alignment ด้วยโปรแกรม BioEdit

**3.4.7.2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิค SRAP**

แปลผลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SRAP ของแต่ละไพรเมอร์โดยให้คะแนนแบบ binary data matrix โดยให้คะแนน 1 เมื่อปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น 0 เมื่อไม่มีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่าง นำคะแนนที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี simple matching (Sneath and Sokal, 1973) และสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.11x ด้วยวิธี UPGMA (Rohlf, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่4
# ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

## 4.1 ผลการศึกษาลักษณะของใบ

จากตัวอย่างเงาะทั้งหมดจำนวน 20 ตัวอย่าง สามารถศึกษาลักษณะของใบเงาะได้เพียง 18 ตัวอย่าง เนื่องจากตัวอย่าง LM13 และ LM16 มีลักษณะใบที่ไม่สมบูรณ์ จึงไม่นำมาศึกษา และจากผลการศึกษาพบว่าทั้ง 18 ตัวอย่างมีลักษณะบางประการคล้ายกัน คือ การเรียงตัวของใบแบบขนนกปลายคู่ และขอบใบเรียบ และมีลักษณะบางประการที่แตกต่างกัน คือ รูปร่างใบ ปลายใบ และฐานใบ โดยลักษณะของรูปร่างใบมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงเลือกจัดกลุ่มตามรูปร่างใบได้ 4 กลุ่ม คือ รูปหอกกลับ รูปคล้ายไข่ รูปใบหอก และรูปรี โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 4.1 ซึ่งการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ อนุรักษ์ และคณะ (2013) ที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบพืชสกุล *Passiflora* โดยจัดกลุ่มพืชตามลักษณะรูปร่างของใบ

**ตารางที่ 4.1** การจัดกลุ่มของตัวอย่างตามลักษณะของใบเงาะ

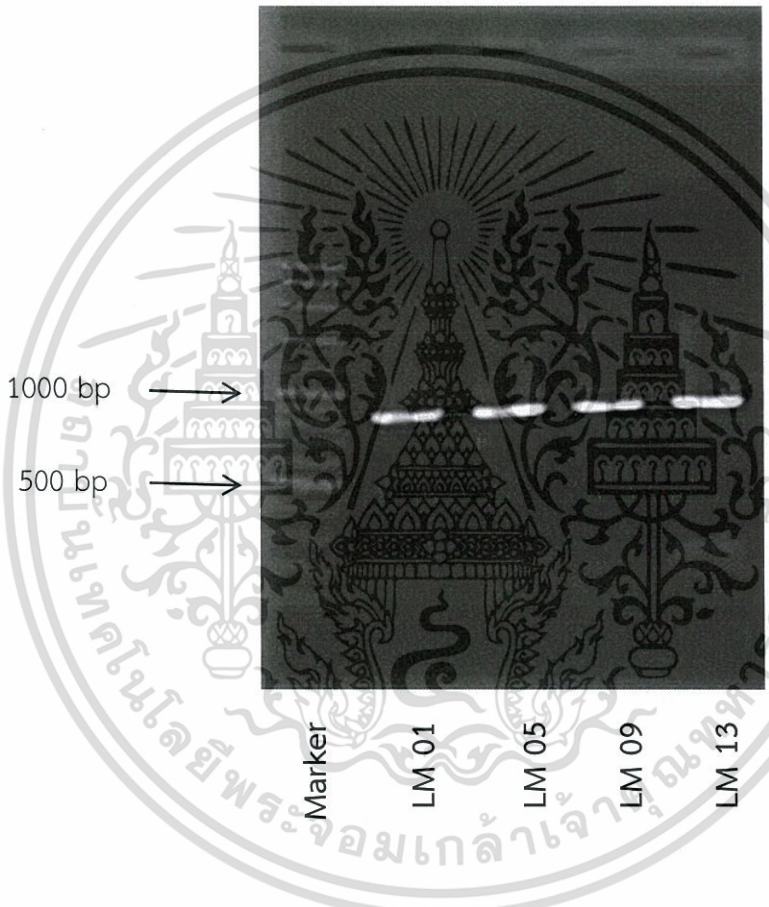
| กลุ่มที่ | ชื่อตัวอย่าง | ลักษณะใบ | ตัวอย่างใบ |
|---|---|---|---|
| 1 | LM01, LM06, LM08, LM11 | รูปหอกกลับ ฐานใบสอบเรียว ปลายใบแหลม | |
| 2 | LM02, LM03, LM04, LM07, LM09, LM10, LM19 | รูปคล้ายไข่ ฐานใบรูปลิ่ม ปลายใบเป็นติ่งแหลม | |
| 3 | LM05, LM12 | รูปใบหอก ฐานใบรูปลิ่ม ปลายใบเรียวแหลม | |
| 4 | LM14, LM15, LM17, LM18, LM20 | รูปรี ฐานใบรูปลิ่ม ปลายใบแหลม | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

### 4.2.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcL*

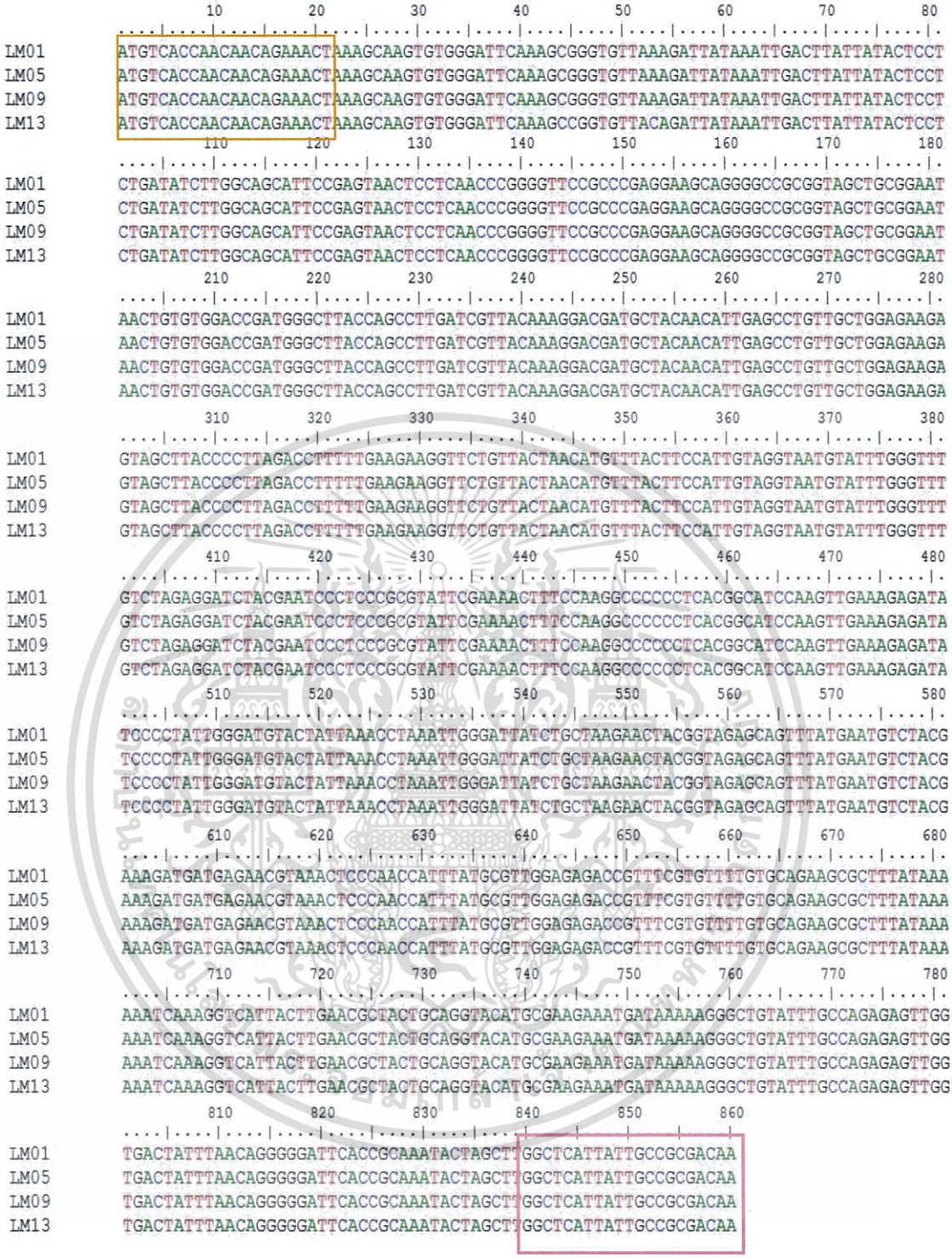
ทำการสุ่มเจาะจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันมา 4 ตัวอย่าง คือ LM01, LM05, LM09 และ LM13 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน *rbc*L เพื่อตรวจสอบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นดีเอ็นเอของเงาะ พบว่าทุกตัวอย่างมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 850 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส แสดงดังรูปที่ 4.1




**รูปที่ 4.1** แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน *rbc*L

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์โดยโปรแกรม BioEdit จะสามารถหาตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ *rbc*LN และ *rbc*L840R ได้โดยตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ forword (*rbc*LN) คือ 5'-ATGTCACCAACCACAGAAACT-3' และตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ reverse (*rbc*L840R) คือ 5'-GGCTCATTATTGCCGCGACAA-3' และทำให้ทราบจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แน่นอนเท่ากับ 860 คู่เบส ดังรูป 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.2** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ในตัวอย่าง LM01, LM05, LM09 และ LM13 โดยใช้ไพรเมอร์ *rbc*lN และ *rbc*L840R

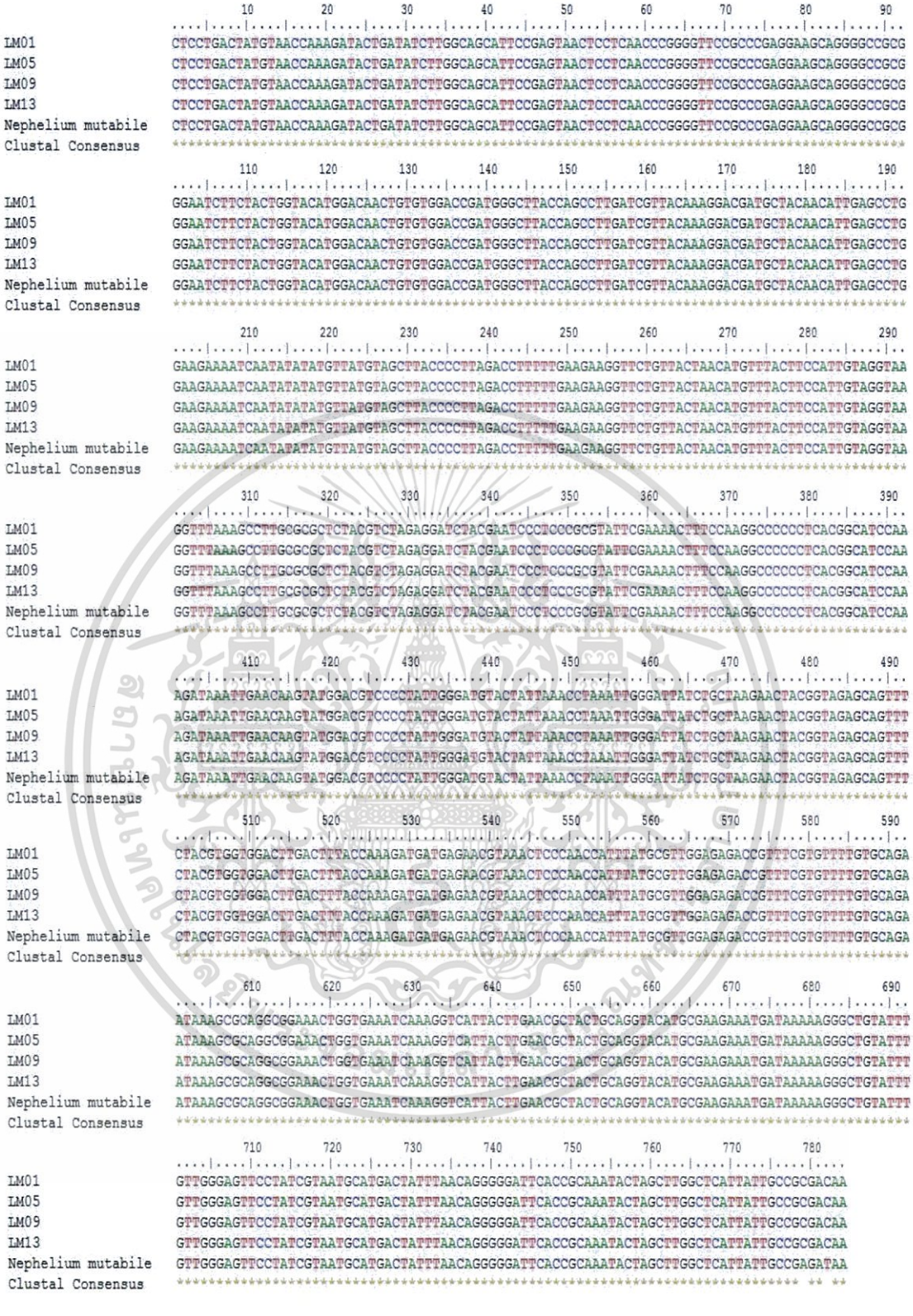
หมายเหตุ : กรอบสีเหลือง แสดงจุดจับไพรเมอร์ *rbc*LN

กรอบสีชมพู แสดงจุดจับไพรเมอร์ *rbc*L840R

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) จากฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าไม่สามารถใช้ยีน *rbc*L ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ เนื่องจากตัวอย่างเงาะทั้ง 4 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกับเงาะขนสั้น (*N. mutabile*) ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกับเงาะ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identity) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเงาะทั้ง 4 ตัวอย่าง และ *N. mutabile* มาวิเคราะห์ร่วมกันโดยโปรแกรม BioEdit และตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนเกินออก ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์มีความยาว 784 คู่เบส ดังรูปที่ 4.3 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความใกล้เคียงกันมาก จะแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 699, 779 และ 782 จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *N. mutabile* ที่แตกต่างจากเงาะทั้ง 4 ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

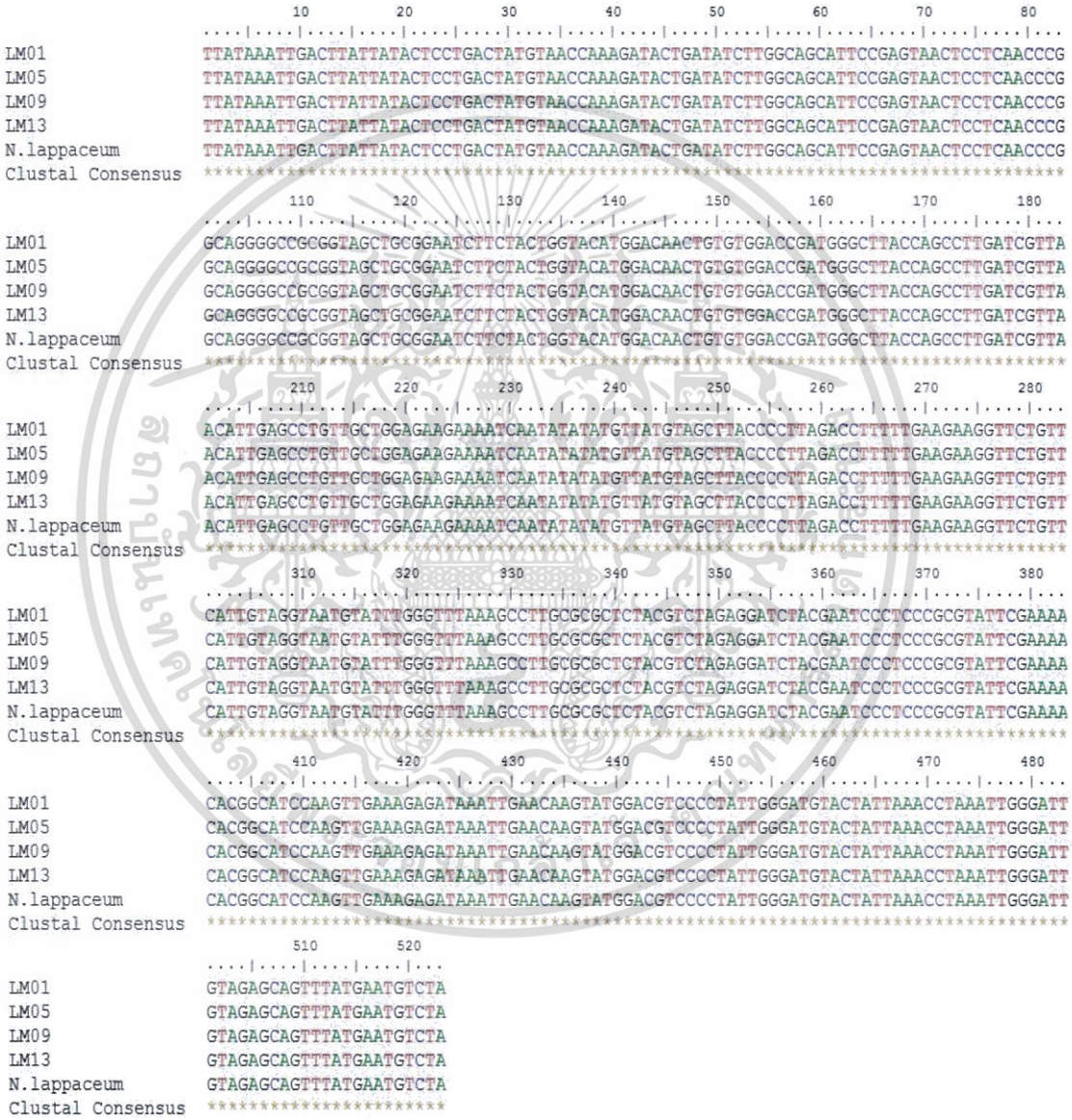



**รูปที่ 4.3** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ในตัวอย่าง LM01, LM05, LM09 และ LM13 เปรียบเทียบกับเงาะขนสั้น (*N. mutabile*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเงาะ (*N. lappaceum*) ในบริเวณยีน *rbc*L จากฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับตัวอย่างเงาะทั้ง 4 ตัวอย่างด้วยโปรแกรม BioEdit และตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนเกินออก ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์มีความยาว 523 คู่เบส พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.4

จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถใช้ยีน *rbc*L ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะในระดับสปีชีส์

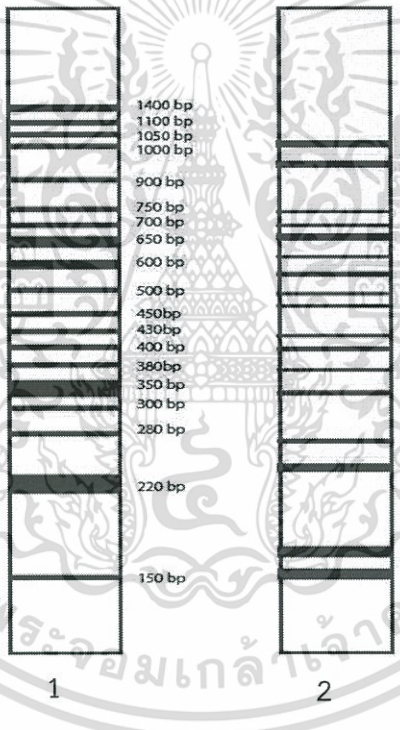



**รูปที่ 4.4** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ในตัวอย่าง LM01, LM05, LM09 และ LM13 เปรียบเทียบกับเงาะ (*N. lappaceum*) จากฐานข้อมูล NCBI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

จากการการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเงาะ 3 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 คู่ พบว่า สามารถคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้ 5 คู่คือ Me1-Em1, Me1-Em3, Me3-Em3, Me4-Em1 และ Me4-Em6 เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับทั้ง 20 ตัวอย่าง พบว่ามีเงาะจำนวน 7 ตัวอย่างที่เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน ทำให้เหลือตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 13 ตัวอย่าง คือ LM03, LM04, LM05, LM06, LM08, LM09, LM10, LM12, LM13, LM14, LM16, LM18 และ LM20 และเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเงาะจำนวน 13 ตัวอย่างโดยใช้ 5 คู่ไพรเมอร์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะมีความแตกต่างกันในแต่ละคู่ไพรเมอร์ ดังตัวอย่างดีเอ็นเอโปรไฟล์รูปที่ 4.5 โดยหมายเลข 1 แสดงถึงคู่ไพรเมอร์ Me1-Em1 และรูปที่ 4.5 หมายเลข 2 แสดงถึงคู่ไพรเมอร์ Me1-Em3




**รูปที่ 4.5** ดีเอ็นเอโปรไฟล์ของเงาะที่ได้จากการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดย SRAP (1) คู่ไพรเมอร์ Me1-Em1 (2) คู่ไพรเมอร์ Me1-Em3

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่คู่ไพรเมอร์มาทำการให้คะแนน และวิเคราะห์ผล ได้ผลดังตารางที่ 4.2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีจำนวนแถบที่เกิดขึ้นทั้งหมด 93 แถบ มี polymorphic bands จำนวน 50 แถบ คิดเป็น 53.76 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ Me1-Em3 ให้จำนวน polymorphic bands สูงสุดคือ 16 แถบ คิดเป็น 84.21 เปอร์เซ็นต์ และไพรเมอร์ Me1-Em3 ให้จำนวน polymorphic bands น้อยที่สุดคือ 5 แถบ คิดเป็น 29.41 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.2** ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอ และจำนวน polymorphic bands ของเงาะ 13 ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

| คู่ไพรเมอร์ | จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด | จำนวน polymorphic band | % polymorphic band |
|---|---|---|---|
| Me1-Em1 | 19 | 16 | 84.21 |
| Me1-Em3 | 17 | 5 | 29.41 |
| Me3-Em3 | 21 | 15 | 71.42 |
| Me4-Em1 | 18 | 8 | 44.44 |
| Me4-Em6 | 18 | 6 | 33.33 |
| รวม | 93 | 50 | 53.76 |

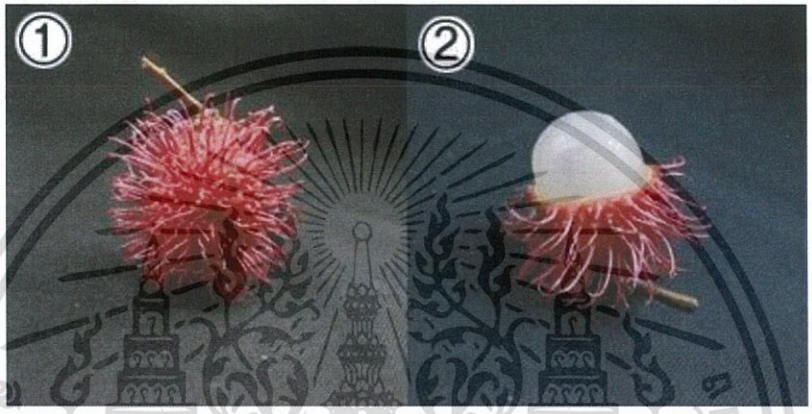
### 4.2.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิค SRAP

เมื่อนำผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP ของเงาะ 13 ตัวอย่าง โดยใช้ 5 คู่ไพรเมอร์ มาแปลแถบดีเอ็นเอ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นทั้งหมด 93 แถบ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาสร้างเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS version 2.11x ด้วยวิธี UPGMA ได้ผลออกมาดังรูปที่ 4.9 ซึ่งมีค่า coefficient similarity อยู่ในช่วง 0.75-0.91 และที่ค่า coefficient similarity 0.81 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย LM03 และ LM04 จะเห็นได้ว่ามีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมเนื่องจากตัวอย่างเงาะทั้ง 2 รหัสเป็นเงาะพันธุ์โรงเรียนซึ่งมีลักษณะของผลเป็นสีแดงสด โคนขนสีแดง ปลายขนสีเขียว เนื้อสีขาวขุ่น ดังรูปที่ 4.6

**รูปที่ 4.6** แสดงลักษณะผล (1) ลักษณะเนื้อ (2) ของเงาะพันธุ์โรงเรียน
(ที่มา : รูปภาพโดย ธชาพล สมสิบ, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

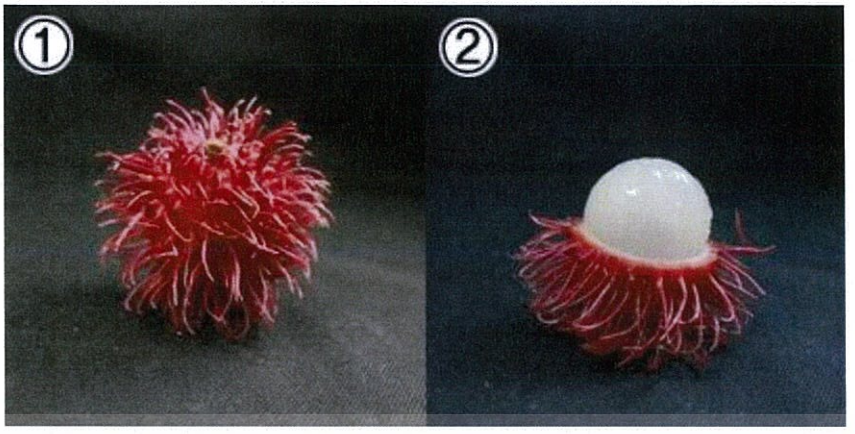
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย LM06, LM08, LM09, LM12 และ LM14 ซึ่งเป็นเงาะพันธุ์พลิ้วต่างๆ และเงาะพันธุ์สีชมพู โดยเงาะพันธุ์พลิ้วต่างๆ เป็นพันธุ์ที่มีการปรับปรุงพันธุ์ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเงาะพันธุ์สีชมพู จึงอนุมานได้ว่า เงาะสายพันธุ์พลิ้วมีการปรับปรุงพันธุ์มาจากเงาะพันธุ์สีชมพู โดยลักษณะของผลเงาะในกลุ่มนี้มีสีแดงอมชมพู โคนขน และปลายขนเป็นสีแดง เนื้อสีขาวใสกว่าพันธุ์โรงเรียน ดังรูปที่ 4.7 และผลของการปรับปรุงพันธุ์ของเงาะพันธุ์พลิ้วต่างๆ อาจจะมีลักษณะที่ไม่แตกต่างไปจากพันธุ์เดิมมาก เนื่องจากมีการเกาะกลุ่มของเงาะพันธุ์พลิ้วเกิดขึ้นภายในเดนโดรแกรม




**รูปที่ 4.7** แสดงลักษณะผล (1) ลักษณะเนื้อ (2) ของเงาะพันธุ์สีชมพู
(ที่มา : รูปภาพโดย ธชาพล สมสิบ, 2558)

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย LM13 LM16 และ LM18 ซึ่ง LM13 และ LM16 มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูงมากเนื่องจากเป็นต้นตัวผู้เหมือนกัน และ LM18 เป็นเงาะที่ไม่ทราบสายพันธุ์ก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้ จึงอนุมานได้ว่า LM18 มีแนวโน้มที่จะเป็นต้นตัวผู้เช่นกัน ในกลุ่มนี้ไม่มีการแสดงภาพของผลเงาะเนื่องจากเป็นต้นตัวผู้จึงไม่มีการติดผล กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย LM05 และ LM20 ในกลุ่มนี้จะไม่มีการแสดงภาพของผลเงาะเนื่องจากต้นไม่มีการออกผล กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย LM10 ซึ่งเป็นเงาะพันธุ์พลิ้ว 3 ที่เป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์สีทอง และพันธุ์สีชมพู โดยเงาะพันธุ์นี้จะแยกกลุ่มออกจากเงาะพันธุ์พลิ้วอื่นๆอย่างชัดเจน เนื่องจากเงาะพันธุ์พลิ้ว 3 มีลักษณะเด่นกว่าเงาะพันธุ์พลิ้วอื่นๆ คือ ติดผลได้ง่าย และสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ในตอนต้นของฤดู ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์ของเงาะพันธุ์พลิ้ว 3 นี้ถือว่าประสบความสำเร็จเป็นอย่างมาก ถึงแม้ว่าเงาะพันธุ์พลิ้ว 3 จะมีลักษณะเด่นที่แตกต่างจากเงาะพันธุ์พลิ้วอื่นๆ แต่เงาะพันธุ์พลิ้ว 3 นี้ก็ยังคงมีลักษณะของผลที่คล้ายคลึงกับเงาะพันธุ์สีชมพู คือ ลักษณะของผลสีแดงอมชมพู และมีเนื้อขาวใส ดังรูปที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

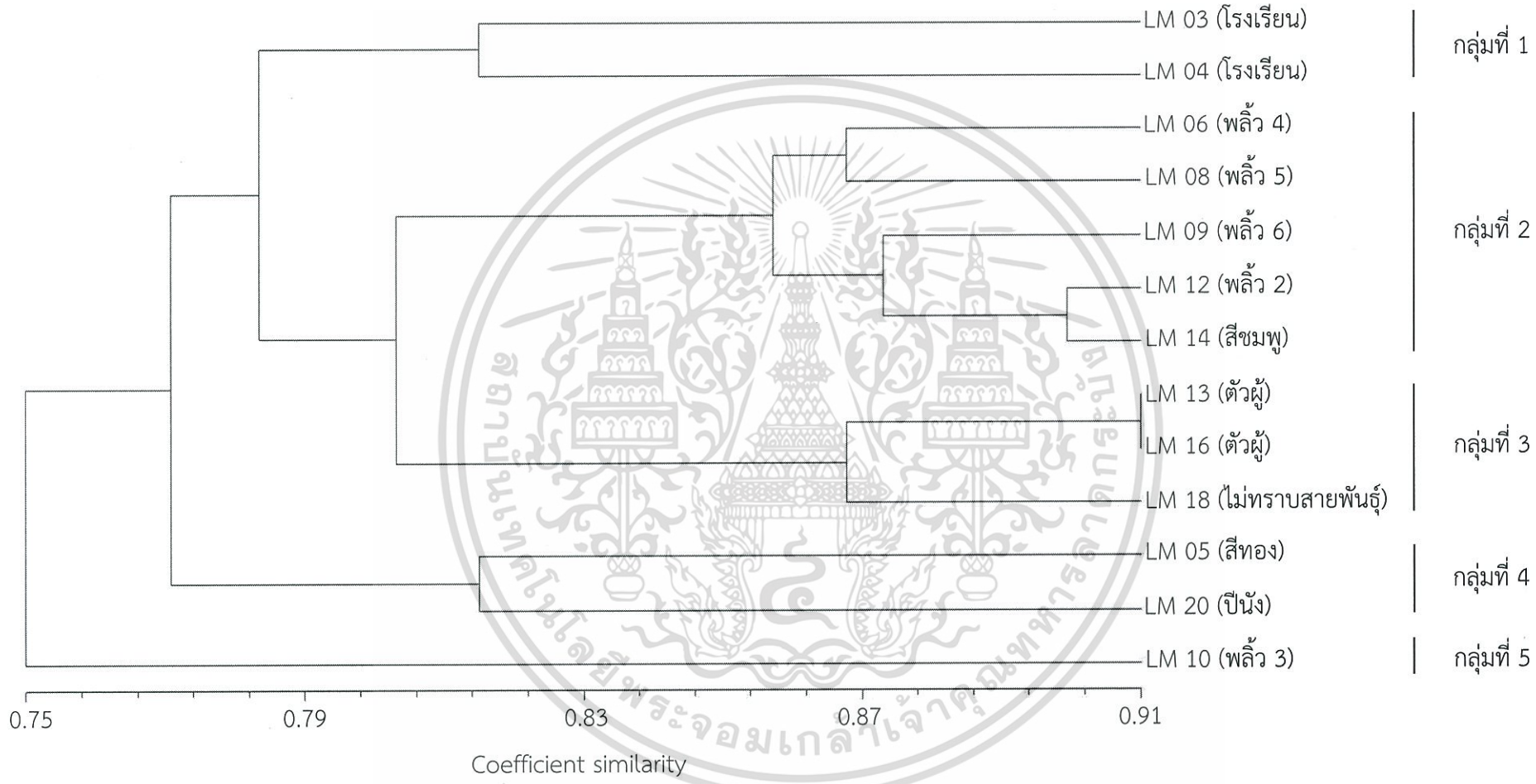



**รูปที่ 4.8** ลักษณะผล (1) ลักษณะเนื้อ (2) ของเงาะพันธุ์พลิ้ว 3
(ที่มา : รูปภาพโดย ธชาพล สมสิบ, 2558)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิค SRAP สอดคล้องกับลักษณะของผลเงาะ แต่ไม่สอดคล้องกับลักษณะของใบเงาะ เนื่องจากเงาะในกลุ่มเดียวกันมีลักษณะของใบที่แตกต่างกัน เช่น กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย LM05 ที่มีใบรูปใบหอก และ LM20 ที่มีใบรูปรี จึงไม่สามารถใช้ลักษณะของใบในการจัดกลุ่มของเงาะได้

เทคนิค SRAP สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะได้ ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Fenggang *et al.* (2009) ที่ใช้เทคนิค SRAP ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลิ้นจี่ ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับเงาะ ข้อดีของการใช้เทคนิค SRAP คือ สามารถทดลองได้ง่าย ราคาไม่สูงมาก เมื่อเทียบกับการใช้เทคนิคทางโมเลกุลชนิดอื่นๆ และเมื่อทำการทดลองซ้ำจะให้ผลที่เหมือนเดิม นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้เทคนิคทางโมเลกุลอื่น ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ เช่น งานวิจัย Clyde *et al.* (2005) ที่ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะโดยใช้เทคนิค RAPD และ ISSR โดยใช้ข้อมูลเงาะ 24 ตัวอย่างจากฐานข้อมูล MARDI แต่ยังมีงานวิจัยจำนวนน้อยมากที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะด้วยเทคนิค SRAP งานวิจัยนี้จึงเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการใช้เป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของเงาะในประเทศไทย เพื่อให้สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เงาะ อีกทั้งยังเป็นข้อมูลสำหรับผู้ที่สนใจศึกษาอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.9** เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากเทคนิค SRAP ของเงาะ 13 ตัวอย่าง

# บทที่5
# สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ โดยใช้ลักษณะของใบและการใช้เทคนิคทางโมเลกุล

ผลจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ 18 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยใช้ลักษณะของใบ พบว่ามีลักษณะบางประการที่คล้ายคลึงกัน คือ ปลายใบ ฐานใบ การเรียงตัวของใบ และขอบใบ แต่มีลักษณะของรูปร่างใบที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงใช้ลักษณะของรูปร่างใบในการแบ่งกลุ่ม โดยจะสามารถจำแนกเงาะได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ใบหอกกลับ ได้แก่ LM01, LM06, LM08 และ LM11 กลุ่มที่ 2 ใบคล้ายไข่ ได้แก่ LM02, LM03, LM04, LM07, LM09, LM10 และ LM19 กลุ่มที่ 3 ใบหอก ได้แก่ LM05 และ LM12 กลุ่มที่ 4 ใบรูปรี ได้แก่ LM14, LM15, LM17, LM18 และ LM20

ผลจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะโดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbc*L โดยศึกษาในเงาะ 4 ตัวอย่าง คือ LM01, LM05, LM09 และ LM13 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 860 คู่เบส และยีน *rbc*L ไม่สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะในระดับสปีชีส์

ผลจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค SRAP โดยใช้ตัวอย่างเงาะที่ผ่านการคัดเลือก 13 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง และคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้จำนวน 5 คู่ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นทั้งหมด 93 แถบ โดยเป็น polymorphic bands 50 แถบ คิดเป็น 53.76 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสร้างแดนโดรแกรมด้วยวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.11x พบว่ามีค่า Coefficient similarity อยู่ในช่วง 0.75-0.91 และที่ค่า Coefficient similarity 0.81 สามารถจำแนกเงาะได้ 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเงาะพันธุ์โรงเรียน ได้แก่ LM03 และ LM04 กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเงาะสายพันธุ์พลิ้วต่างๆ และพันธุ์สีชมพู ได้แก่ LM06, LM08, LM09, LM12 และ LM14 กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเงาะตัวผู้ และเงาะที่ไม่ทราบสายพันธุ์ ได้แก่ LM13, LM16 และ LM19 กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเงาะพันธุ์สีทอง และพันธุ์ปีนัง ได้แก่ LM05 และ LM20 กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเงาะพันธุ์พลิ้ว 3 ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างเงาะพันธุ์สีทอง และพันธุ์สีชมพู ได้แก่ LM10 จากผลการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าเงาะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และสามารถประยุกต์ใช้เทคนิค SRAP ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากทางสัณฐานวิทยา ในการทดลองนี้พิจารณาจากลักษณะของใบเท่านั้น เนื่องจาก เงาะในบางตัวอย่างไม่ออกผลจึงไม่สามารถเก็บผลเงาะได้ครบทุกตัวอย่าง ดังนั้นอาจมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพิ่มเติมจากผลเงาะโดยการเก็บผลเงาะตามช่วงเวลาการออกผลของแต่ละสายพันธุ์เพื่อเปรียบเทียบว่าผลการทดลองที่ได้ไปในทางเดียวกันกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบหรือไม่

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีไอไทด์ และเทคนิค SRAP ควรจะมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างขึ้น และควรมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีนอื่นๆ เช่น *mat*K, *trn*T-*trn*L และ *trn*L-*trn*F ศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ เช่น Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง


กลุ่มเกษตรสัญจร. 2543. **การปลูกเงาะ.** พิมพ์ครั้งที่ 3. นนทบุรี : ฐานเกษตรกรรม

ดลรัชต์ สุดหล้าและพิเชษฐ์ศักดิ์ ศรีวงศ์. 2553. **ความหลากหลายของแก่นตะวันจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SRAPs.** [online]. Available: http://gsmis.gs.kku.ac.th/publish/details/8380

นิดดา หงษ์วิวัฒน์. 2550. **ผลไม้ ๑๑๑ ชนิด คุณค่าอาหารและการกิน.** กรุงเทพฯ: แสงแดด

นฤมล ธนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์. 2557. "การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1." *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 22(5) : 674-682.

นฤมล มานิพพาน. 2552. **การปลูกและขยายพันธุ์เงาะ.** กรุงเทพฯ: เพชรกะรัต

ปิยดา บุสดี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. 2558. "การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 และ *rbc*L." *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 23(6) : 983-993.

พีรศักดิ์ วรสุนทโรสถ, สุนทร ดุริยะประพันธ์, ทักษิณ อาชวาคม, สายันต์ ต้นพานิช, ชลธิชา นิวาส-ประกฤติ และ ปรียานันท์ ศรสูงเนิน. 2544. **โครงการทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลำดับที่ 2 ไม้ผลและไม้ผลเคี้ยวมัน.** กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์

สุชาดา สุขหร่อง. 2553. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร.** กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุรีพร เกตุงาม. 2546. "เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช." *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.* 5(2) : 37-59.

ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี. 2559. **เงาะพันธุ์พลิ้วเบอร์ 3.** [online]. Available: www.doa.go.th/hrc/chantaburi/images/files/rambutan_3.pdf

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และทัศนารถ กระจ่างวุฒิ. 2556. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora*. หน้า 214-217. **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18.**

โองการ วณิชาชีวะ และเฟื่องฟ้า สีสร้อย. 2555. "การสร้างรูปแบบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายเอส-อาร์เอพีและไอพีบีเอสของไผ่รวกสยาม." *Thai Journal of Science and Technology.* 3(1) : 45-56.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Abedian, M. Talebi M. Golmohammdi, H.R. and Tabatabaei, B.E.S. 2012. "Genetic Diversity and Population Structure of Mahaleb Cherry (*Prunus mahaleb* L.) and Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) using SRAP Markers" *Biochemical Systematics and Ecology*. 40: 112-117.

Brown, S.M. McFadden, A.K.S. and Kresovish, S. 1996. "Development and Application of Aimple Aequence Repeat (SSR) Loci for Plant Genome Analysis." *In Method of Genome Analysis in Plant* (Jauhar, Prem, ed.). CRS Press, Inc. Boca raton, FL. U.S.A. 386 pp.

Clyde, M.M. Chew, P.C. Saima, I. Normah, M.N. and Rao, V.R. 2005. **Genetic Diversity of *Nephelium Rambutan-Ake* Leenh.** [Online]. Available : http.//www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=918_105

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. "A rapid DNA Isolation Procedure from Small Quantities of Fresh Leaf Tissues." Phytochemical Bulletin. 9: 11-15.

Li, G. and Quiros, C.F. 2001. "Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP)" a New Marker System based on a Simple PCR Reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. Theoretical and Applied Genetics. 103: 455-461.

Liu, L. Chen, W. Zheng, X. Li, J. Yan, D.T. Liu, L. Liu, X. and Wang Y.L. 2016. "Genetic Diversity of *Ulmus lamellose* by Morphological Traits and Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) Markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 66: 272-280.

Tamura, M.N. Yamashita,J. Shizuka Fuse and Haraguchi, M. 2004. "Molecular Phylogeny of Monocotyledons Inferred from Combined Analysis of Plastid *mat*K and *rbc*L Gene Sequence." *The Botanical Society of Japan and Springer-Verlag Tokyo.* 117: 109-120.

Rohlf, F.J. 2000. "NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multiveriate Analysis System." version 2.1 Setauket, New York: Exeter Software.

Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. "Numerical Taxonomy". San Fancisco: W.H. Freeman and Company.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Williams, J.G.K. Kubelik, A.R. Livak, K.J. Rafalski, J.A. and Tingey, S.U. 1990. "DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers." Nucleic Acids Res. 8 (22): 6531-6535.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก
# การเตรียมสารเคมี

## 1. การเตรียม 2X CTAB

เตรียม 2X CTAB ปริมาตร 300 มิลลิลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1.1 สารเคมี

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1.1 | CTAB | 6 | กรัม |
| 1.1.2 | 5 M NaCl | 84 | มิลลิลิตร |
| 1.1.3 | 0.5 M EDTA pH 8 | 12 | มิลลิลิตร |
| 1.1.4 | Polyvinylpyrrolidone (PVP) | 3 | กรัม |

1.2 ขั้นตอน

1.2.1 เตรียมสารละลาย 5 M NaCl, 0.5 M EDTA pH 8 และน้ำกลั่น พร้อมกับกระบอกตวง ขวดดูแรน และบีกเกอร์พร้อม magnetic bar นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave

1.2.2 ชั่ง CTAB 6 กรัม และ PVP 3 กรัม ละลายด้วย 5 M NaCl ปริมาตร 84 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer ช่วย แล้วเติม 0.5 M EDTA pH 8 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร

1.2.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จนปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 300 มิลลิลิตร แล้วเก็บใส่ในขวดดูแรนที่ปลอดเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 2. การเตรียม RNase A

เตรียม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

2.1 สารเคมี

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2.1.1 | RNase A | 20 | กรัม |
| 2.1.2 | DI water | 1 | มิลลิลิตร |

2.2 ขั้นตอน

ชั่ง RNase A 20 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม DI water ลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร จากนั้นเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก (ต่อ)

**3. การเตรียม 10 เปอร์เซ็นต์ CTAB ใน 0.7 M NaCl**

เตรียม 10 เปอร์เซ็นต์ CTAB ใน 0.7 M NaClปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

3.1 สารเคมี

| | | |
|---|---|---|
| 3.1.1 CTAB | 10 | กรัม |
| 3.1.2 0.7 M NaCl | 100 | มิลลิลิตร |

3.2 ขั้นตอน

3.2.1 เตรียมสารละลาย 0.7 M NaCl และกระบอกตวง ขวดดูแรนบีกเกอร์พร้อม magnetic bar นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave

3.2.2 ชั่ง CTAB 10 กรัม แล้วละลายด้วยสารละลาย 0.7 M NaCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้ magnetic stirrer ช่วยจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเก็บใส่ ขวดดูแรนที่ปลอดเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**4. การเตรียมTE buffer**

เตรียม TE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารเคมีที่ใช้เตรียมดังนี้

4.1 สารเคมี

| | | |
|---|---|---|
| 4.1.1 1 M TrisHCl pH 8 | 1000 | ไมโครลิตร |
| 4.1.2 0.5 M EDTA pH 8 | 200 | ไมโครลิตร |
| 4.1.3 น้ำกลั่น | | |

4.2 ขั้นตอน

ปิเปต1 M TrisHCl pH 8 ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.5 M EDTA pH 8 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อโดย autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**5. การเตรียม 1.25 mMdNTPs**

เตรียม 1.25 mMdNTPs ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารเคมีที่ใช้และเตรียมดังนี้

5.1 สารเคมี

| | | |
|---|---|---|
| 5.1.1 100 mMdATP | 1.25 | ไมโครลิตร |
| 5.1.2 100 mMdCTP | 1.25 | ไมโครลิตร |
| 5.1.3 100 mMdGTP | 1.25 | ไมโครลิตร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก (ต่อ)

| | | |
|---|---|---|
| 5.1.4 100 mMdTTP | 1.25 | ไมโครลิตร |
| 5.1.5 DI water | 95 | ไมโครลิตร |

5.2 ขั้นตอน

ปิเปต DI water 95 ไมโครลิตรในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วปิเปต 100 mM dATP, dCTP, dGTP และ dTTP สารละ 1.25 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**6. การเตรียมไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค SRAP**

เตรียมไพรเมอร์สำหรับเทคนิค SRAP แต่ละไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เตรียมดังนี้

6.1 สารเคมี

| | | |
|---|---|---|
| 6.1.1 100 µM primer SRAP | 20 | ไมโครลิตร |
| 6.1.2 DI water | 80 | ไมโครลิตร |

6.2 ขั้นตอน

ปิเปต DI water ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตรแล้วปิเปต 100 ไมโครโมลาร์ primer SRAP ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

**7. การเตรียม Tris-borate EDTA buffer**

เตรียม TBE buffer ปริมาตร 1 ลิตร เตรียมดังนี้

7.1 สารเคมี

| | | |
|---|---|---|
| 7.1.1 Tris-base | 10.781 | กรัม |
| 7.1.2 EDTA | 0.9305 | กรัม |
| 7.1.3 Boric acid | 6.138 | กรัม |
| 7.1.4 น้ำกลั่น | | |

7.2 ขั้นตอน

7.1.1 ชั่ง Tris-base, EDTA และ Boric acid แล้วค่อยๆ ละลายด้วยน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน

7.1.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดย autoclave และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก (ต่อ)

**8. การเตรียมเอธิเดียมโบรไมด์**

เตรียมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 10 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร สารที่ต้องเตรียมมีดังนี้

8.1 สารเคมี

| | | | |
|---|---|---|---|
| 8.1.1 | 10 mg/ml EtBr | 0.5 | มิลลิลิตร |
| 8.1.2 | น้ำกลั่น | | |

8.2 ขั้นตอน

เตรียมถาดพร้อมฝาที่ห่อฟรอยด์สำหรับใส่สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 499.5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปต 10 mg/ml EtBr ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในน้ำกลั่น เขย่าถาดไปมาเล็กน้อยให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในที่มิดชิดไม่ให้แสงเข้าถึง ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข

**ตารางภาคผนวก ข-1** ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนจากวิธี simple matching ของตัวอย่างเงาะ 13 ตัวอย่าง

| | LM3 | LM4 | LM5 | LM6 | LM8 | LM9 | LM10 | LM12 | LM13 | LM14 | LM16 | LM18 | LM20 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LM3 | 1.00 | | | | | | | | | | | | |
| LM4 | 0.82 | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| LM5 | 0.75 | 0.78 | 1.00 | | | | | | | | | | |
| LM6 | 0.81 | 0.82 | 0.80 | 1.00 | | | | | | | | | |
| LM8 | 0.83 | 0.84 | 0.75 | 0.87 | 1.00 | | | | | | | | |
| LM9 | 0.78 | 0.82 | 0.86 | 0.87 | 0.85 | 1.00 | | | | | | | |
| LM10 | 0.69 | 0.72 | 0.78 | 0.77 | 0.80 | 0.75 | 1.00 | | | | | | |
| LM12 | 0.75 | 0.81 | 0.83 | 0.86 | 0.84 | 0.86 | 0.78 | 1.00 | | | | | |
| LM13 | 0.69 | 0.76 | 0.76 | 0.80 | 0.80 | 0.80 | 0.72 | 0.81 | 1.00 | | | | |
| LM14 | 0.74 | 0.80 | 0.80 | 0.87 | 0.87 | 0.89 | 0.84 | 0.90 | 0.75 | 1.00 | | | |
| LM16 | 0.75 | 0.81 | 0.74 | 0.82 | 0.86 | 0.80 | 0.70 | 0.78 | 0.91 | 0.77 | 1.00 | | |
| LM18 | 0.82 | 0.74 | 0.74 | 0.84 | 0.84 | 0.80 | 0.70 | 0.83 | 0.83 | 0.80 | 0.91 | 1.00 | |
| LM20 | 0.70 | 0.69 | 0.82 | 0.76 | 0.78 | 0.81 | 0.75 | 0.80 | 0.71 | 0.81 | 0.77 | 0.80 | 1.00 |

# ภาคผนวก ข (ต่อ)

**ตารางภาคผนวก ข-2** พิกัดตัวอย่างเงาะ

| รหัส | สายพันธุ์ | จังหวัด | พิกัด |
|---|---|---|---|
| LM 1 | สีชมพู | จันทบุรี | 12° 39.978'N 102° 5.972'E |
| LM 2 | โรงเรียน | จันทบุรี | 12° 39.93'N 102° 5.674'E |
| LM 3 | โรงเรียน | จันทบุรี | 12° 30.672'N 102° 10.368'E |
| LM 4 | โรงเรียน | จันทบุรี | 12° 30.671'N 102° 10.376'E |
| LM 5 | สีทอง | จันทบุรี | 12° 30.666'N 102° 10.371'E |
| LM 6 | พลิ้ว 4 | จันทบุรี | 12° 30.615'N 102° 10.376'E |
| LM 7 | พลิ้ว 1 | จันทบุรี | 12° 30.671'N 102° 10.376'E |
| LM 8 | พลิ้ว 5 | จันทบุรี | 12° 30.665'N 102° 10.389'E |
| LM 9 | พลิ้ว 6 | จันทบุรี | 12° 30.667'N 102° 10.399'E |
| LM 10 | พลิ้ว 3 | จันทบุรี | 12° 30.661'N 102° 10.399'E |
| LM 11 | พลิ้ว 8 | จันทบุรี | 12° 30.664'N 102° 10.41'E |
| LM 12 | พลิ้ว 2 | จันทบุรี | 12° 30.662'N 102° 10.412'E |
| LM 13 | ไม่ทราบสายพันธุ์ (ตัวผู้) | จันทบุรี | 12° 30.667'N 102° 10.442'E |
| LM 14 | สีชมพู | จันทบุรี | 12° 30.671'N 102° 10.451'E |
| LM 15 | สีชมพู | จันทบุรี | 12° 30.663'N 102° 10.455'E |
| LM 16 | ไม่ทราบสายพันธุ์ (ตัวผู้) | จันทบุรี | 12° 30.666'N 102° 10.427'E |
| LM 17 | พลิ้ว 6 | จันทบุรี | 12° 30.67'N 102° 10.382'E |
| LM 18 | ไม่ทราบสายพันธุ์ | นครนายก | 14°16.565'N 101°13.095'E |
| LM 19 | ไม่ทราบสายพันธุ์ | นครนายก | 14°16.571'N 101°13.112'E |
| LM 20 | ปีนัง | นครนายก | 14°16.578'N 101°13.108'E |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้