# การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80

# DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS FOR INDENTIFICATION OF PAPAYA KHON KAEN 80

**สุทวัฒน์ สินธีรโรจน์**

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร**
**ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช**
**คณะเทคโนโลยีการเกษตร**
**มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี**
**ปีการศึกษา 2557**
**ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี**

# การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80

สุทวัฒน์ สินธีรโรจน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80<br>Development of Molecular Markers for Identification of Papaya Khon Kaen 80 |
| **ชื่อ – นามสกุล** | นายสุทวัฒน์ สินธีรโรจน์ |
| **สาขาวิชา** | เทคโนโลยีการผลิตพืช |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, Ph.D. |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์คำรพ รัตนสุต, Ph.D. |
| **ปีการศึกษา** | 2557 |

**คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์**

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์บัวทิพย์ อุบลประเสริฐ, วท.ด.)

..... กรรมการ
(อาจารย์ภาณุ เรืองจันทร์, Ph.D.)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, Ph.D.)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์คำรพ รัตนสุต, Ph.D.)

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิงรุ้งสวรรค์ วรรณสุทธิ์, พบ.ม.)
วันที่ 7 เดือน กันยายน พ.ศ. 2558

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80 |
| **ชื่อ – นามสกุล** | นายสุทวัฒน์ สินธีรโรจน์ |
| **สาขาวิชา** | เทคโนโลยีการผลิตพืช |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, Ph.D. |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์คำรพ รัตนสุต, Ph.D. |
| **ปีการศึกษา** | 2557 |

## บทคัดย่อ


การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ (*Carica papaya* L.) จำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ จากการทดสอบไพรเมอร์ จำนวน 60 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 57 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 612 แถบ มีแถบที่แสดงความแตกต่างกัน จำนวน 240 แถบ (39 %) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาด 160 ถึง 3,000 คู่เบส ค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.47 ถึง 0.99 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ค่าดัชนีความเหมือน สามารถจัดกลุ่มมะละกอออกเป็น 2 กลุ่ม สอดคล้องกับแหล่งที่มาของพันธุ์มะละกอ

การวิเคราะห์ผลที่ได้จากไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ P19 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับมะละกอฟลอริดา ท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 และไพรเมอร์ P16 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับมะละกอท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 ทำการโคลนหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะทั้ง 2 ชิ้น และออกแบบ SCAR primer 2 คู่ จากนั้นนำไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ไปใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์ ซึ่งผลที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_P19F กับ KK80_P19R ให้แถบดีเอ็นเอสายพันธุ์ ฟลอริดา ท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 ขนาด 268 คู่เบส ในสายพันธุ์อื่นให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 257 คู่เบส เช่นเดียวกับผลที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_P16F กับ KK80_P16R ให้แถบดีเอ็นเอสายพันธุ์ท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 ขนาด 793 คู่เบส แต่ในสายพันธุ์อื่นให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 764 คู่เบส เมื่อนำ SCAR primer ทั้ง 2 คู่ ไปทดสอบกับตัวอย่างมะละกอขอนแก่น 80 จำนวน 60 ต้น พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ แสดงความจำเพาะกับตัวอย่างมะละกอขอนแก่น 80 ทุกต้น

เครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถจำแนกมะละกอท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 ออกจากมะละกอสายพันธุ์อื่นได้ แต่ไม่สามารถแยกมะละกอท่าพระ 3 และ ขอนแก่น 80 ออกจากกันได้



**คำสำคัญ:** มะละกอ ขอนแก่น 80 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุล ไอเอสเอสอาร์ สการ์

| | |
|---|---|
| **Thesis Title** | Development of Molecular Markers for Identification of Papaya Khon Kaen 80 |
| **Name – Surname** | Mr. Suttawat Sinthirarot |
| **Program** | Crop Production Technology |
| **Thesis Advisor** | Assistant Professor Piyavadee Charoenwattana, Ph.D. |
| **Thesis Co-Advisor** | Assistant Professor Kumrop Ratanasut, Ph.D. |
| **Academic Year** | 2014 |

# ABSTRACT

Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers were used to analyze the genetic diversity analysis of 32 papaya cultivars (*Carica papaya* L). Fifty-seven selected ISSR primers out of 60 amplified 612 DNA bands, ranging in size from 160 to 3,000 base pairs, of which 240 DNA bands were polymorphic (39%). The similarity index ranged from 0.47 to 0.99. Cluster analysis using unweighted pair group method arithmetic mean (UPGMA) for genetic similarity indexes indicated that the 32 cultivars were clustered into two major groups, in accordance with their geographical locations.

Among 57 ISSR primers, primer P19 produced a band specific to Florida, Tha Phra 3 and Khon Kaen 80 cultivars, while primer P16 produced a band specific to Tha Phra 3 and Khon Kaen 80 cultivars. These two DNA fragments were cloned and sequenced, and two pairs of SCAR primers were designed. The PCR reactions were employed using genomic DNA of 32 papaya cultivars. SCAR primers KK80_P19F and KK80_P19R produced the 268-bp fragment specific to Florida, Tha Phra 3 and Khon Kaen 80 cultivars and the 257-bp fragment which was common in other cultivars. SCAR primers KK80_P16F and KK80_P16R produced the 793-bp fragment specific to Tha Phra 3 and Khon Kaen 80 cultivars and the 764-bp fragment which was common in other cultivars. The DNA patterns derived from these two pairs of SCAR primers showed consistency in all tested 60 individuals of Khon Kaen 80.

The molecular markers developed from this research could be used to identify Tha pha 3 and Khon Kaen 80 cultivars from other tested cultivars, however, the markers could not differentiate between Tha pha 3 and Khon Kean 80.

**Keywords:** Papaya, Khon Kaen 80, Genetic diversity, Molecular Markers, ISSR, SCAR

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความดูแลและช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวดี เจริญวัฒนะ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คำรพ รัตนสุต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ เสนอแนะ ในการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัวทิพย์ อุบลประเสริฐ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.ภาณุ เรืองจันทร์ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสุภาวดี ง้อเหรียญ และคุณอรุโณทัย ซาววา สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพกรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ สารเคมี ให้คำแนะนำ และคำปรึกษาด้านเทคนิคต่างๆในห้องปฏิบัติการ ทำให้ผู้วิจัยได้รับความรู้และทักษะในด้านการปฏิบัติการทดลอง และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์มะละกอเพื่อนำมาใช้ศึกษาในงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างมะละกอขอนแก่น 80 เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาในงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้า ตลอดจนเพื่อน พี่ น้อง ทุกๆคน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้กันอย่างดีเสมอมา คุณความดีหรือประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นเครื่องบูชาแด่บุพการีผู้ให้กำเนิด บูรพาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุทวัฒน์ สินธีรโรจน์

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…….. (3)

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……. (4)

กิตติกรรมประกาศ…….. (5)

สารบัญ……... (6)

สารบัญตาราง…….. (9)

สารบัญภาพ…… (11)

**บทที่**

1 บทนำ…….. 1

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา……...……...……... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย……...…… 3

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย……..…… 3

1.4 ขอบเขตของการวิจัย……..…… 3

1.5 ขั้นตอนการศึกษาวิจัย……..…….. 3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……..……. 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….……..... 5

2.1 ลักษณะทั่วไปของมะละกอ……..…….. 5

2.2 พันธุ์และลักษณะประจำพันธุ์……..……..... 6

2.3 พันธุ์ขอนแก่น 80……..……..……..... 8

2.4 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชด้วยเครื่องหมายโมเลกุล……..... 9

2.5 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Markers) ที่นิยมใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม……..…… 13

3 วิธีดำเนินการวิจัย……...……... 22

3.1 อุปกรณ์……...…… 22

# สารบัญ (ต่อ)


| บทที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| | 3.2 วิธีการทดลอง……..……...…….. | 23 |
| | การทดลองที่ 1 จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeats)…….…..... | 23 |
| | การทดลองที่ 2 ศึกษาพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอลูกผสมพันธุ์ขอนแก่น 80……..…..…… | 27 |
| | 3.3 สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย…….……...…….. | 30 |
| 4 | ผลการทดลอง……..……. | 31 |
| | 4.1 การเตรียมต้นกล้ามะละกอ……..…… | 31 |
| | 4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมะละกอ……...……...…… | 32 |
| | 4.3 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ ……...….... | 34 |
| | 4.4 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์…….....……..…… | 35 |
| | 4.5 การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล……...……. | 38 |
| | 4.6 การคัดเลือกแถบดีเอ็นเอต่างที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์…… | 39 |
| | 4.7 การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ……...……. | 42 |
| | 4.8 การออกแบบ SCAR primer และตรวจสอบความจำเพาะ……...…..... | 44 |
| | 4.9 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบ. | 47 |
| | 4.10 การประยุกต์ใช้เครื่องหมาย SCAR ที่พัฒนามาจากเครื่องหมายไอเอเอสอาร์…….. | 49 |
| 5 | วิจารณ์ผลการทดลอง สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ……..…..…….. | 51 |
| | 5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง……...…….…… | 51 |
| | 5.2 สรุปผลการวิจัย……...……. | 53 |

# สารบัญ (ต่อ)


| บทที่ | หน้า |
|---|---|
| 5.3 ข้อเสนอแนะ…….....…… | 54 |
| บรรณานุกรม…….. | 55 |
| ภาคผนวก……... | 62 |
| ภาคผนวก ก……...……...…… | 63 |
| ภาคผนวก ข…….....……..…… | 65 |
| ภาคผนวก ค……..…...……..…… | 87 |
| ประวัติผู้วิจัย……..... | 112 |

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**

4.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A260 และ A280) และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์..... 33

4.2 แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์ ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์..... 36

# สารบัญตาราง (ต่อ)


**ตารางผนวกที่** **หน้า**

1 ค่าสัญลักษณ์ตัวเลขจากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์……..…..... 87


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | หน้า |
|---|---|
| 2.1 แผนผังแสดงการทำปฏิกิริยาของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์…….……. | 16 |
| 2.2 แผนผังแสดงขั้นตอนการทำงานของเครื่องหมาย SCAR ……..…….. | 20 |
| 3.1 แผนที่ของ pJET1.2/blunt Cloning Vector……..…..…… | 28 |
| 4.1 ต้นกล้ามะละกออายุ 2 เดือนหลังจากต้นอ่อนงอกจากการเพาะเมล็ด……...…… | 31 |
| 4.2 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์……..…..… | 32 |
| 4.3 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 60 ไพรเมอร์ จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอรวมของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์……..…… | 34 |
| 4.4 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ P21……...…… | 35 |
| 4.5 ค่าดัชนีความเหมือนของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์……...……..…… | 38 |
| 4.6 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์ และวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธี UPGMA…… | 39 |
| 4.7 แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ P19……...… | 40 |
| 4.8 แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ P16……...……... | 41 |
| 4.9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำโคโลนีพีซีอาร์……..…… | 42 |
| 4.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของมะละกอขอนแก่น 80 ที่ได้จากไพรเมอร์ P19 และ P16……...…… | 43 |
| 4.11 แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ KK80_19F กับ KK80_19R……..…..……. | 45 |
| 4.12 แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ KK80_16F กับ KK80_16R……. | 46 |

# สารบัญภาพ (ต่อ)

**ภาพที่** **หน้า**

4.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_P19F กับ KK80_P19R ของมะละกอฟลอริดา ท่าพระ 3 แขกดำ และขอนแก่น 80..... 47

4.14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_P16F กับ KK80_P16R ของมะละกอ ฟลอริดา ท่าพระ 3 แขกดำ และขอนแก่น 80..... 48

4.15 ผลทดสอบการนำคู่ของ SCAR primer ที่ได้มาจากการศึกษา ทดสอบกับตัวอย่างมะละกอขอนแก่น 80 จำนวน 60 ต้น.....… 50

# สารบัญภาพ (ต่อ)

**ภาพผนวกที่** **หน้า**

1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในโครโมโซมประเภทดูพลิเคชัน……..…….… 64
2 แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากดีเอ็นเอมาตรฐาน……..... 66
3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 57 ไพรเมอร์…….……..……. 67

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นไม้ผลเขตร้อนชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางอาหารสูง เป็นพืชที่ปลูกง่ายเจริญเติบโตเร็วและให้ผลผลิตตลอดทั้งปี ผลดิบนิยมนำมาใช้ประกอบในผักสลัดและส้มตำ ซึ่งเป็นอาหารพื้นบ้านทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่จัดว่ามีรสชาติดีและเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก นอกจากนั้นยังใช้ปรุงอาหารคาวหวานได้หลายอย่าง (เกศิณี, 2530) ผลสุกเพื่อกินสด ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารสูง อุดมด้วยวิตามินเอ และวิตามินซี และยังใช้ในอุตสาหกรรมการทำซอสมะเขือเทศ ซอสพริก น้ำผลไม้ และทำสีผสมอาหาร (ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ, 2540) นอกจากนี้ยางมะละกอยังมีสารปาเปน (papain) ซึ่งมีคุณสมบัติในการช่วยย่อยโปรตีน จึงมีการนำน้ำยางมะละกอไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น ใช้ในการปรับปรุงความนุ่มในเนื้อสัตว์อุตสาหกรรมการฟอกหนังโดยไม่ทำให้ขนสัตว์หดตัว อุตสาหกรรมเนื้อกระป๋อง การทำยาง การทำเบียร์ ส่วนผสมของหมากฝรั่ง ยาระบาย และเครื่องสำอางเป็นต้น ส่วนรากและก้านใบเป็นยาขับปัสสาวะ ยาถ่ายพยาธิ (ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ, 2544) และน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดมะละกอมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (กรดโอเลอิก) เป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก อีกทั้งยังมีสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นน้ำมันที่ได้จากเมล็ดมะละกอจึงมีแนวโน้มที่จะผลิตเป็นน้ำมันพืชเพื่อการบริโภคได้ (ปิยวดี, 2551) ในปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมะละกอในเชิงการค้าขนาดใหญ่ของประเทศอยู่ในภาคต่างๆทั่วประเทศ เพื่อการบริโภคภายในประเทศและเพื่อการส่งออก ส่วนใหญ่เป็นมะละกอผลสุกและมะละกอแปรรูปเป็นผลไม้กระป๋อง และผลไม้อบแห้ง นอกจากนั้นยังมีการผลิตมะละกอเพื่อกรีดน้ำยางไปใช้ในทางอุตสาหกรรม (พิภพ และสิริรัตน์, 2552)

เนื่องจากมะละกอมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมีผู้นิยมปลูกกันมากขึ้นทำให้มีการพยายามพัฒนาพันธุ์ ไม่ว่าจะเป็นการพัฒนาสายพันธุ์หรือการสร้างพันธุ์ลูกผสมเพื่อให้ได้พันธุ์มะละกอที่มีคุณภาพ ทำให้มะละกอพันธุ์ที่นิยมปลูกในปัจจุบันมีความหลากหลายสายพันธุ์ จำแนกแหล่งที่มาและความเกี่ยวข้องกันทางพันธุกรรมค่อนข้างยาก บางครั้งก็มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา (morphology) ไปตามสภาพแวดล้อม มีการตั้งชื่อพันธุ์เป็นพันธุ์ใหม่ไปเรื่อยๆ ตามถิ่นที่ปลูกหรือตามลักษณะที่เปลี่ยนไป และมักเกิดความสับสนในการเรียกชื่อพันธุ์ การซื้อเมล็ดพันธุ์ ตลอดจนการผลิตเมล็ดพันธุ์ในอนาคต ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพผลผลิตของมะละกอที่ไม่ได้มาตรฐานตรงตามพันธุ์ (Janthasri *et al*., 2007)

กรมวิชาการเกษตรโดยศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตขอนแก่น หรือสถานีทดลองพืชสวนขอนแก่นเดิม ได้ดำเนินโครงการพัฒนาพันธุ์มะละกอทนทานโรคจุดวงแหวนควบคู่ไปกับการพัฒนามะละกอผลเล็กกินสุกเพื่อการรองรับตลาดในอนาคตมาตั้งแต่ปี 2530 โดยนำพันธุ์ Florida Tolerant ของมหาวิทยาลัยฟลอริดาที่มีความทนทานต่อโรคจุดวงแหวน (Conover *et al*., 1986) มาผสมกับพันธุ์แขกดำที่คนไทยนิยมแต่อ่อนแอต่อโรคมากที่สุด ได้ลูกผสมหลากหลายจึงคัดเลือกต่อไปโดยวิธีคัดเลือกพันธุ์ซ้ำ (recurrent selection) จนได้ลูกผสมที่มีผลลักษณะขนาดเล็กและมีความทนทานต่อโรคจุดวงแหวนดีโดยกรมวิชาการเกษตรได้ตั้งชื่อว่า “ขอนแก่น 80” โดยคาดว่าจะเป็นมะละกอผลเล็กสายพันธุ์ไทยที่เป็นที่นิยมต่อไป (วิไล และคณะ, 2551)

การใช้โมเลกุลเครื่องหมายซึ่งเป็นวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยใช้การเปรียบเทียบโดยสุ่มหรือจำเพาะเจาะจงจากโครโมโซมซึ่งดีเอ็นเอมีคุณสมบัติเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่มีความจำเพาะสำหรับแต่ละสิ่งมีชีวิต (Morris, 1994) โดยวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ได้จากส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชโดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ และสภาพแวดล้อม ทั้งยังสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน จึงสามารถใช้จำแนกความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อจำแนกพันธุ์ได้ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น ในปัจจุบันเทคนิคระดับโมเลกุลมีหลากหลายวิธีที่จะนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของพืช เช่น อาร์เอพีดี เอเอฟแอลพี ไมโครแซทเทิลไลท์ และไอเอสเอสอาร์ ซึ่งแต่ละเทคนิคก็มีข้อดีข้อด้อยแตกต่างกันออกไป บางเทคนิคมีข้อจำกัดในด้านการใช้เทคนิค ซึ่งมีขั้นตอนที่ซับซ้อนใช้เวลาในการดำเนินการนาน ค่าใช้จ่ายสูงและอาจมีปัญหาด้านการทำซ้ำได้ (reproducibility) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาโดยการใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeats) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้ไพรเมอร์เป็นแบบสุ่มคล้ายกับเทคนิคอาร์เอพีดีแต่มีความจำเพาะมากกว่า มีความสามารถในการทำซ้ำ เกิดความแตกต่าง (polymorphism) สูง ใช้เวลาน้อย วิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน ข้อมูลเชื่อถือได้ (reliable) โดยใช้งบประมาณไม่สูงมากและใช้เครื่องมือที่ไม่ซับซ้อน (อรวรรณ, 2547)

การใช้โมเลกุลเครื่องหมายในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่มาของพันธุ์มะละกอขอนแก่น 80 และข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับลักษณะประจำพันธุ์ของมะละกอขอนแก่น 80 โดยข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์มะละกอขอนแก่น 80

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษโดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (Inter-Simple Sequence Repeats)

1.2.2 เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะ ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของมะละกอขอนแก่น 80

## 1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษได้ และสามารถออกแบบไพรเมอร์โดยใช้เทคนิค SCAR ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะในการจำแนกมะละกอขอนแก่น 80 ออกจากพันธุ์อื่นๆได้

## 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์

1.4.2 ศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ที่มีความจำเพาะในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของมะละกอขอนแก่น 80

## 1.5 ขั้นตอนการศึกษาวิจัย

1.5.1 เพาะเมล็ดมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษเพื่อนำใบมาสกัดดีเอ็นเอ สำหรับใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์

1.5.2 ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อมะละกอขอนแก่น 80 เพื่อนำไปโคลน และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นออกแบบ SCAR primer และตรวจสอบผลโดยพีซีอาร์ เพื่อจำแนกมะละกอขอนแก่น 80

1.5.3 ยืนยันผลที่ได้จากเทคนิค SCAR โดยนำ SCAR primer ที่มีความจำเพาะต่อมะละกอขอนแก่น 80 ไปตรวจสอบกับมะละกอขอนแก่น 80 ซึ่งได้เก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์

1.6.2 ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของมะละกอขอนแก่น 80 เพื่อนำไปใช้คัดเลือกต้นพันธุ์หรือคัดเลือกสายพันธุ์ที่ตรงตามพันธุ์

# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ลักษณะทั่วไปของมะละกอ

มะละกอมีชื่อสามัญว่า papaya และชื่อวิทยาศาสตร์ *Carica papaya* L. อยู่ในสกุล *Carica* วงศ์ Caricaceae (Purseglove, 1974; Singh, 1964) เป็นไม้ผลเมืองร้อนที่สามารถปลูกง่ายและออกผลได้ตลอดทุกฤดูกาล มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในเขตร้อนของทวีปอเมริกาซึ่งได้แก่ ประเทศเม็กซิโกและคอสตาริกา (Purseglove, 1974) จากนั้นได้มีการแพร่ กระจาย มายังทวีปเอเชียในปี พ.ศ. 2143 โดยนักเดินเรือชาวสเปนและโปรตุเกสได้นำเมล็ดมาปลูกในหมู่เกาะมะลักกาอินเดียและฟิลิปปินส์ (Chandler, 1958; Nakasone, 1975) และเป็นที่รู้จักกันทั่วไปในแถบประเทศตะวันออกรวมถึงประเทศไทย

มะละกอเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่งของประเทศไทยมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปในแต่ละท้องถิ่น เช่นบักฮุ้ง (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) มะกวยเต็ด (ภาคเหนือ) และลอกอ (ภาคใต้) (ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ, 2543) มะละกอมีชื่อเรียกสามัญต่างๆกันโดยทั่วไปจะเรียกว่า papaya ส่วนบริเวณหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิกแอฟริกาและสหราชอาณาจักรเรียกว่า pawpaw หรือ papaw แต่ประเทศแถบอเมริกาเหนือนั้นคำว่า pawpaw หมายถึง *Asimina triloba* อยู่ในวงศ์ Annonaceae ซึ่งมิได้มีความสัมพันธ์กับมะละกอแต่อย่างใด ส่วนประเทศบราซิลเรียกมะละกอว่า mamao ประเทศเวเนซูเอลาและโปรตุเกสเรียก lechoso ในคิวบาเรียกว่า fruitabomba มาเลเซียเรียก kepaya หรือ katela หรือ ketek (Allen, 1967; Purseglove, 1974; Samson, 1980) ในทางอนุกรมวิธานได้มีการจัดจำแนกมะละกอไว้ดังนี้

**Class:** Dicotyledonae

**Order:** Passiflrales

**Family:** Caricaceae

**Genus:** Carica

พืชในวงศ์ (Family) Caricaceae นี้มีทั้งหมด 4 สกุล (Genera) (Devi, 1952) ได้แก่

1. สกุล *Carica* มีทั้งหมด 22 ชนิด (species)
2. สกุล *Jacaratia* มีทั้งหมด 6 ชนิด
3. สกุล *Jarilla* มีทั้งหมด 1 ชนิด
4. สกุล *Cylicomorpha* มีทั้งหมด 2 ชนิด

สกุล *Carica, Jacaratia* และ *Jarilla* มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางแถบอเมริกา ส่วนสกุล *Cylicomorpha* มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางแถบเส้นศูนย์สูตรของแอฟริกา สกุลที่ใช้รับประทานได้มีเพียงสกุลเดียวคือ *Carica* เท่านั้น เช่น *C. papaya* ใช้รับประทานได้ทั้งผลดิบและสุก นอกจากนี้ยังมี *C. chinensi, C. goudotiana* และ *C. monoica* ใช้ใบรับประทาน (Storey, 1976)

## 2.2 พันธุ์และลักษณะประจำพันธุ์

พันธุ์มะละกอที่ปลูกในประเทศไทยในระยะแรกเป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศทั้งสิ้น ต่อมาได้มีการปลูกมะละกอกันอย่างแพร่หลายและมีการผสมพันธุ์จนเกิดมะละกอพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะแตกต่างออกไปจากเดิม และได้มีการคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะดีและเหมาะสมมาปลูกต่อๆกัน จนกลายเป็นพันธุ์มะละกอมากมายหลายพันธุ์ด้วยกัน สำหรับพันธุ์มะละกอที่นิยมปลูกกันในปัจจุบัน ได้แก่

**2.2.1 พันธุ์แขกดำ** เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกและรับประทานกันมาก โดยเฉพาะสวนมะละกอในภาคกลางจะนิยมปลูกพันธุ์แขกดำเพราะเป็นพันธุ์ที่มีต้นเตี้ย ออกดอกให้ผลเร็ว ก้านใบสีเขียว ใบหนา สีเขียวเข้ม ผลมีขนาดปานกลางมีรูปร่างเป็นทรงกระบอก ส่วนหัวและส่วนปลายผลมีขนาดเกือบเท่ากันหรือเท่ากัน สีผิวผลเป็นสีเขียวเข้มและผิวไม่เรียบ ผลสุกเนื้อจะมีสีแดง เนื้อแน่นรสหวาน มีช่องว่างภายในผลแคบ น้ำหนักผลโดยประมาณ 0.6-2.0 กิโลกรัม พันธุ์นี้เหมาะสำหรับการบริโภคผลสุกและส่งตลาดต่างประเทศ โดยเฉพาะตลาดฮ่องกงและสิงคโปร์

**2.2.2 พันธุ์แขกนวล** เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับพันธุ์แขกดำมากและนิยมปลูกในบริเวณภาคกลางเช่นเดียวกัน เป็นพันธุ์ที่มีต้นเตี้ย ออกดอกให้ผลเร็ว และให้ผลค่อนข้างสม่ำเสมอตลอดฤดูปลูก ลักษณะรูปร่างผลเหมือนพันธุ์แขกดำแต่สีผิวจะมีสีเขียวอ่อนนวลและผิวผลเรียบ ผลสุกเนื้อมีสีแดง เนื้อแน่น พันธุ์นี้นิยมส่งตลาดภาคอีสานเพราะผลดิบเนื้อแน่นแข็งจึงเป็นที่ต้องการของตลาดอีสานมาก

**2.2.3 พันธุ์แขกดำท่าพระ** เป็นพันธุ์ที่พัฒนามาจากการผสมระหว่างพันธุ์ฟลอริดาทอเลอเรนท์กับพันธุ์แขกดำ ได้พันธุ์แขกดำท่าพระที่มีต้นเตี้ยให้ผลเร็ว ผลมีขนาดใหญ่รูปทรงกระบอกยาวตรง น้ำหนักผลเฉลี่ย 1.5 กิโลกรัม เนื้อหนา ผลดิบเนื้อกรอบ ผลสุกเนื้อสีเหลืองอมส้มมีความหวานประมาณ 11.2 องศาบริกซ์ ทนทานต่อโรคใบด่างวงแหวนดี

**2.2.4 พันธุ์ปากช่อง 1** เป็นพันธุ์ใหม่ที่เกิดขึ้นจากโครงการผลิตเมล็ดพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์มะละกอของสถานีวิจัยปากช่อง ลักษณะก้านใบมีสีเขียวปนม่วง ยาว 70-75 เซนติเมตร ใบมี 7 แฉก ใหญ่กว้าง 50-60 เซนติเมตร เป็นพันธุ์ต้นเตี้ยให้ผลเร็ว ติดผลดก ผลผลิตประมาณ 30-40 กิโลกรัมต่อ

ต้นต่อปี ผลกลมขนาดเล็กน้ำหนักประมาณ 350 กรัมต่อผล เนื้อหนากรอบผลสุกเนื้อสีส้ม เนื้อแข็ง กรอบมีรสหวานกลิ่นหอม มีเปอร์เซ็นต์ความหวานค่อนข้างสูงคือประมาณ 12-14 องศาบริกซ์ เป็นพันธุ์ที่ค่อนข้างทนทานต่อโรคจุดวงแหวน (สิริกุล, 2554)

**2.2.5 พันธุ์แขกดำศรีสะเกษ** เป็นพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์สูง ลำต้นเตี้ย ใบมีสีเขียวเข้มมีเส้นใบ 11 แฉก เริ่มออกดอกเมื่ออายุ 130 วันหลังปลูก เก็บเกี่ยวผลดิบเมื่ออายุประมาณ 3-4 เดือนหลังดอกบานและเก็บเกี่ยวผลสุกเมื่ออายุประมาณ 5-6 เดือนหลังดอกบาน เป็นพันธุ์ที่ให้ผลดก ติดผลเร็ว ให้ผลผลิตเฉลี่ย 52.2 กิโลกรัมต่อต้นต่อปี (ปีที่ 1) และทนทานต่อโรคใบด่างวงแหวนได้ดีปานกลาง ผลมีลักษณะกลมยาวส่วนหัวของผลเล็กกว่าปลายผลเล็กน้อย ส่วนหัวของผลกว้างเฉลี่ย 7.9 เซนติเมตร ส่วนท้ายผลกว้างเฉลี่ย 8.8 เซนติเมตรและผลยาวเฉลี่ย 29.2 เซนติเมตร น้ำหนักผลประมาณ 1.28 กิโลกรัม มีช่องว่างภายในผลแคบคือ 14.8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผลดิบมีสีเขียวเข้ม ผลสุกมีผิวสีส้มเนื้อมีสีแดงเข้มเนื้อแน่นเนื้อหนา 2.6 เซนติเมตรรสชาติหวาน เป็นพันธุ์ที่เหมาะสำหรับปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในบริเวณที่ไม่แล้งจัดเกินไป (พิภพ และ สิริรัตน์, 2552)

**2.2.6 พันธุ์ครั่ง** คัดเลือกสายพันธุ์มาจาก ต. หนองบัว อ. โกสุมพิสัย จ. มหาสารคาม และได้นำมาคัดเลือกพันธุ์ใหม่จนได้ลักษณะตรงตามสายพันธุ์ตามที่ต้องการ คือ เมื่อต้นอายุ 1-3 เดือน จะมีสีแดงอมม่วงอ่อนตามก้านใบและเป็นจุดๆตามลำต้น เมื่ออายุ 5 เดือนสีที่ก้านและจุดประตามลำต้นก็จะหายไป จึงเป็นที่มาของคำว่ามะละกอพันธุ์ครั่งที่เกษตรกรเรียกชื่อในพื้นที่ เมื่อให้ผลผลิตผลมีความยาวเฉลี่ย 47 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางผลเฉลี่ย 9 เซนติเมตร น้ำหนักผลเฉลี่ย 1.9 กิโลกรัม จำนวนผลเฉลี่ย 38 ลูกต่อต้น สีเนื้อผลดิบสีขาวขุ่นกรอบมีรสหวานเล็กน้อยเป็นเอกลักษณ์เหมาะสำหรับทำส้มตำ ผลสุกมีเนื้อสีเหลืองอมส้มรสหวานความหวานเฉลี่ย 12.7 องศาบริกซ์ ปลูกได้ทุกฤดูกาล และยังทนทานต่อโรคจุดวงแหวน (ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตรจังหวัดมหาสารคาม, 2553)

**2.3.7 พันธุ์สีทอง** มีถิ่นกำเนิดจากรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา ถูกนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยนานกว่า 30-40 ปีแล้ว ลักษณะเด่นคือ ผลดิบจะเป็นสีเหลืองทองจนกระทั่งผลสุกจะเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีเหลืองทอง จึงถูกเรียกชื่อว่า “มะละกอสีทอง” ผลดิบเนื้อกรอบฉ่ำน้ำทำส้มตำอร่อยมาก ผลสุกเนื้อแน่นไม่เละ ติดผลได้เรื่อยๆ (สำนักงานจัดรูปที่ดิน จังหวัดอุบลราชธานี, 2556)

**2.3 พันธุ์ขอนแก่น 80**

เกิดจากการนำพันธุ์ฟลอริดาทอเลอเรนท์ของมหาวิทยาลัยฟลอริดาที่มีความทนทานต่อโรคจุดวงแหวน (Conover *et al*., 1986) มาผสมกับพันธุ์แขกดำที่คนไทยนิยมแต่อ่อนแอต่อโรคมากที่สุด ได้ลูกผสมหลากหลายจึงคัดเลือกต่อไปโดยวิธีคัดเลือกพันธุ์ซ้ำ (recurrent selection) ถึงรอบที่ 5 คัดเลือกได้มะละกอ 3 สายพันธุ์คือ พันธุ์ท่าพระ 1 ท่าพระ 2 และท่าพระ 3 ที่มีความทนทานโรคจุดวงแหวนและมีลักษณะทางการเกษตรและคุณภาพดี จึงคัดเลือกพันธุ์ท่าพระ 3 เป็นพันธุ์มะละกอผลเล็กรสชาติหวานอร่อยสำหรับตลาดในอนาคต (วิไลและคณะ, 2540; Gonsalves *et al*., 2006) แต่ขนาดและคุณภาพของผลยังมีความแปรปรวนและมีความทนทานโรคน้อยกว่าพันธุ์ ท่าพระ1 และท่าพระ2 จึงทำการพัฒนาพันธ์ท่าพระ 3 ต่อไปจนคัดได้สายพันธุ์ที่ขนาดผลเล็กจำนวน 2 สายพันธุ์คือ TPL1 และ TPL2 และนำไปทำการทดสอบพันธุ์ในพื้นที่ต่างๆ

จากการทดสอบพันธุ์มะละกอสายพันธุ์ TPL1 และ TPL2 ร่วมกับพันธุ์แขกดำศรีสะเกษและฟลอริดาโทเลอแรนด์พบว่า TPL2 มีคุณภาพดีเด่นใกล้เคียงกับพันธุ์แขกดำศรีสะเกษซึ่งเป็นพันธุ์การค้าในปัจจุบันแต่เป็นพันธุ์ผลขนาดกลางและปัจจุบันทั้งคนไทยและต่างประเทศนิยมรับประทานมะละกอสุกผลเล็กเนื้อสีแดง ดังนั้น TPL2 ที่มีความดีเด่นในแง่ความหวานและขนาดของผลที่เล็กกว่าอาจใช้เป็นพันธุ์ที่เหมาะสำหรับบริโภคสุก สมควรใช้เป็นพันธุ์แนะนำแก่เกษตรกรปลูกเป็นการค้าขายในประเทศและเพื่อการส่งออก เพื่อความเหมาะสมจึงเปลี่ยนชื่อจาก TPL2 เป็นมะละกอพันธุ์ “ขอนแก่น 80” (วิไล และคณะ, 2551) พันธุ์มะละกอที่เป็นฐานพันธุกรรมของมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80 คือ ฟลอริดาทอเลอเรนท์และแขกดำที่มีลักษณะประจำพันธุ์ดังนี้

**พันธุ์ฟลอริดาทอเลอเรนท์** เป็นมะละกอที่มีดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่คนละต้น (Dioecions) มีผลขนาดเล็กกลมน้ำหนัก 400-700 กรัม เมื่อสุกมีสีเหลืองส้ม ผลสุกเก็บเกี่ยวได้ภายใน 5-6 เดือน มีความทนทานต่อโรคจุดวงแหวนดีเป็นพันธุ์ที่พัฒนาโดย Dr. Conover แห่งมหาวิทยาลัยฟลอริดาตั้งแต่ปี 1981-1985 (Conover *et al*., 1986) ปี 2530 Dr. D. Gonsalves ที่ปรึกษาโครงการมะละกอของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้นำพันธุ์ฟลอริดาทอเลอเรนท์ มาทดลองปลูกที่จังหวัดขอนแก่น พบว่าสามารถเจริญให้ผลผลิตดีและมีความทนทานต่อโรคจุดวงแหวนดีมาก อย่างไรก็ตามเนื่องจากลักษณะผลที่กลมเล็กทำให้สับเป็นเส้นทำส้มตำลำบาก เมื่อสุกมีสีเหลืองคนไทยไม่ชอบ

**พันธุ์แขกดำ** มีปลูกแพร่หลายในประเทศไทย คนไทยคุ้นเคยนิยมรับประทานทั้งผลดิบและสุก เป็นพันธุ์ที่มีทั้งต้นที่เป็นเพศผู้ ต้นเพศเมียและต้นสมบูรณ์เพศ (กะเทย) โดยต้นกะเทยให้ผลยาวเรียวเป็นผลขนาดกลางหนัก 1-1.3 ก.ก. ผลดิบเนื้อแน่นกรอบผลสุกมีเนื้อสีแดงส้ม อย่างไรก็ตามมะละกอแขกดำมีความอ่อนแอต่อโรคมากที่สุด

ลักษณะประจำพันธุ์ของพันธุ์ขอนแก่น 80 คือ เป็นพันธุ์ที่มีทั้งต้นที่เป็นเพศผู้ ต้นเพศเมียและต้นสมบูรณ์เพศ ต้นเตี้ยให้ผลเร็วสุกภายใน 6-7 เดือน ผลเล็กน้ำหนักระหว่าง 700-900 กรัม เมื่อสุกเนื้อสีแดงส้มเนื้อหนาแน่นรสชาติหวานหอม เปลือกหนา จึงทนทานต่อการขนส่งได้ดี ผิวเรียบเป็นมันสวยสุกช้ากว่ามะละกอทั่วไป มีความทนทานต่อโรคจุดวงแหวนดีคือ แสดงอาการเหลืองด่างที่ใบแต่ไม่มีอาการที่ผล (วิไล และคณะ, 2551)

## 2.4 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมายโมเลกุลเป็นสิ่งที่บอกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) เป็นที่มาของเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามระดับการแสดงออก

**2.4.1 ระดับทางสัณฐานวิทยา (morphological marker)** เป็นเครื่องหมายที่สามารถมองเห็นได้ทันที ซึ่งก็คือลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะสีตา หรือสีผมในมนุษย์ ลักษณะสีกลีบดอกของกุหลาบ หรือดอกกล้วยไม้ เป็นต้น ซึ่งลักษณะสัณฐานวิทยามีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์พืช หากเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ผลผลิตสูง หรือต้านทานต่อโรคและแมลง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกได้ ข้อได้เปรียบของเครื่องหมายชนิดนี้คือไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการใดมาตรวจสอบ เพราะสามารถมองเห็นได้ด้วยตา แต่ก็มีข้อจำกัดที่สำคัญคือการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยามักได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง เช่น ความสูงต้น ผลผลิต หรือสีดอก ซึ่งได้รับผลกระทบโดยตรงจากความอุดมสมบูรณ์ของดินหรือปุ๋ย รวมทั้งลักษณะบางลักษณะมีการแสดงออกที่บางระยะการเจริญเติบโตเท่านั้น เช่น ลักษณะสีดอกมีการแสดงออกที่ระยะต้นพืชมีดอกเท่านั้น

**2.4.2 ระดับชีวเคมี (biochemical marker)** เป็นเครื่องหมายที่สร้างขึ้นจากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ แต่เครื่องหมายชนิดนี้ มีข้อจำกัดที่การแสดงออกของเอนไซม์ได้รับผลกระทบโดยตรงจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง และระยะการเจริญเติบโตของพืช เช่นเดียวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความจำเพาะเจาะจงต่ำ คือ ถ้ายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไปเล็กน้อย อาจมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดกรดอะมิโน หรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเพียงเล็กน้อยนี้ไม่สามารถตรวจสอบได้

**2.4.3 ระดับโมเลกุล (molecular marker)** เป็นเครื่องหมายที่สร้างมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอจึงถูกเรียกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วย โดยเครื่องหมายชนิดนี้มีข้อได้เปรียบตรงที่มีจำนวนมากมายมหาศาล เนื่องจากขนาดจีโนมของพืชมีประมาณ $10^8$-$10^9$ นิวคลีโอไทด์ ในบางจีโนมพืชพบว่ามีการเกิด single nucleotide mutation ทุกๆ 1 กิโลเบสสภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืชไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายชนิดนี้ (อรรัตน์, 2548)

เนื่องจากการแบ่งกลุ่มหรือการจำแนกกลุ่มต่างๆของสิ่งมีชีวิตทำได้ยาก โดยเฉพาะพืชซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่คล้ายกัน ซึ่งการจำแนกพืชในอดีตอาศัยความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาเช่น ความสูงต้น ลักษณะทรงพุ่ม การใช้ขนาดใบ รูปร่างของเมล็ด ความยาวฝัก สีดอก หรือลักษณะสีฝัก เป็นลักษณะที่ใช้แยกความแตกต่าง แต่ความแตกต่างเหล่านี้ไม่เพียงพอที่จะแยกความแตกต่างของพืชได้อย่างสมบูรณ์ การศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ภายนอกเพียงอย่างเดียวนั้นเกิดความผิดพลาดได้ง่ายเพราะลักษณะบางอย่างแยกจากกันได้ยากหรือไม่แตกต่างกันเลย อีกทั้งลักษณะกายภาพบางลักษณะอาจเป็นผลจากสภาพแวดล้อมภายนอกที่แตกต่างกันทำให้การจำแนกพันธุ์ด้วยวิธีนี้คลาดเคลื่อนเกิดการประเมินลักษณะประจำพันธุ์ที่ผิดพลาด บางลักษณะยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเจริญเติบโต ต้องอยู่ในช่วงที่เหมาะสมจึงจะสามารถจำแนกความแตกต่างได้ เช่น ลักษณะดอก ลักษณะผล และลักษณะผลผลิตเป็นต้น (จรัสศรี, 2548) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในงานปรับปรุงพันธุ์ซึ่งนอกจากต้องมีการบ่งบอกพันธุ์และลักษณะประจำพันธุ์ที่ถูกต้องแม่นยำแล้วยังต้องมีข้อมูลที่สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอีกด้วย เพื่อการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม หากมีข้อมูลความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอมาใช้เป็นข้อมูลประกอบหรือสนับสนุนข้อมูลลักษณะภายนอกจึงน่าจะทำให้การจำแนกพันธุ์มีความรวดเร็วแม่นยำและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่จำเป็นต่องานปรับปรุงพันธุ์ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นวิธีการหนึ่งที่ตอบสนองความต้องการดังกล่าวได้เป็นอย่างดี สามารถใช้เป็นหลักฐานยืนยันลักษณะจำเพาะของพันธุ์ต่างๆได้ สามารถใช้แทนหรือประกอบกับข้อมูลลักษณะภายนอกในการเปรียบเทียบพันธุ์จำแนกพันธุ์และเป็นฐานข้อมูลพันธุกรรมสำหรับรองรับการวิจัยด้านปรับปรุงพันธุ์ได้ (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2554)

การศึกษาพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุลเป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆของสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอเช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection: MAS) การจำแนกสายพันธุ์พืชเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์เพื่อการรวบรวมพันธุ์การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาตำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้

เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม การใช้ประโยชน์ทางด้านการศึกษาลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci; QTL) ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางพืชไร่หลายๆประการเช่น ผลผลิตองค์ประกอบของผลผลิตและลักษณะการเจริญเติบโตของพืช โดยลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ที่ทำงานร่วมกันการแสดงออกเช่นนี้สามารถจำแนกยีนแต่ละตัวที่ควบคุมอยู่ออกมาได้ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอมาช่วยในการทำแผนที่ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนที่สนใจจนสามารถนำส่วนของยีนที่ต้องการออกมาได้ (สุรินทร์, 2552)

ปัจจุบันนิยมใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เป็นเครื่องชี้บอก จัดจำแนก ตรวจสอบสายพันธุ์ และเปรียบเทียบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบพื้นฐานที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด สามารถจำลองโมเลกุลถ่ายทอดสู่ลูก และคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่ในบางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของชิ้นดีเอ็นเอได้แก่ การที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหายไป (deletion) การมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มเข้ามา (duplication) การมีการจัดเรียงตัวใหม่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทำให้ตำแหน่งเปลี่ยนไปจากเดิม (inversion) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนของโครโมโซมไปต่อกับโครโมโซมซึ่งต่างคู่กัน (transposition) ซึ่งทำให้แถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (ประดิษฐ์, 2550) แต่อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอยังเป็นตัวแทนที่เหมาะสมในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์ต่างๆ เทคนิคในการศึกษาในด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลบางเทคนิคอยู่บนหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ เป็นเทคนิคที่นำหลักการทำงานจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายในเซลล์มาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งอยู่ในสารละลาย การทำพีซีอาร์เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซ้ำกันหลายๆรอบเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้งสองด้านของบริเวณดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์เข้าเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3’ ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้นการทำพีซีอาร์จึงจำเป็นต้องทราบลำดับเบสดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำพีซีอาร์คือ สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ดีออกซีนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อน 95 องศาเซลเซียสแล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 35-65 องศาเซลเซียส ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอ

พอลิเมอเรส 72 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้ทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายรอบทำให้ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายปริมาณมาก สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีดังนี้

(1) บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ *Taq* polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้สูงโดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่ต้องการใช้จริง (10x buffer) ซึ่งใช้ปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา

(2) ดีเอ็นทีพี ประกอบด้วย dATP dCTP dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาใช้ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์

(3) ไพรเมอร์ ที่นิยมใช้คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์มีจำนวนของเบส G และ C เท่ากันอยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ทั้งสองชนิดที่ใช้คู่กันควรมีส่วนประกอบของเบส G+C เท่ากันและไม่ควรใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะปลาย 2 ข้างเป็นคู่สมกัน การออกแบบไพรเมอร์อาจอิงลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณโดยตรงหรือใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เมื่อสังเคราะห์ไพรเมอร์เรียบร้อยแล้วจึงนำมาละลายในน้ำหรือ TE buffer ให้มีความเข้มข้น 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (หรือ 5 ไมโครโมลาร์) ปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาคือให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1-2.0 ไมโครโมลาร์

(4) ดีเอ็นเอเป้าหมาย ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ตั้งแต่ 5-500 นาโนกรัมโดยทั่วไปนิยมใช้อยู่ในช่วง 10-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

(5) แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งอาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์ก็ได้ เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ 1.5-10 มิลลิโมลาร์

(6) เอนไซม์ *Taq* polymerase เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้สูง (Thermostable DNA polymerase) ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ชนิดนี้มักถูกเก็บในสารละลายความเข้มข้น 5 ยูนิต ต่อไมโครลิตรและใช้ในปฏิกิริยา 2.5-5 ยูนิต ต่อปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร (สุรินทร์, 2552)

เทคนิคที่นำมาใช้ในการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในระดับโมเลกุลได้มีการศึกษาไว้อย่างหลากหลายและที่นิยมใช้กันได้แก่ อาร์เอฟเอลพี อาร์เอพีดี เอเอฟเอลพี และไมโครแซทเทลไลท์ เครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือก

จีโนไทป์ นอกจากนี้การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกยังช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายอีกด้วย เนื่องจากสามารถคัดเลือกพืชได้โดยไม่ต้องทดสอบโรคแมลงหรือรอจนเก็บผลผลิตได้ การคัดเลือกในแต่ละชั่วอายุจึงสะดวกและง่ายต่อการจัดการในแปลงปลูก ซึ่งในขั้นตอนการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอต้องการวิธีการที่สะดวกรวดเร็วมีประสิทธิภาพและมีการเสนอวิธีการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอให้เป็นไปอย่างรวดเร็วเพื่อประโยชน์ต่อการใช้งาน (อรอุมา, 2548)

## 2.5 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Markers) ที่นิยมใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

**2.5.1 อาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP)** ขั้นตอนการทำอาร์เอฟแอลพีเริ่มจากการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดจะถูกเรียงตามขนาดความยาว โดยชิ้นเล็กสุดหรือสั้นสุดจะเคลื่อนไปไกลสุดจากจุดเริ่มต้น จากนั้นย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนล่อนเมมเบรน แล้วนำดีเอ็นเอติดตามที่เรียกว่าดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) ที่เป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ หรือ complementary DNA (cDNA) ที่ติดฉลากด้วยสารรังสี (radioisotope) ไปจับ (hybridized) กับดีเอ็นเอคู่สม จากนั้นใช้ฟิล์มเอ็กซ์เรย์ทาบกับแผ่นเมมเบรนเพื่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่มีรังสีบนแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์ เทคนิคนี้เรียก autoradiography รูปแบบของจีโนไทป์หรือแถบดีเอ็นเอเป็นแบบข่มสมบูรณ์ที่ปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) บริเวณจุดจดจำที่เอ็นไซม์ตัดทำให้พืชแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกัน เทคนิคอาร์เอฟแอลพีเป็นเทคนิคแรกที่ได้รับความนิยมสูงในอดีต แต่เนื่องจากขั้นตอนมีความสลับซับซ้อนและเสียเวลามาก ทำให้ความนิยมค่อยๆลดลง ซึ่งปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆขึ้นมามีความสะดวกรวดเร็วและให้ผลดี จึงทำให้เทคนิคอาร์เอฟแอลพีไม่ได้รับความนิยมในเวลาต่อมา

**2.5.2 อาร์เอพีดี (Random Amplification Polymorphic DNA: RAPD)** เป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสขนาดสั้น 8-12 เบส อาร์เอพีดีพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยพีซีอาร์ พืชแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันดังนั้นเมื่อนำมาตรวจสอบ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสโดยสุ่ม หรือ “arbitrary primer” (ซึ่งหมายถึงส่วนรหัสเริ่มต้นของดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดสั้นประมาณ 10 เบส) หากอาร์เอพีดีไพรเมอร์นั้นมีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอของพืชที่นำมาตรวจสอบจะเกิดการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอต้นแบบขึ้นเนื่องจาก

ปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสโดยสุ่ม ดังนั้นไพรเมอร์เหล่านี้จึงสามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอของพืชโดยสุ่มได้หลายตำแหน่งเมื่อการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสมจะทำให้เกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอของพืชนั้นๆ ดังนั้นถ้าสายพันธุ์พืชตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบมีความแตกต่างของสารพันธุกรรมหรือเป็นคนละชนิดกัน ความสามารถในการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะแตกต่างกันทำให้ได้จำนวนและชิ้นของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันและสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการบ่งบอกชนิดของสายพันธุ์ (cultivar identification) ได้ (หนูเดือน, 2556)

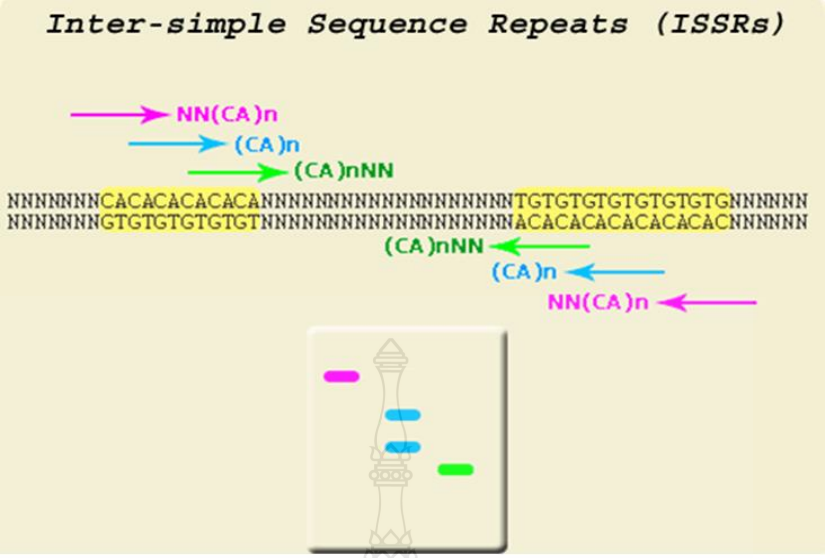
**2.5.3 เอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism: AFLP)** เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ความแตกต่างของจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ร่วมกับความแตกต่างของตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่มสามารถตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอ หรือค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลแบบหลายตำแหน่งในคราวเดียวกัน โดยอาศัยหลักการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด (มีตำแหน่งจดจำ 4 และ 6 เบส) เอนไซม์ที่นิยมใช้ คือ *Eco*RI และ *Mse*I จากนั้นเชื่อมต่ออะเดพเตอร์ (oligonucleotide sequence) ซึ่งเป็นโมเลกุลดีเอ็นเอสายคู่ที่รู้ลำดับเบสเข้ากับปลายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัด เพื่อทำหน้าที่เป็นตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ จากนั้นใช้ไพรเมอร์ที่สามารถจับกับอะเดพเตอร์ให้ครอบคลุมชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1 2 หรือ 3 สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ซึ่งได้ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอจำนวนมากที่มีขนาดแตกต่างกัน สามารถแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลโพลิอะคริลาไมด์ (poly-acrylamide gel electrophoresis) ที่ปรับสภาวะให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ ความผันแปรของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและไม่ปรากฏในพืชแต่ละพันธุ์หรือโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างจีโนไทป์ เกิดจากความแตกต่างของลำดับเบสที่ตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์และความแตกต่างของเบสที่ตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์

เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพีมีความจำเพาะและสม่ำเสมอในการทำซ้ำสูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดีที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากการทำครั้งหนึ่งอาจได้แถบดีเอ็นเอที่มีโพลิมอร์ฟิซึมจำนวนมากเมื่อเทียบกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น ซึ่งไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสในสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา นอกจากนั้นแถบดีเอ็นเอบนเจลค่อนข้างชัดเจน จึงนิยมนำเทคนิคนี้มาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การสร้างแผนที่พันธุกรรม การค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับยีนที่สนใจเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ (Vos *et al.*, 1995)

**2.5.4 เอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat: SSR) หรือเรียก ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite)** จัดเป็นไพรเมอร์เจาะจง (specific primer) ที่ถูกสร้าง หรือออกแบบขึ้นให้จับกับดีเอ็นเอส่วนที่ขนาบข้างกับบริเวณไมโครแซทเทลไลท์ ฉะนั้นการออกแบบไพรเมอร์ชนิดนี้ต้องทราบลำดับเบสของบริเวณขนาบข้างส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ก่อนจึงเป็นข้อจำกัดของเทคนิคนี้

ประการหนึ่ง จากผลการศึกษาพืชต่างสายพันธุ์กันพบว่า มีจำนวนซ้ำหรือ repeat unit ไม่เท่ากันจึงสามารถตรวจความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอได้จากผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ไมโครแซทเทลไลท์หรือเอสเอสอาร์ อาจใช้เป็น multilocus probe เพราะพบกระจายทั่วจีโนมแต่ถ้าออกแบบไพรเมอร์เจาะจง (specific primer) โดยใช้ลำดับของส่วนที่ขนาบข้างของเอสเอสอาร์ เทคนิคนี้มีชื่อเรียกต่างๆ กันได้แก่ Sequence Tagged Microsatellite (STM) หรือ Simple Sequence Length Polymorplism (SSLP) หรือ Sequence Tagged SSR (Morgante and Olivieri, 1993)

**2.5.5 ไอเอสเอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat: ISSR)** เป็นเทคนิคโมเลกุลเครื่องหมายชนิดหนึ่งที่ใช้วิธีพีซีอาร์ ในการตรวจสอบไพรเมอร์ของไอเอสเอสอาร์จะมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำเป็นชุด ซึ่งจะไปจับกับตำแหน่งเบสคู่สมที่มีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำเช่นกันบนจีโนมของสิ่งมีชีวิต (ภาพที่ 2.1) ที่เรียกว่า Simple Sequnce Repeat (SSR) หรือไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งของ SSR กระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมของสิ่งมีชีวิต ทำให้ไพรเมอร์จับกับตำแหน่งต่างๆบนจีโนม ชิ้นส่วนดีเด็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นมาเป็นบริเวณระหว่าง SSR สองตำแหน่งเทคนิคนี้จึงชื่อ Inter Simple Sequence Repeat ซึ่งโพลีมอร์ฟิซึมหรือความแตกต่างเกิดขึ้นจากความแปรปรวน (variation) ของลำดับเบสภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอเช่น insertion หรือ deletion และการ mutation ของบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าจับทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเทคนิคนี้คล้ายกลับเทคนิคอาร์เอพีดีในส่วนที่ว่าเป็นการสุ่มตำแหน่งต่างๆของจีโนม แต่ไอเอสเอสอาร์มีความจำเพาะสูงกว่าเนื่องจากลำดับเบสของไพรเมอร์มีความจำเพาะมากกว่าไม่ได้มีลำดับเบสสุ่มเหมือนกับอาร์เอพีดีจึงเป็นเทคนิคที่ทำซ้ำได้สูง (Tsumura *et al.*, 1996)




**ที่มา:** ดัดแปลงจาก National Center for Biotechnology Information (2014)

**ภาพที่ 2.1** แผนผังแสดงการทำปฏิกิริยาของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ แสดงการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเอสเอสอาร์ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่างกัน โดยการใช้นิวคลีโอไทด์ตัวที่อยู่ใกล้เอสเอสอาร์เป็นไพรเมอร์ด้วย 1-2 เบส ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้เป็นความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างเอสเอสอาร์แต่ละชุดจึงเรียกเทคนิคนี้ว่าไอเอสเอสอาร์

**ข้อดีของเทคนิคไอเอสเอสอาร์**

(1) ใช้ระยะเวลาทำที่สั้นและมีราคาถูกจึงนำไปใช้เพื่อการศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเออย่างแพร่หลาย

(2) ไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสของพืชนั้นๆมาก่อน

(3) โมเลกุลเครื่องหมายชนิดไอเอสเอสอาร์มีขนาดที่ยาวกว่าและใช้อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาในช่วงที่ไพรเมอร์ของไอเอสเอสอาร์จับคู่กับเบสเป้าหมาย (annealing temperature) สูงกว่าที่ใช้กับอาร์เอพีดี จึงทำให้ผลของปฏิกิริยามีความเที่ยงตรงมากกว่าอาร์เอพีดี (Fang and Roose, 1997)

จากการทดลองของ Bornet and Branchard (2001) พบว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์มีผลการทดลองที่น่าเชื่อถือซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคนี้ยังคงเหมือนเดิมแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบหรือความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่อปฏิกิริยา ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไพรเมอร์กลับเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอื่นเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ดังนั้นเทคนิคไอเอสเอสอาร์จึงเป็นเทคนิคที่ง่ายแก่การประยุกต์ใช้และมีความเสถียรสูง

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคไอเอสเอสอาร์ มาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชต่างๆอย่างได้ผล เช่น หัวหอม (Gang *et al.*, 1994) ถั่วลิสง (Raina *et al.*, 2001) ชา (Lai *et al.*, 2001) มันฝรั่ง (Prevost and Wilkinson, 1999; Bornet *et al.*, 2002) มะเขือเทศ (Kochieva *et al.*, 2002) ต้นสน (Adams *et al*, 2003) กาแฟ (Ruas*et al.*, 2003) ข้าว (Prasad *et al.*, 2005) และมะกอกน้ำมัน (Gomes *et al.*, 2009) เป็นต้น

จากรายงานวิจัยพบว่าได้มีการนำเทคนิคไอเอสเอสอาร์มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในสกุลหรือชนิดเดียวกันอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคอาร์เอพีดี และ ไอเอสเอสอาร์ ในการจำแนกความแตกต่างของข้าวฟ่าง (Yang *et al.*, 1996) และข้าวสาลี (Nagaoka and Ogihara, 1997) พบว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์บอกความแตกต่างและมีความสามารถในการทำซ้ำดีกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี

Ge and Sun (1999) ได้ศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมของ *Aegiceras corniculatum* โดยใช้เทคนิค allozyme และ ไอเอสเอสอาร์ พบว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์ เป็นเทคนิคมีโพลีมอร์ฟิซึมสูง และเป็น fingerprinting method ที่ดีสำหรับศึกษาสายพันธุ์ของพืช

Ruas *et al.* (2003) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Coffea* และลูกผสมข้ามชนิด (interspecific hybrid) ของพืชสกุล *Coffea* พบว่าพืชสกุล *Coffea* มีลำดับเบสที่มีซ้ำแบบ GA จำนวนมาก และยังสามารถใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์เพื่อระบุพืชที่เป็นพ่อแม่ของพืชลูกผสมได้

Basilio *et al.* (2009) ได้ศึกษาเกี่ยวกับ highland papaya (*Vasconcellea pubescens*) ซึ่งเป็นมะละกอภูเขาและเป็นพืชในสกุล *Carica* เช่นเดียวกับมะละกอ โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ มาใช้เพื่อการศึกษาความแตกต่างและองค์ประกอบ ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Vasconcellea pubescens* จาก 333 ตัวอย่าง ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 114 แถบ พบแถบที่บอกความแตกต่าง 63 แถบ ผลการศึกษาที่ได้ในระดับชนิดของ *Vasconcellea pubescens* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ สามารถแบ่งกลุ่มที่ทำศึกษาออกเป็น 8 กลุ่มที่แตกต่างกันทางพันธุกรรมโดยแยกเป็น 5 กลุ่มอยู่ในเขตภาคเหนือและอีก 3 กลุ่มอยู่ในเขตภาคใต้ของประเทศชิลี

Costa *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชในวงศ์ Caricaceae ได้แก่ *Vasconcellea monoica*, *Jacaratia spinosa*, *vasconcellea goudotiana* และ *Carica papaya* โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างสกุลของพืชวงศ์ Caricaceae ได้อย่างชัดเจน โดยสกุล *Jacaratia* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสกุล *Vasconcellea* มากกว่า สกุล *Carica*

รัฐพร (2547) ได้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) จำนวน 37 ตัวอย่างที่ได้จากแหล่งต่างๆในประเทศไทย วิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่ามี 3 ไพรเมอร์ ที่สามารถใช้สร้างเครื่องหมายโมเลกุลแบบอาร์เอพีดีแต่ไม่ให้รูปแบบคงเดิมเมื่อทำซ้ำ แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์พบว่ามี 3 ไพรเมอร์ ที่สามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบไอเอสเอสอาร์ที่ให้รูปแบบคงเดิมเมื่อทำซ้ำ และเมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าต้นเปล้าน้อยประกอบด้วยกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งกำเนิดต้นเปล้าน้อย

ปรียา และคณะ (2549) ทำการวิเคราะห์พันธุกรรมของแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ สามารถจัดกลุ่มแก่นตะวันที่ให้ผลผลิตหัวสูงออกจากสายพันธุ์อื่นและสามารถแยกแก่นตะวันที่เป็นพันธุ์ป่าออกจากแก่นตะวันที่เป็นพันธุ์ปลูกได้

ศรีสุข และคณะ (2553) ได้ศึกษาการคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อตรวจหาลักษณะความต้านทานที่ถ่ายทอดจากพันธุ์ต้านทานเชื้อรา *Phytophthora capcisi* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริก โดยใช้สัดส่วนพริกลูกผสมที่ให้ผลต้านทานและอ่อนแอเป็นเครื่องบ่งชี้ ผลการศึกษาพบว่า microsatellite primers UBC836 สามารถใช้ตรวจสอบลักษณะต้านทานและอ่อนแอของพริกลูกผสมได้โดย microsatellite primers สามารถใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายได้แต่ยังไม่แม่นยำจะต้องเลือกแถบดีเอ็นเอที่แสดงความจำเพาะกับลักษณะต้านทานโรคไปหาลำดับเบสและออกแบบดีเอ็นเอตัวตรวจจึงจะให้ผลการตรวจสอบและติดตามลักษณะความต้านทานโรคลำต้นไหม้ที่แม่นยำได้

ศุจิรัตน์ และคณะ (2554) ได้จำแนกพันธุ์มันสำปะหลังโดยใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR พบว่าเป็นวิธีการที่ได้แถบดีเอ็นเอชัดเจนสามารถคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้และสามารถจำแนกพันธุ์ได้อย่างแม่นยำสอดคล้องกับประวัติของพันธุ์และแหล่งกระจายพันธุ์นั้นๆ และสามารถนำฐานข้อมูลนี้ไปใช้เป็นแบบมาตรฐานสำหรับการเปรียบเทียบหรือตรวจพิสูจน์ตัวอย่างพันธุ์ที่สงสัยได้

**2.5.6 ค่าที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม**

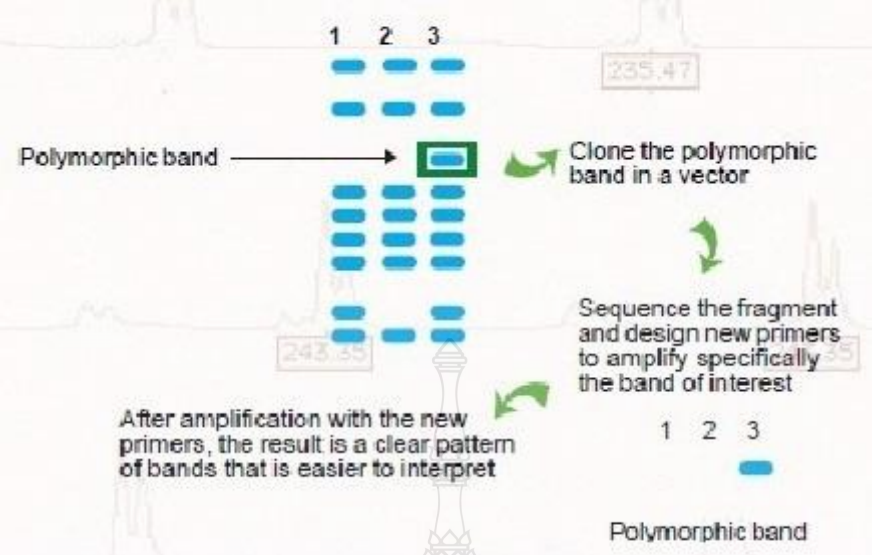
Polymorphic Information Content (PIC) ของ marker locus เป็นการวัดระดับ polymorphism และบ่งชี้ว่า marker locus ที่ใช้วิเคราะห์ linkage นั้นมีความน่าเชื่อถือเพียงใด โดยค่า PIC ถูกนำมาใช้เพื่อจำแนกและกำหนด marker locus ที่เหมาะสม ถ้า allele ของ marker locus เป็น co-dominant ค่า PIC คือสัดส่วนรุ่นลูก (informative offspring) ที่กระจายตัวไปตามฟีโนไทป์ซึ่งมี index locus เป็นตำแหน่งที่ใช้สำหรับตรวจสอบ linkage ด้วย marker allele โดย index locus จะมี wild-type allele และ dominant (mutant) allele ทั้งนี้ marker locus จะมี polymorphic สำหรับ dominant allele ทางพันธุศาสตร์หรือทางกายภาพ (ลำดับนิวคลีโอไทด์) ข้อมูลรุ่นลูกเหล่านั้นจะใช้

คำนวณค่า PIC ได้ต่อเมื่อ index locus ของพ่อแม่ฝ่ายหนึ่งมี marker ในสภาพ homozygous และอีกฝ่ายเป็น heterozygous ในกรณีที่พ่อแม่เป็น heterozygous ทั้งคู่ข้อมูลจากรุ่นลูกเพียงครึ่งเดียวเท่านั้นที่จะใช้ได้ กรณีอื่นๆ จะไม่สามารถนำข้อมูลมาใช้ได้ (Redei, 2008) โดยค่า PIC มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 ค่า PIC ที่ 0 หมายถึงเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นมีเพียง 1 อัลลีล ค่า PIC ที่ 1 หมายถึงเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นมีจำนวนอัลลีลไม่จำกัด ซึ่งเป็นวิธีที่ดีในการประมาณความหลายหลายของเครื่องหมายดีเอนเอ (Zajc *et al*., 1997)

ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index; S.I.) เป็นการวัดเชิงปริมาณสำหรับเปรียบเทียบระหว่างสองประชากร โดยค่าดัชนีความเหมือนคำนวณมาจากแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอแต่ละคู่ซึ่งสามารถบอกปริมาณของความแปรปรวนระหว่างคู่ตัวอย่างได้โดยตรง (Lynch, 1990)

ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) วัดความเหมือนระหว่างสองตัวอย่าง โดยพิจารณาจากข้อมูลความแปรปรวน (variable) ที่มีอยู่ หรือข้อมูลของค่าที่เก็บได้จากคุณสมบัติทางคุณภาพและปริมาณของลักษณะที่มีอยู่ หรือทั้งสองอย่าง ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เกี่ยวข้องกับค่าความแปรปรวน v และยอมสำหรับข้อมูลที่อาจขาดหายไป (Gowe, 1971)

**2.5.7 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)** เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะที่พัฒนามาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคแบบสุ่มหลายตำแหน่ง เช่น อาร์เอพีดี หรือเอเอฟแอลพี ซึ่งการทำอาร์เอพีดีมีข้อด้อยในเรื่องของการคงตัวของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นส่วนเอเอฟแอลพีมีข้อด้อยที่มีหลายขั้นตอนและวิธีการทำซับซ้อน ดังนั้นเมื่อพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายได้ นิยมเปลี่ยนแถบดีเอ็นเอนั้นให้สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีพีซีอาร์แบบจำเพาะ โดยการตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวนำมาหาลำดับเบสจากนั้นออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่จากลำดับเบสที่ได้ซึ่งต้องตัดส่วนปลายที่เป็นส่วนจำเพาะของไพรเมอร์เดิมออกก่อน ทำให้ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะและสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียงตำแหน่งเดียวซึ่งทำให้แม่นยำและรวดเร็วขึ้น (สุรินทร์, 2552)




**ที่มา:** ดัดแปลงจาก National Center for Biotechnology Information (2014)

**ภาพที่ 2.2** แผนผังแสดงขั้นตอนการทำงานของเครื่องหมาย SCAR

**การประยุกต์ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ ร่วมกับเทคนิค SCAR เพื่อใช้จำแนกพืช**

Hiromi *et al.* (1996) ได้ศึกษา closely linked ของ nuclear restore gene (*RF-1*) ของข้าวโดยศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง near-isogenic ที่มี *RF-1* gene คือ MTC-10R และไม่มี *RF-1* gene คือ MTC-10A โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 76 ไพร์เมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์เดียวคือ $(GA)_8YC$ ที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง MTC-10R และ MTC-10A ได้แถบดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่าง 2 แถบ จากนั้นนำไปโคลนเข้าพาหะ (vector) แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อสร้างไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบความแตกต่างระหว่างยีน 2 ตัวนี้

Urasaki *et al.* (2002) ได้พัฒนาเครื่องหมาย SCAR จากเครื่องหมายอาร์เอพีดี เพื่อใช้จำแนกเพศมะละกอ โดยสามารถออกแบบ SCAR primer ที่มีความจำเพาะกับมะละกอเพศผู้ และกะเทยได้

Ye *et al.* (2006) ได้ศึกษาเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์จำนวน 52 ไพรเมอร์ เพื่อใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของ *Sinocalycanthus chinensis*, *Chimonanthus* spp. และ *Calycanthus floridus* ที่มีความเกี่ยวข้องใกล้ชิดกัน พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาด 748 คู่เบสที่เกิดจากไพรเมอร์ UBC811 ซึ่งพบใน *S. chinensis* และเครื่องหมาย SCAR ที่ได้จากเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สามารถจำแนก *S. Chinensis* ออกจาก *Chimonanthus*spp. และ *C. floridus* ได้

Niroshini *et al*. (2008) ได้ศึกษาเครื่องหมาย อาร์เอพีดีจำนวน 100 ไพรเมอร์ เพื่อนำไปพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับจำแนกเพศมะละกอ โดยสามารถออกแบบ SCAR primer ที่นำไปใช้ในการแยกมะละกอเพศเมียและกะเทยออกจากมะละกอเพศผู้

Rita *et al*. (2010) จำแนก Fine-Leaved Fescue จำนวน 5 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ซึ่งพบว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 600 และ 950 คู่เบสจากชิ้นส่วนดีเอ็นทั้งหมด ที่มีความจำเพาะกับพันธุ์ *Festuca psammophila* และพบว่าเครื่องหมาย SCAR ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอนเอทั้ง 2 ชิ้น ที่ได้จากเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ สามารถจำแนก *F.psammophila* ออกจาก Fine-Leaved Fescue พันธุ์อื่นๆที่พบในประเทศสลิทัวเนียได้

Lee *et al*. (2011) สามารถระบุโสมเกาหลี (*Panax ginseng* C. A. Meyer) พันธุ์ Sunwon ได้โดยใช้ไพรเมอร์ SCAR PgI821C650 ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ UBC821

จากการศึกษารายงานการวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์และ SCAR สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์พืช และสามารถใช้พัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับจำแนกพันธุ์ของพืชได้หลายชนิด ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์เพื่อนำความสัมพันธ์ที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่แม่นยำ และมีความจำเพาะในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของมะละกอขอนแก่น 80 เพื่อประโยชน์ในตรวจสอบสายพันธุ์ และการคัดเลือกต้นพันธุ์ให้ถูกต้องตรงตามพันธุ์

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 อุปกรณ์

### 3.1.1 พืชทดลองและวัสดุปลูก

(1) เมล็ดพันธุ์มะละกอจาก ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์ ดังนี้ Florida, HO, HOSno.1, HOSno.2, HOSno.3, KDDNs, KDLS1, KDLS2, KD-Si, Khon Kaen 80, KN(SR), KNLS1, LN, MA, MI, Maradol, MIR, SEW58, SK001, SK002, SK003, SK004, Taiwan, Khaek Dum, Khaek Nuan, Khrang, Tha Phra 3, Number 12, Pak Chong, Hybrid Australia, Si Tong และ Hawaii

(2) วัสดุปลูกที่ใช้ในการปลูกพืชดังนี้

- ปุ๋ยสูตร 16-16-16 และ 21-0-0
- ป้ายแสดงพันธุ์
- ถุงดำขนาด 4×6 นิ้ว
- ดินผสมสำหรับปลูกต้นไม้

### 3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาระดับดีเอ็นเอ

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์ เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เครื่องบันทึกภาพเจล (Gel documentation) ชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส เครื่องพีซีอาร์ (thermal cycler) หม้อนึ่งความดันไอ ไมโครเวฟ ไมโครปิเปต Tip และ Tube ขนาดต่างๆ เครื่องแก้ว กระบอกตวง และขวดขนาดต่างๆ

### 3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

(1) ไนโตรเจนเหลว $\beta$-Mercaptoethanol Chloroform Isoamyl alcohol Isopropanol 70%ethanol และ RNase A

(2) 2X CTAB ประกอบด้วย 3%CTAB 100mM Tris-HCl 20mM EDTA และ 1.4M NaCl

(3) TE buffer ประกอบด้วย 10mM Tris pH 8.0 และ 0.1mM EDTA

**3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์**

(1) 25mM $MgCl_2$ 2mM dNTP

(2) 10x PCR buffer ประกอบด้วย 200mM Tris-HCL pH 8.4 และ 500mM KCl

(3) *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA)

**3.1.5 สารเคมีสำหรับอิเล็กโทรโฟรีซีสบนเจลอะกาโรส**

(1) 0.5 mg/ml Ethidium Bromide Agarose gel

(2) Loading dye ประกอบด้วย 0.15% bromphenol blue ใน 50%glycerol

(3) 1X TBE buffer ประกอบด้วย Tris base 10.8 กรัม Boric acid 5.5 กรัม และ 500mM EDTA pH 8.0 4 มิลลิลิตร

(4) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder และ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, USA)

**3.1.6 สารเคมีที่ใช้ในการโคลน**

(1) อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani) LB agar (Luria-Bertani agar)

(2) ยาปฏิชีวนะ ampicillin

(3) ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA)

(4) pJET1.2/blunt Cloning Vector (Fermentas, USA)

(5) T4 DNA ligase บริษัท (Fermentas, USA)

(6) HIT Competent Cells-DH5alpha High 108 (Bioamerica, USA)

(7) ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GenJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA)

## 3.2 วิธีการทดลอง

**การทดลองที่ 1 จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeats )**

**1.1 การเตรียมพืชทดลอง**

นำเมล็ดมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์ ลงแช่น้ำ 1 คืน จากนั้นเพาะเมล็ดในถุงที่ใส่วัสดุปลูกขนาด 4×6 นิ้ว และติดป้ายชื่อระบุพันธุ์มะละกอ หลังจากต้นอ่อนงอก 15 วันใส่ปุ๋ยสูตร 21-0-0 หลังจากนั้น 15 วัน ทำการใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ทุก 15 วัน เมื่อครบ 60 วัน ทำการเก็บตัวอย่างใบอ่อนของต้นมะละกอ (ใบที่ 2-3 จากยอด) จำนวนต้นละ 1-2 ใบ เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

**1.2 การสกัดดีเอ็นเอ**

(1) บดตัวอย่างใบมะละกอน้ำหนักประมาณ 0.5 กรัมให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวจากนั้นนำตัวอย่างใบมะละกอที่บดได้ละเอียดแล้วมาเติม 2x CTAB solution (ดัดแปลงจาก Kang *et al.*, 1998) ที่อุ่นให้ได้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสจำนวน 700 ไมโครลิตร กับ $\beta$-Mercaptoethanol 7 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ ประมาณ 5 ครั้งก่อนที่จะนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (คว่ำหลอดกลับไปกลับมาทุก 10 นาที) นาน 30 นาทีถึง 1ชั่วโมง จากนั้นเติมสาร chloroform:isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 จำนวน 700 ไมโครลิตรผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดกลับไปกลับมาประมาณ10 นาทีปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาทีหลังจากนั้นดูดของเหลวส่วนใสชั้นบน ใส่ในหลอดพลาสติกจำนวน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดพลาสติกที่วางบนน้ำแข็ง นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 3M NaOAC จำนวน 50 ไมโครลิตร Isopropanol จำนวน 300 ไมโครลิตร ที่แช่เย็น คว่ำหลอดกลับไปกลับมาเบาๆประมาณ 10 ครั้งก่อนที่จะนำไปไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งล้างดีเอ็นเอด้วย 70%ethanol จำนวน 700 ไมโครลิตรเขย่าเบาๆประมาณ 1 นาทีปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที (ทำซ้ำ 2 รอบ) ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งในอุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาทีละลายตะกอนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย TE buffer (ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8 และ 1 mM EDTA pH 8) จำนวน 100 ไมโครลิตร และ เอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ (RNase A) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงเพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

(2) ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer: PERKIN ELMER MBA 2000) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบมะละกอมาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง โดยทำการวัดที่ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) ซึ่งจะคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้เป็นนาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จะดูจากสัดส่วนการดูดซับแสงของตัวอย่างที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) และ 280 นาโนเมตร (A280) ถ้าค่าที่อ่านได้อยู่ระหว่าง 1.8-1.9 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีคุณภาพเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ถ้าค่าอัตราส่วน

มากกว่า 1.9 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ปนเปื้อนด้วยอาร์เอ็นเอ แต่ถ้าค่าที่ได้มีอัตราส่วนน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าสารละลายปนเปื้อนจากโปรตีนฟีนอลหรือสารเคมีอื่นๆ (Surzycky, 2000)

**1.3 การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์**

(1) การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 60 ไพรเมอร์ ใช้วิธีการรวมดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์เข้าด้วยกันแล้วนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์พีซีอาร์ โดยทำการเตรียมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้ ในปริมาตร 25 ไมโครลิตรประกอบด้วย 1xPCR buffer 0.25mM dNTP 2.5mM $MgCl_2$ 1µM primer 5unit/µl *Taq* DNA polymerase และดีเอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัมโดยให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตรโดยแต่ละไพรเมอร์เตรียมตัวอย่างๆละ 2 ชุด

(2) ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อทดสอบอุณหภูมิในช่วง annealing ที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์แต่ละไพรเมอร์ประกอบด้วยโปรแกรมพีซีอาร์ดังนี้

**โปรแกรมที่ 1** ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 3 นาทีขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 30 วินาทีอุณหภูมิ50 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 นาทีโดยทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 7 นาที

**โปรแกรมที่ 2** ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 3 นาทีขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 30 วินาทีอุณหภูมิ55 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 นาทีโดยทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 7 นาที

(3) หลังจากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ใน TBE buffer (tris-borate-edta) ความเข้มข้น 1 เท่าแล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่องบันทึกภาพเจลเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder และ 100bp DNA ladder plus (Fermentas) คัดเลือกไพรเมอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสม ที่สามารถเพิ่มปริมาณและให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างชัดเจน

**1.4 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของมะละกอโดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์**

หลังจากที่ได้ตรวจสอบและคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอรวมของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ได้แล้ว จึงนำไพรเมอร์เหล่านั้นมาใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์พีซีอาร์ ในการเตรียมสารละลายเพื่อ

สังเคราะห์ดีเอ็นเอและการตั้งโปรแกรมเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่องพีซีอาร์จะทำเช่นเดียวกับในขั้นตอน การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ หลังจากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟลิซีในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่องเครื่องบันทึกภาพเจล เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder และ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) จากนั้นจึงนำแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้

**1.5 การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล**

(1) ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะละกอแต่ละสายพันธุ์ ได้ทำการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาไอเอสเอสอาร์พีซีอาร์โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 0

(2) คำนวณหาค่า PIC ตามวิธีของ Botstein et al. (1980) ซึ่งมีสมการดังนี้

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n}(P_{ij})^2$$

เมื่อ $P_{ij}$ คือ ความถี่ที่แถบดีเอ็นเอปรากฏจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แต่ละชนิด

(3) คำนวณหาค่าดัชนีความเหมือนจากสูตร $S.I. = 2n_{ab}/(n_a+n_b)$ (Lynch, 1991) เมื่อ $n_a$ และ $n_b$ แทนจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในตัวอย่าง a และ b ตามลำดับ และ $n_{ab}$ คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทั้ง 2 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) ก่อนนำมาจัดกลุ่มทางพันธุกรรม เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.1 (Rohlf, 1998)

**การทดลองที่ 2 ศึกษาพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอลูกผสมพันธุ์ ขอนแก่น 80**

**2.1 การคัดเลือกแถบดีเอ็นต่าง**

จากข้อ 1.4 ทำการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอของขอนแก่น 80 ที่มีแถบแตกต่างจากพันธุ์อื่นๆที่นำมาทดลอง

**2.2 การสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส**

ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการในเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ใส่ลงใน tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรสโดยใช้ชุดสกัด QIAquick Gel Extraction Kit มีวิธีการดังนี้

(1) โดยเติมสารละลาย QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายอย่างสมบูรณ์

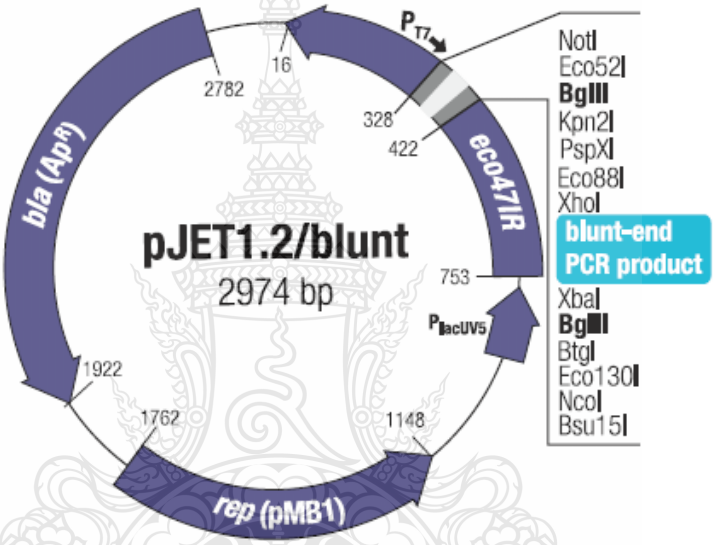
(2) เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจัดชุด column โดยนำ QIAquick spin column วางบน collection tube ดูดสารละลายผสมใส่ใน ชุด column โดยดูดสารละลายปริมาตรไม่เกิน 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งน้ำใสในหลอด collection tube

(3) ล้าง QIAquick spin column ด้วยสารละลาย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้าง QIAquick spin column อีกครั้งด้วยสารละลาย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

(4) จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย EB buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบขนาดและปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ใน 2 เปอร์เซ็นต์เจลอะกาโรส

**2.3 การโคลน (Clone) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ**

ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับ pJET1.2/blunt Cloning Vector (ภาพที่ 3.1)โดยการเตรียม ligation mixture ปริมาตร 20 ปฏิกิริยาประกอบด้วย 2X reactionbuffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตรชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว 3 ไมโครลิตร เติมน้ำสะอาด 4 ไมโครลิตร DNA blunting enzyme 1 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีแช่น้ำแข็ง 1 นาทีเติม pJET1.2/blunt Cloning Vector 1 ไมโครลิตร T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง




**ที่มา:** Thermo Scientific (2015) Product Information Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit

**ภาพที่ 3.1** แผนที่ของ pJET1.2/blunt Cloning Vector

**2.4 การถ่ายเวคเตอร์เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน**

นำเวคเตอร์ที่เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาถ่ายเข้าสู่ competent cell คือ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α (HIT Competent Cells-DH5alpha High 108) โดยผสม ligation mixture ปริมาตร 5 ไมโครลิตรกับ competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตรแล้วแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45วินาทีและแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 20 นาที เติมอาหาร LB broth 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีประมาณ 1 ชั่วโมงดูดแบ่งใส่ plate ที่มีอาหาร LB agar ผสม ampicillin (100 µg/ml) ประมาณ plate ละ 100 ไมโครลิตร spread บนผิวหน้าอาหารแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน

**2.5 ตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ**

สุ่มเลือกโคโลนีแบคทีเรียตัวอย่างละ 10 โคโลนี มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยการเตรียมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้ ในปริมาตร 10 ไมโครลิตรประกอบด้วย 1xPCR buffer 0.25mM dNTP 2.5mM $MgCl_2$ 1μM primer 5unit/μl *Taq* DNA polymerase โดยให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตรนำมาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้โปรแกรมพีซีอาร์ตามไพรเมอร์ที่ได้ทำการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่นำมาศึกษา จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้เทคนิค gel electrophoresis ใน 2 เปอร์เซ็นต์เจลอะกาโรส

**2.6 การเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดพลาสมิด**

เลือกโคโลนีที่มีชิ้นยีนเป้าหมายมา 2 โคโลนี นำมาเลี้ยงในอาหาร LB เหลว 5 มิลลิลิตรที่มี Ampicillin (100 μg/ml) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

**2.7 การแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสำเร็จ GenJET™ Plasmid mini prep kit**

(1) นำ cell culture มาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อตกตะกอนเซลล์เทอาหารออกให้หมดเติม Resuspensionsolution+RNase A ที่ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 250 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยการ vortex จากนั้นเติม Lysis solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตรกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้งแล้วเติม Neutralization solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตรกลับหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายของเหลวลง column นำไปปั่นตกตะกอน เสร็จแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาทีเทของเหลวทิ้งเติม wash solution (ที่เติมethanol 95% แล้ว) 500 ไมโครลิตรปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาทีเทของเหลวทิ้ง ปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าอีกครั้งนาน 1 นาทีเติม wash solution (ที่เติม ethanol 95% แล้ว) 500 ไมโครลิตรปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาทีเทของเหลวทิ้ง จากนั้นนำหลอดเปล่าไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาทีย้าย column ลง tube 1.5 ขนาดมิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม Elution buffer 50 ไมโครลิตรตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาทีจากนั้นตรวจสอบคุณภาพและขนาดของพลาสมิดโดยใช้เทคนิค gel electrophoresis ใน 1 เปอร์เซนต์เจลอะกาโรส

(2) นำพลาสมิดที่ได้ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1$^{st}$BASE (Malaysia) ผ่านบริษัท Ward Medic, Ltd. ประเทศไทย

**2.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และออกแบบไพรเมอร์**

(1) เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้ว จากนั้นจึงนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80 ทางด้านปลาย 5′ และปลาย 3′ ความยาวด้านละ 25 เบส

(2) นำไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบมาทำพีซีอาร์กับดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์ เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบและหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดผลพีซีอาร์ที่จำเพาะต่อมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80

**2.9 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลจากไพรเมอร์ที่ออกแบบ**

นำไพรเมอร์ที่ออกแบบสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ไปทดสอบความจำเพาะต่อพันธุ์ของมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80 จากนั้นขยายผลการวิจัยโดยนำคู่ของไพรเมอร์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไปทดสอบกับตัวอย่างมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80 ที่เก็บเพิ่มมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่นจำนวน 60 ต้น โดยผ่านขั้นตอนพีซีอาร์ ตรวจสอบผลที่ได้จากการทำพีซีอาร์ทุกครั้งด้วยวิธี gel electrophoresis ใน 2 เปอร์เซนต์เจลอะกาโรส

## 3.3 สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย

**3.3.1 สถานที่ทำการวิจัย**

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

**3.3.2 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย**

เริ่มทำการวิจัย เดือนเมษายน 2555 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2557

# บทที่ 4

# ผลการทดลอง

## 4.1 การเตรียมต้นกล้ามะละกอ

เพาะเมล็ดมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์ในวัสดุปลูก หลังจากต้นอ่อนงอกเป็นเวลา 60 วันได้ต้นกล้ามะละกอที่จะนำใบมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (ภาพที่ 4.1) เพื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปใช้ศึกษาในการทดลองขั้นต่อไป

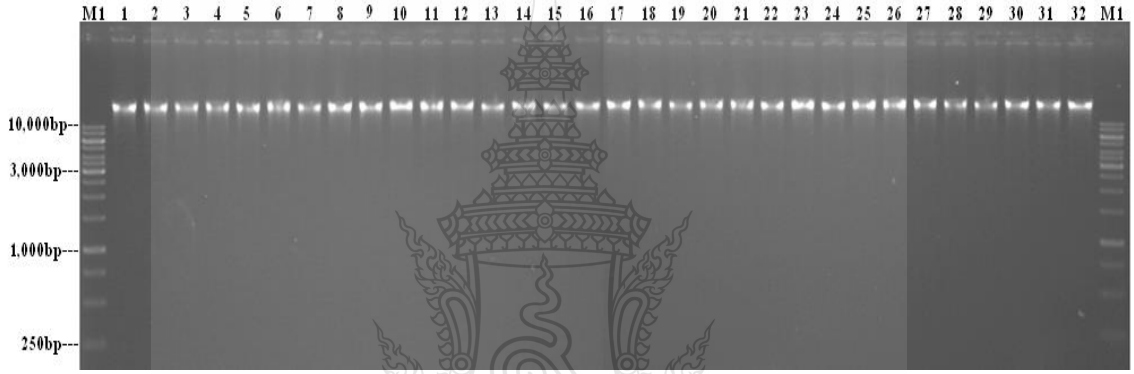
**ภาพที่ 4.1** ต้นกล้ามะละกออายุ 2 เดือนหลังจากต้นอ่อนงอกจากการเพาะเมล็ด

ก) ฟลอริดา ข) แขกดำ

ค) ขอนแก่น 80 ง) ท่าพระ 3

## 4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมะละกอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์ วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร ($A_{260}/A_{280}$) โดยค่า $A_{260}/A_{280}$ ที่วัดได้อยู่ระหว่าง 1.77-1.92 ดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้น 950-1,850 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 4.1) และจากการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น1.0 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 4.2) แสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่สะอาดไม่มีสิ่งเจือปน เจือจางดีเอ็นเอที่ได้ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป



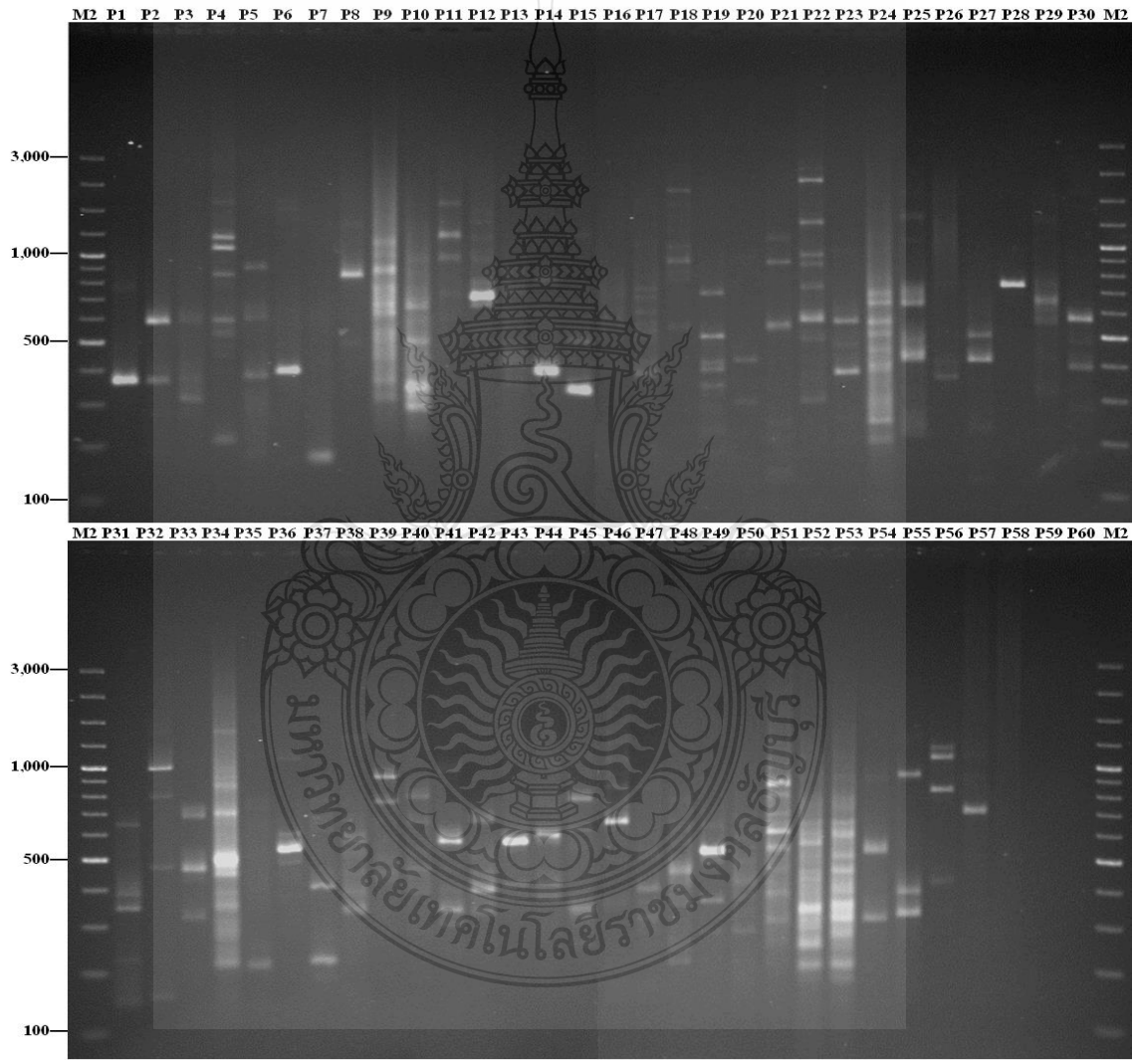

**ภาพที่ 4.2** ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ ช่อง M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Fermentas) ช่อง 1-32 คือ (1) Florida, (2) HO, (3) HOSno.1, (4) HOSno.2, (5) HOSno.3, (6) KDDNs, (7) KDLS1, (8) KDLS2, (9) KD-Si, (10) Khon Kaen 80, (11) KN(SR), (12) KNLS1, (13) LN, (14) MA, (15) MI, (16) Maradol, (17) MIR, (18) SEW58, (20) SK001, (21) SK002, (22) SK003, (23) SK004, (24) Taiwan, (25) Khaek Dum, (26) Khaek Nuan, (27) Khrang, Tha Phra 3, (28) Number 12, (29) Pak Chong, (30) Hybrid Australia, (31) Si Tong และ (32) Hawaii ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.1** ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A260 และ A280) และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์

| ลำดับที่ | พันธุ์/สายพันธุ์ | $A_{260}$ | $A_{280}$ | $A_{260}/A_{280}$ | ความเข้มข้น (ng/µl) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Florida | 0.102 | 0.065 | 1.86 | 1020 |
| 2 | HO | 0.101 | 0.054 | 1.87 | 1010 |
| 3 | HOS no.1 | 0.097 | 0.051 | 1.90 | 970 |
| 4 | HOS no.2 | 0.096 | 0.051 | 1.88 | 960 |
| 5 | HOS no.3 | 0.124 | 0.069 | 1.80 | 1240 |
| 6 | KDDNs | 0.115 | 0.06 | 1.92 | 1150 |
| 7 | KDLS1 | 0.111 | 0.061 | 1.82 | 1110 |
| 8 | KDLS2 | 0.146 | 0.078 | 1.88 | 1460 |
| 9 | KD-Si | 0.135 | 0.072 | 1.88 | 1350 |
| 10 | Khon Kaen 80 | 0.185 | 0.097 | 1.91 | 1850 |
| 11 | KN(SR) | 0.117 | 0.064 | 1.82 | 1170 |
| 12 | KNLS1 | 0.106 | 0.058 | 1.84 | 1060 |
| 13 | LN | 0.115 | 0.062 | 1.92 | 1150 |
| 14 | MA | 0.110 | 0.062 | 1.77 | 1100 |
| 15 | Maradal | 0.096 | 0.053 | 1.80 | 960 |
| 16 | MI | 0.127 | 0.072 | 1.77 | 1270 |
| 17 | MIR | 0.105 | 0.058 | 1.81 | 1050 |
| 18 | SEW58 | 0.132 | 0.073 | 1.80 | 1320 |
| 19 | SK001 | 0.101 | 0.057 | 1.78 | 1010 |
| 20 | SK002 | 0.121 | 0.069 | 1.81 | 1210 |
| 21 | SK003 | 0.105 | 0.058 | 1.80 | 1050 |
| 22 | SK004 | 0.098 | 0.051 | 1.92 | 980 |
| 23 | Taiwan | 0.133 | 0.072 | 1.86 | 1330 |
| 24 | Khaek Dum | 0.116 | 0.062 | 1.87 | 1160 |
| 25 | Khaek Nuan | 0.106 | 0.058 | 1.82 | 1060 |
| 26 | Khrang | 0.130 | 0.069 | 1.88 | 1300 |
| 27 | Tha Phra 3 | 0.117 | 0.065 | 1.80 | 1170 |
| 28 | Number 12 | 0.169 | 0.088 | 1.92 | 1690 |
| 29 | Pak Chong | 0.095 | 0.052 | 1.84 | 950 |
| 30 | Hybrid Australia | 0.124 | 0.065 | 1.91 | 1240 |
| 31 | Si Tong | 0.099 | 0.055 | 1.91 | 990 |
| 32 | Hawaii | 0.176 | 0.092 | 1.91 | 1760 |

## 4.3 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

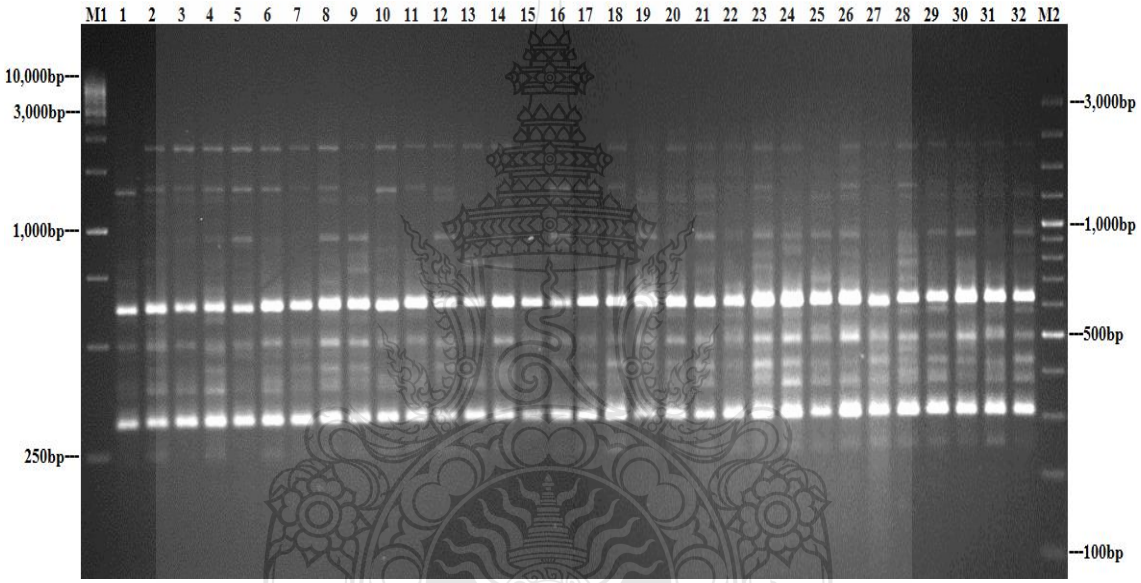
การคัดเลือกไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 60 ไพรเมอร์ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ พบว่ามีไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ จำนวน 57 ไพร์เมอร์หรือคิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีพีซีอาร์จึงได้ทำการคัดเลือกไพรเมอร์และอุณหภูมิที่ใช้ในช่วง annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป (ภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.2)




**ภาพที่ 4.3** รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 60 ไพรเมอร์ (ตาราง 4.2) จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอรวมของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยช่อง M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder plus (Fermentas)

**4.4 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์**

นำไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์ที่ผ่านการทดสอบจาก ข้อ 4.3 มาใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ พบการให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 612 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic bands) จำนวน 240 แถบ (39%) แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาดประมาณ 160-3,000 คู่เบส (ตารางที่ 4.2 ) โดยไพรเมอร์ P17 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 19 แถบ และไพรเมอร์ P54 ให้จำนวนแถบดีอีนเอน้อยที่สุด คือ 4 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ P21 มีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic bands) มากที่สุดคือ 13 แถบ มีขนาดประมาณ 310-1,900 คู่เบส (ภาพที่ 4.4)




**ภาพที่ 4.4** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ P21 ช่อง M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (Fermentas) ช่อง 1-32 คือ (1) Florida, (2) HO, (3) HOSno.1, (4) HOSno.2, (5) HOSno.3, (6) KDDNs, (7) KDLS1, (8) KDLS2, (9) KD-Si, (10) Khon Kaen 80, (11) KN(SR), (12) KNLS1, (13) LN, (14) MA, (15) MI, (16) Maradol, (17) MIR, (18) SEW58, (19) SK001, (20) SK002, (21) SK003, (22) SK004, (23) Taiwan, (24) Khaek Dum, (25) Khaek Nuan, (26) Khrang, (27) Tha Phra 3, (28) Number 12, (29) Pak Chong, (30) Hybrid Australia, (31) Si Tong และ (32) Hawaii ตามลำดับ M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentas)

**ตารางที่ 4.2** แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.2) โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์ ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

| Primer | Sequence | Ta (°C) | Number of DNA bands | | | PIC | Size of PCR band (bp) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | total | Monomorphic | polymorphic | | |
| P1 | $(AG)_8T$ | 50 | 12 | 6 | 6 | 0.378 | 250 - 1,450 |
| P2 | $(GA)_8T$ | 50 | 12 | 9 | 3 | 0.152 | 280 - 1,300 |
| P3 | $(CT)_8A$ | 55 | 9 | 4 | 5 | 0.368 | 400 - 1,600 |
| P4 | $(GT)_8YT$ | 55 | 6 | 2 | 4 | 0.500 | 800 - 2,200 |
| P5 | $(AG)_8YA$ | 50 | 6 | 6 | 0 | 0 | 310 - 1,180 |
| P6 | $(CAC)_3GC$ | 55 | 9 | 9 | 0 | 0 | 160 - 1,600 |
| P7 | $(CT)_8RC$ | 50 | 5 | 1 | 4 | 0.342 | 800 - 2,700 |
| P8 | $(AC)_8YA$ | 55 | 15 | 5 | 10 | 0.448 | 410 - 2,000 |
| P9 | $(ACC)_6$ | 50 | 9 | 7 | 2 | 0.042 | 350 - 2,500 |
| P10 | $DBD(AC)_7$ | 55 | 18 | 13 | 5 | 0.252 | 280 - 1,200 |
| P11 | $(CAG)_5$ | 55 | 6 | 6 | 0 | 0 | 480 - 1,200 |
| P12 | $(AGC)_5GR$ | 55 | 8 | 8 | 0 | 0 | 320 - 1,300 |
| P13 | $(AGC)_5AY$ | 55 | 14 | 9 | 5 | 0.258 | 780 - 2,700 |
| P14 | $CA(GA)_8$ | 50 | 11 | 7 | 4 | 0.268 | 420 - 1,250 |
| P15 | $(GAG)_3GC$ | 55 | 9 | 5 | 4 | 0.382 | 310 - 1,750 |
| P16 | $GC(GA)_8$ | 55 | 12 | 6 | 6 | 0.332 | 550 - 1,700 |
| P17 | $(AGC)_5Y$ | 55 | 19 | 19 | 0 | 0 | 370 - 300 |
| P18 | $GGGT(GGGGT)_2G$ | 55 | 9 | 7 | 2 | 0.264 | 570 - 2,300 |
| P19 | $(GA)_8YC$ | 55 | 9 | 7 | 2 | 0.198 | 160 - 720 |
| P20 | $(CAGA)_4$ | 50 | 10 | 5 | 5 | 0.272 | 420 - 2,600 |
| P21 | $(GACA)_4$ | 55 | 14 | 1 | 13 | 0.500 | 310 - 1,900 |
| P22 | $(CAA)_5$ | 50 | 12 | 9 | 3 | 0.182 | 310 - 2,200 |
| P23 | $(GA)_8A$ | 50 | 13 | 10 | 3 | 0.230 | 390 - 2,500 |
| P24 | $(GT)_8A$ | 50 | 11 | 4 | 7 | 0.312 | 480 - 1,800 |
| P25 | $(TC)_8A$ | 50 | 7 | 6 | 1 | 0.212 | 450 - 2,100 |
| P26 | $(TC)_8G$ | 50 | 6 | 4 | 2 | 0 | 360 - 3,000 |
| P27 | $(TG)_8C$ | 50 | 6 | 6 | 0 | 0.226 | 500 - 1,300 |
| P28 | $(GA)_8YT$ | 50 | 6 | 3 | 3 | 0.434 | 390 - 950 |
| P29 | $(CTC)_6$ | 55 | 13 | 9 | 4 | 0.280 | 580 - 2,600 |
| P30 | $(GA)_8C$ | 55 | 15 | 6 | 9 | 0.368 | 180 - 1,700 |

B = (C,G,T), D = (A,G,T), Y = (C,T), R = (A,G), V = (A,C,G), H = (A,C,T)

*Ta = annealing temperatures

**ตารางที่ 4.2 (ต่อ)** แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.2) โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพร์เมอร์ ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

| Primer | Sequence | TA* (°C) | Number of DNA bands | | | PIC | Size of PCR band (bp) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | total | Monomorphic | polymorphic | | |
| P31 | $(CT)_8T$ | 55 | 8 | 4 | 4 | 0.408 | 160 - 700 |
| P32 | $(CT)_8G$ | 50 | 8 | 8 | 0 | 0 | 160 - 1,400 |
| P33 | $(TC)_8C$ | 50 | 12 | 9 | 3 | 0.178 | 200 - 1,500 |
| P34 | $(AGC)_6$ | 55 | 8 | 7 | 1 | 0.008 | 210 - 900 |
| P35 | $(CCG)_6$ | 50 | 8 | 7 | 1 | 0 | 350 - 1,050 |
| P36 | $(CA)_6GT$ | 55 | 9 | 2 | 7 | 0.502 | 200 - 2,200 |
| P37 | $(GA)_6CC$ | 55 | 5 | 5 | 0 | 0 | 210 - 1,150 |
| P38 | $(CCCT)_4$ | 50 | 11 | 8 | 3 | 0.184 | 330 - 1,250 |
| P39 | $(AG)_8C$ | 55 | 10 | 2 | 8 | 0.412 | 250 - 1,500 |
| P40 | $(AG)_8G$ | 55 | 14 | 7 | 7 | 0.388 | 220 - 1,250 |
| P41 | $(CA)_8G$ | 55 | 11 | 5 | 5 | 0.454 | 210 - 1,550 |
| P42 | $(AC)_8G$ | 50 | 13 | 5 | 8 | 0.488 | 350 - 1,450 |
| P43 | $(CA)_8RT$ | 50 | 9 | 5 | 4 | 0.268 | 350 - 1,300 |
| P44 | $(CA)_8RG$ | 55 | 14 | 4 | 10 | 0.484 | 260 - 1,100 |
| P45 | $(GT)_8YC$ | 55 | 14 | 9 | 5 | 0.330 | 220 - 1,500 |
| P46 | $(AC)_8YG$ | 50 | 16 | 8 | 8 | 0.356 | 180 - 2,000 |
| P47 | $(ATG)_6$ | 50 | 12 | 9 | 3 | 0.242 | 180 - 1,500 |
| P48 | $(GAA)_6$ | 50 | 13 | 7 | 6 | 0.222 | 210 - 1,700 |
| P49 | $(GGAGA)_3$ | 50 | 13 | 8 | 5 | 0.322 | 210 - 2,000 |
| P50 | $DVD(TC)_7$ | 55 | 17 | 9 | 8 | 0.360 | 220 - 1,400 |
| P51 | $BDB(CA)_7$ | 55 | 10 | 8 | 2 | 0.280 | 280 - 900 |
| P52 | $VHV(GT)_7$ | 55 | 17 | 11 | 6 | 0.238 | 190 - 950 |
| P53 | $HVH(TG)_7$ | 50 | 15 | 7 | 8 | 0.390 | 190 - 1,400 |
| P54 | $A(CA)_8G$ | 50 | 4 | 2 | 2 | 0.496 | 320 - 950 |
| P55 | $(ATG)_6G$ | 55 | 17 | 11 | 6 | 0.366 | 160 - 1,300 |
| P56 | $CT(CCT)_3CAC$ | 50 | 9 | 6 | 3 | 0.164 | 420 - 1,800 |
| P57 | $(GT)_7AG$ | 55 | 7 | 2 | 5 | 0.500 | 170 - 1,250 |
| P58 | $(CA)_7TC$ | - | - | - | - | - | - |
| P59 | $(GATA)_4$ | - | - | - | - | - | - |
| P60 | $(AT)_8G$ | - | - | - | - | - | - |
| Total | | | 614 | 374 | 240 | | 160 - 3,000 |

B = (C,G,T), D = (A,G,T), Y = (C,T), R = (A,G), V = (A,C,G), H = (A,C,T)

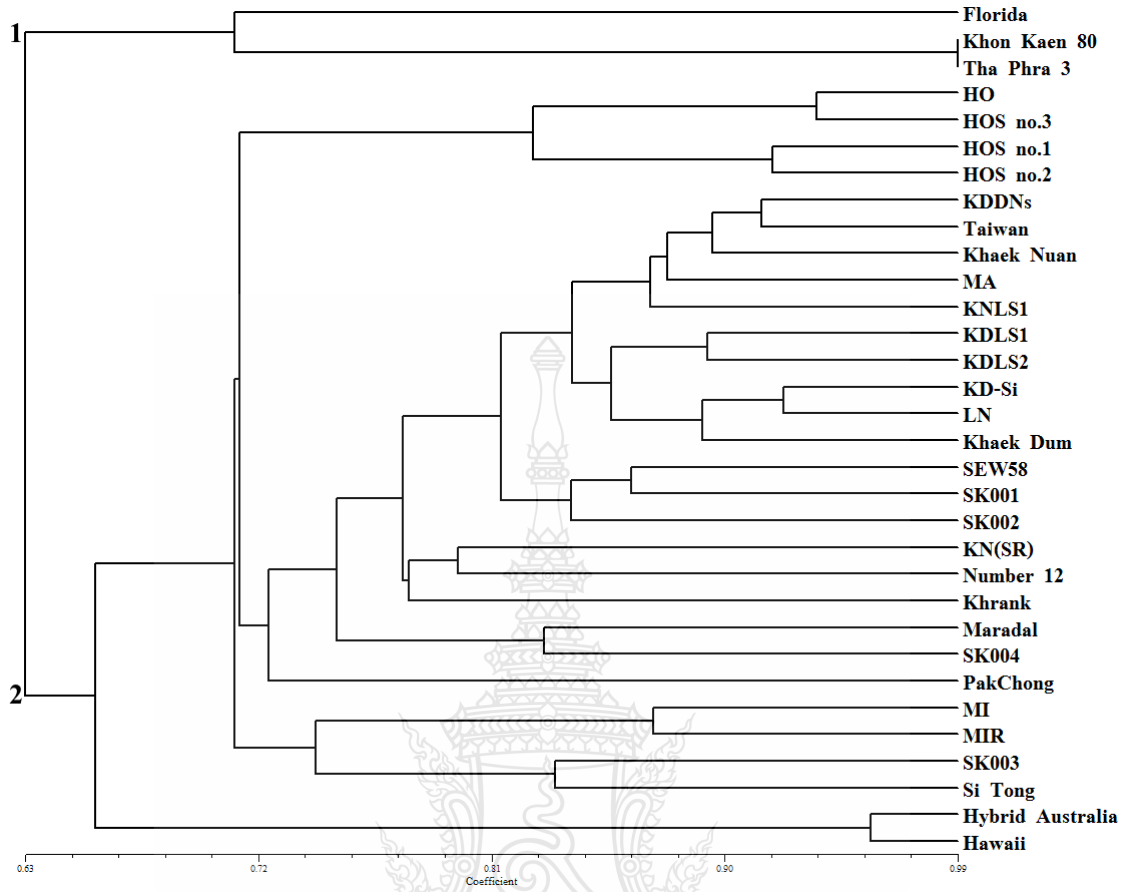
*TA = annealing temperatures

## 4.5 การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

จากการทดลองพบว่าค่า PIC จากแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ มีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 0.502 (ตารางที่ 4.2 ) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.263 จากการวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ Florida กับ HOSno.3 มีค่าต่ำที่สุดคือ 0.47 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ Tha Phra 3 กับสายพันธุ์ Khon Kaen 80 มีค่าสูงที่สุดคือ 0.99 (ภาพที่ 4.5) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ค่าดัชนีความเหมือน และสร้างแผนภาพ แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) ของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.1 สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ได้เป็น 2 กลุ่ม โดยแยกมะละกอพันธุ์ฟลอริดาและลูกผสมที่เกิดจากมะละกอพันธุ์แขกดำ ออกจากมะละกอสายพันธุ์อื่นโดยที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์มีค่าระหว่าง 0.63 ถึง 0.99 (ภาพที่ 4.6)

| สายพันธุ์ | Forida | HO | HOSno.1 | HOSno.2 | HOSno.3 | KDDNs | KDLS1 | KDLS2 | KD-Si | Khon Kaen 80 | KN(SR) | KNLS1 | LN | MA | Maradal | MI | MIR | SEW58 | SK001 | SK002 | SK003 | SK004 | Taiwan | Khaeg Dum | Khaeg Nuan | Khrang | Tha Phra3 | Number 12 | Pak Chong | Hybrid Australia | Si Tong | Hawaii |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Forida | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HO | 0.50 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HOSno.1 | 0.55 | 0.85 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HOSno.2 | 0.51 | 0.83 | 0.92 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HOSno.3 | 0.47 | 0.93 | 0.80 | 0.82 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| KDDNs | 0.62 | 0.72 | 0.77 | 0.73 | 0.70 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| KDLS1 | 0.60 | 0.69 | 0.73 | 0.70 | 0.68 | 0.85 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| KDLS2 | 0.62 | 0.68 | 0.75 | 0.71 | 0.67 | 0.87 | 0.89 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| KD-Si | 0.62 | 0.70 | 0.76 | 0.74 | 0.67 | 0.89 | 0.87 | 0.91 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Khon Kaen 80 | 0.71 | 0.60 | 0.66 | 0.61 | 0.56 | 0.72 | 0.67 | 0.70 | 0.70 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| KN(SR) | 0.54 | 0.69 | 0.70 | 0.68 | 0.69 | 0.77 | 0.79 | 0.75 | 0.80 | 0.64 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| KNLS1 | 0.59 | 0.73 | 0.75 | 0.74 | 0.70 | 0.88 | 0.79 | 0.82 | 0.85 | 0.67 | 0.77 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LN | 0.61 | 0.69 | 0.77 | 0.73 | 0.65 | 0.83 | 0.80 | 0.84 | 0.92 | 0.68 | 0.77 | 0.79 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MA | 0.61 | 0.68 | 0.74 | 0.69 | 0.65 | 0.89 | 0.79 | 0.82 | 0.85 | 0.72 | 0.75 | 0.85 | 0.82 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Maradal | 0.59 | 0.65 | 0.72 | 0.68 | 0.63 | 0.78 | 0.75 | 0.72 | 0.76 | 0.66 | 0.73 | 0.73 | 0.75 | 0.80 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MI | 0.63 | 0.72 | 0.73 | 0.69 | 0.73 | 0.71 | 0.72 | 0.73 | 0.71 | 0.62 | 0.69 | 0.68 | 0.70 | 0.71 | 0.65 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MIR | 0.60 | 0.70 | 0.68 | 0.67 | 0.70 | 0.73 | 0.71 | 0.72 | 0.73 | 0.59 | 0.71 | 0.70 | 0.71 | 0.70 | 0.66 | 0.87 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| SEW58 | 0.59 | 0.69 | 0.79 | 0.74 | 0.68 | 0.85 | 0.79 | 0.80 | 0.83 | 0.70 | 0.74 | 0.82 | 0.82 | 0.86 | 0.80 | 0.73 | 0.74 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | |
| SK001 | 0.61 | 0.70 | 0.76 | 0.75 | 0.70 | 0.82 | 0.80 | 0.80 | 0.81 | 0.69 | 0.74 | 0.77 | 0.81 | 0.85 | 0.78 | 0.78 | 0.77 | 0.86 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | |
| SK002 | 0.56 | 0.79 | 0.85 | 0.82 | 0.77 | 0.80 | 0.78 | 0.76 | 0.79 | 0.65 | 0.73 | 0.79 | 0.78 | 0.82 | 0.73 | 0.71 | 0.73 | 0.83 | 0.85 | 1.00 | | | | | | | | | | | | |
| SK003 | 0.57 | 0.76 | 0.75 | 0.72 | 0.75 | 0.70 | 0.71 | 0.69 | 0.72 | 0.60 | 0.73 | 0.71 | 0.72 | 0.72 | 0.68 | 0.78 | 0.76 | 0.75 | 0.77 | 0.79 | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| SK004 | 0.58 | 0.70 | 0.75 | 0.73 | 0.69 | 0.73 | 0.75 | 0.73 | 0.74 | 0.62 | 0.69 | 0.72 | 0.73 | 0.75 | 0.83 | 0.68 | 0.71 | 0.79 | 0.83 | 0.83 | 0.77 | 1.00 | | | | | | | | | | |
| Taiwan | 0.63 | 0.75 | 0.80 | 0.79 | 0.73 | 0.91 | 0.82 | 0.85 | 0.88 | 0.71 | 0.75 | 0.88 | 0.81 | 0.87 | 0.74 | 0.74 | 0.75 | 0.85 | 0.85 | 0.85 | 0.73 | 0.77 | 1.00 | | | | | | | | | |
| Khaeg Dum | 0.62 | 0.67 | 0.73 | 0.70 | 0.65 | 0.84 | 0.84 | 0.87 | 0.91 | 0.72 | 0.77 | 0.82 | 0.87 | 0.84 | 0.75 | 0.72 | 0.72 | 0.81 | 0.81 | 0.78 | 0.69 | 0.74 | 0.85 | 1.00 | | | | | | | | |
| Khaeg Nuan | 0.63 | 0.69 | 0.75 | 0.71 | 0.68 | 0.91 | 0.85 | 0.86 | 0.89 | 0.71 | 0.78 | 0.86 | 0.84 | 0.88 | 0.77 | 0.71 | 0.72 | 0.85 | 0.83 | 0.80 | 0.69 | 0.75 | 0.88 | 0.89 | 1.00 | | | | | | | |
| Khrang | 0.55 | 0.69 | 0.71 | 0.69 | 0.67 | 0.81 | 0.75 | 0.79 | 0.78 | 0.67 | 0.78 | 0.80 | 0.75 | 0.79 | 0.72 | 0.67 | 0.65 | 0.76 | 0.75 | 0.74 | 0.72 | 0.70 | 0.79 | 0.76 | 0.78 | 1.00 | | | | | | |
| Tha Phra3 | 0.71 | 0.60 | 0.65 | 0.61 | 0.57 | 0.72 | 0.68 | 0.71 | 0.70 | 0.99 | 0.65 | 0.67 | 0.69 | 0.73 | 0.67 | 0.63 | 0.60 | 0.70 | 0.69 | 0.65 | 0.62 | 0.62 | 0.72 | 0.72 | 0.72 | 0.68 | 1.00 | | | | | |
| Number 12 | 0.58 | 0.68 | 0.73 | 0.70 | 0.66 | 0.81 | 0.79 | 0.80 | 0.81 | 0.69 | 0.80 | 0.80 | 0.76 | 0.81 | 0.74 | 0.69 | 0.70 | 0.79 | 0.75 | 0.76 | 0.72 | 0.70 | 0.81 | 0.78 | 0.79 | 0.77 | 0.70 | 1.00 | | | | |
| Pak Chong | 0.56 | 0.66 | 0.70 | 0.71 | 0.65 | 0.75 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.63 | 0.71 | 0.73 | 0.70 | 0.73 | 0.75 | 0.70 | 0.67 | 0.75 | 0.72 | 0.69 | 0.65 | 0.69 | 0.73 | 0.70 | 0.75 | 0.72 | 0.64 | 0.72 | 1.00 | | | |
| Hybrid Australia | 0.54 | 0.64 | 0.63 | 0.65 | 0.65 | 0.67 | 0.70 | 0.68 | 0.68 | 0.55 | 0.59 | 0.70 | 0.65 | 0.68 | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.69 | 0.67 | 0.67 | 0.64 | 0.65 | 0.72 | 0.65 | 0.68 | 0.63 | 0.56 | 0.68 | 0.69 | 1.00 | | |
| Si Tong | 0.55 | 0.70 | 0.68 | 0.63 | 0.70 | 0.71 | 0.72 | 0.69 | 0.70 | 0.64 | 0.76 | 0.72 | 0.68 | 0.72 | 0.68 | 0.73 | 0.70 | 0.72 | 0.73 | 0.71 | 0.83 | 0.69 | 0.70 | 0.69 | 0.72 | 0.73 | 0.65 | 0.72 | 0.68 | 0.60 | 1.00 | |
| Hawaii | 0.56 | 0.62 | 0.63 | 0.63 | 0.63 | 0.66 | 0.69 | 0.69 | 0.68 | 0.56 | 0.58 | 0.70 | 0.65 | 0.69 | 0.64 | 0.65 | 0.62 | 0.68 | 0.67 | 0.67 | 0.62 | 0.65 | 0.71 | 0.66 | 0.68 | 0.63 | 0.56 | 0.67 | 0.68 | 0.95 | 0.58 | 1.00 |

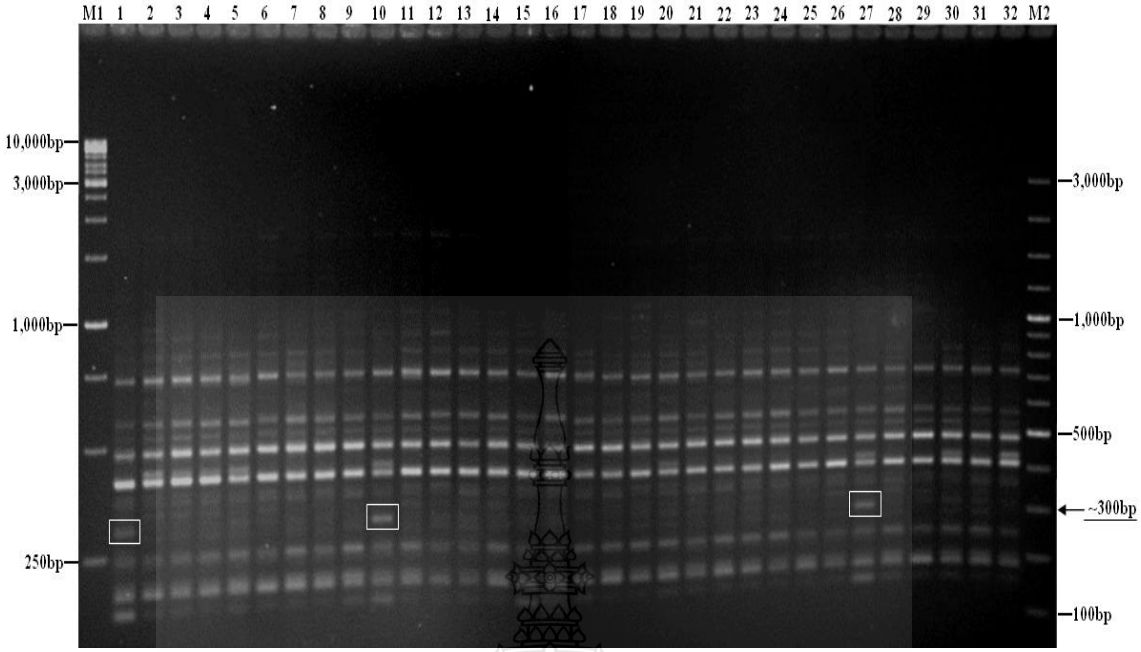
**ภาพที่ 4.5** ค่าดัชนีความเหมือนของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ จำนวน 57 ไพรเมอร์



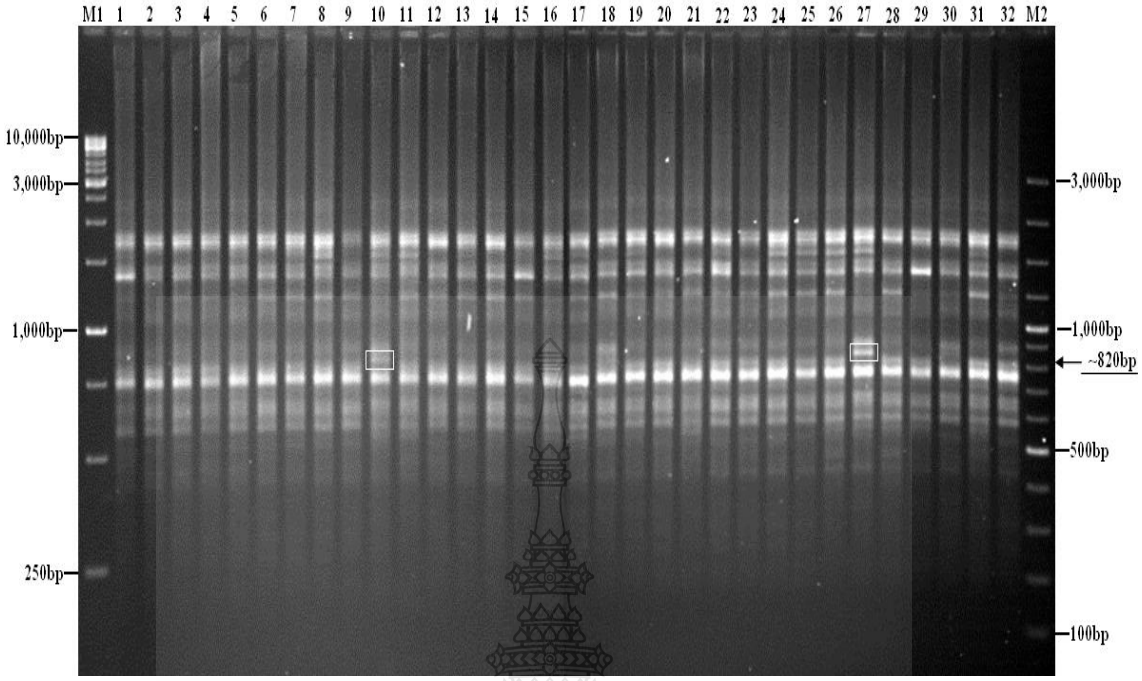

**ภาพที่ 4.6** ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์ และวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธี UPGMA

## 4.6 การคัดเลือกแถบดีเอ็นเอต่างที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์

การตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ จำนวน 57 ไพรเมอร์ และในจำนวนนี้ได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างมะละกอพันธุ์ฟลอริดาและลูกผสมจำนวน 2 ไพรเมอร์คือ ไพรเมอร์ P19 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างในมะละกอสายพันธุ์ ฟลอริดา (Florida) ท่าพระ 3 (Tha Phra 3) และขอนแก่น 80 (Khon Kaen 80) ขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 300 คู่เบส (ภาพที่ 4.7) และไพรเมอร์ P16 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างในมะละกอสายพันธุ์ท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 820 คู่เบส (ภาพที่ 4.8)



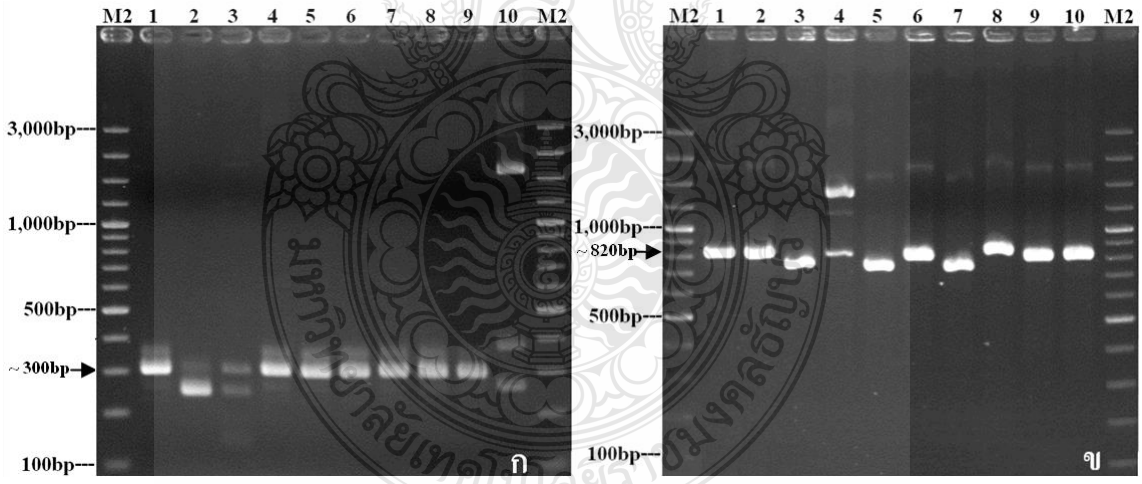

**ภาพที่ 4.7** แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ P19 ช่อง M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (Fermentas) ช่อง 1-32 คือ (1) Florida, (2) HO, (3) HOSno.1, (4) HOSno.2, (5) HOSno.3, (6) KDDNs, (7) KDLS1, (8) KDLS2, (9) KD-Si, (10) Khon Kaen 80, (11) KN(SR), (12) KNLS1, (13) LN, (14) MA, (15) MI, (16) Maradol, (17) MIR, (18) SEW58, (19) SK001, (20) SK002, (21) SK003, (22) SK004, (23) Taiwan, (24) Khaek Dum, (25) Khaek Nuan, (26) Khrang, (27) Tha Phra 3, (28) Number 12, (29) Pak Chong, (30) Hybrid Australia, (31) Si Tong และ (32) Hawaii ตามลำดับ M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentas)




**ภาพที่ 4.8** แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ P16 ช่อง M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (Fermentas) ช่อง 1-32 คือ (1) Florida, (2) HO, (3) HOSno.1, (4) HOSno.2, (5) HOSno.3, (6) KDDNs, (7) KDLS1, (8) KDLS2, (9) KD-Si, (10) Khon Kaen 80, (11) KN(SR), (12) KNLS1, (13) LN, (14) MA, (15) MI, (16) Maradol, (17) MIR, (18) SEW58, (19) SK001, (20) SK002, (21) SK003, (22) SK004, (23) Taiwan, (24) Khaek Dum, (25) Khaek Nuan, (26) Khrang, (27) Tha Phra 3, (28) Number 12, (29) Pak Chong, (30) Hybrid Australia, (31) Si Tong และ (32) Hawaii ตามลำดับ M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentas)

## 4.7 การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ

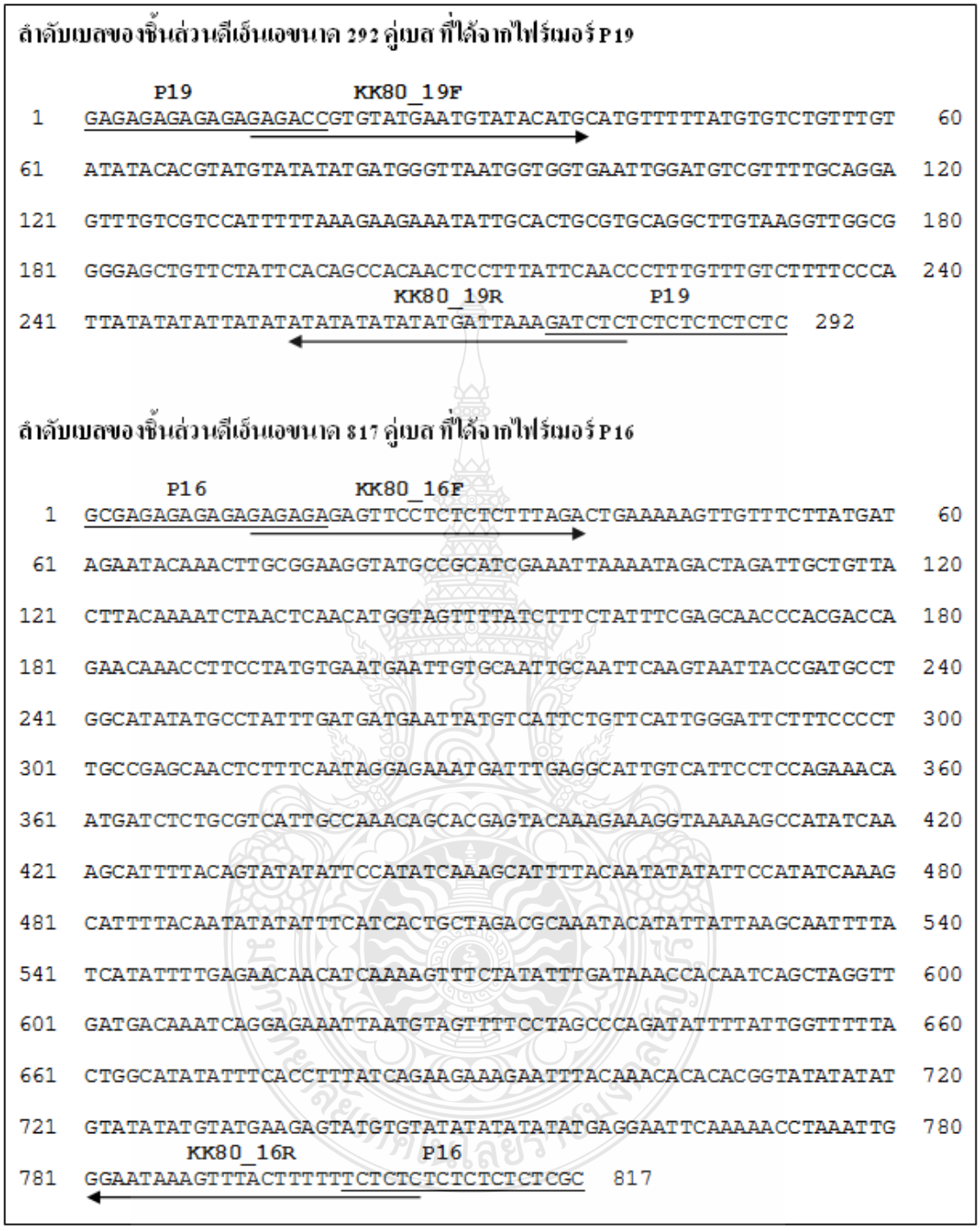
ทำการสกัดแถบดีเอ็นที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของดีเอ็นเอของมะละกอขอนแก่น 80 กับไพรเมอร์ P19 ขนาดประมาณ 300 คู่เบส และ ไพรเมอร์ P16 ขนาดประมาณ 820 คู่เบสออกจาก เจลอะกาโรส นำชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pJET1.2/blunt และส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α และเลือกโคโลนีตัวอย่างละ 10 โคโลนีมาตรวจสอบว่ามีชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาเชื่อมต่ออยู่กับพลาสมิด pJET1.2/blunt โดยการทำพีซีอาร์ด้วยการใช้ไพรเมอร์ P19 กับโคโลนีเชื้อทีโคลนจากแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส และP16 กับโคโลนีเชื้อที่โคลนจากแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 820 คู่เบสผลปรากฏว่าตัวอย่างของไพรเมอร์ P19 มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ 7 โคโลนี คือ โคโลนีที่ 1 4 5 6 7 8 9 จากทั้งหมด 10 โคโลนี และไพร์เมอร์ P16 มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ 5 โคโลนีคือโคโลนีที่ 1 2 6 9 10 จากทั้งหมด 10 โคโลนี (ภาพที่ 4.9) นำโคโลนีที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของดีเอ็นเอที่ต้องการมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณและสกัดแยกพลาสมิด จากนั้นส่งตัวอย่างพลาสมิดที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่าลำดับเบสที่ได้จากไพร์เมอร์ P19 ได้ชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 292 คู่เบส และไพรเมอร์ P16 ได้ชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 817 คู่เบส (ภาพที่ 4.10)




**ภาพที่ 4.9** แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำโคโลนีพีซีอาร์ ช่อง M1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ช่องที่ 1-10 คือ แถบดีเอ็นเอจากโคโลนีที่ 1-10 ตามลำดับ

ก) ไพรเมอร์ P19 กับชิ้นส่วนชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส

ข) ไพรเมอร์ P16 กับชิ้นส่วนชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 820 คู่เบส




**ภาพที่ 4.10** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของมะละกอขอนแก่น 80 ที่ได้จากไพรเมอร์ P19 และ P16 บริเวณที่มีลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของ SCAR primer

### 4.8 การออกแบบ SCAR primer และตรวจสอบความจำเพาะ

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากไพร์เมอร์ P19 และไพร์เมอร์ P16 (ภาพที่ 4.10) ทำให้สามารถออกแบบ SCAR primer (Forward primer และ Reverse primer) ได้ดังนี้

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 292 คู่เบสที่ได้จากไพร์เมอร์ P19

Forward primer : KK80_19F 5'- GAGACCGTGTATGAATGTATACATG -3'

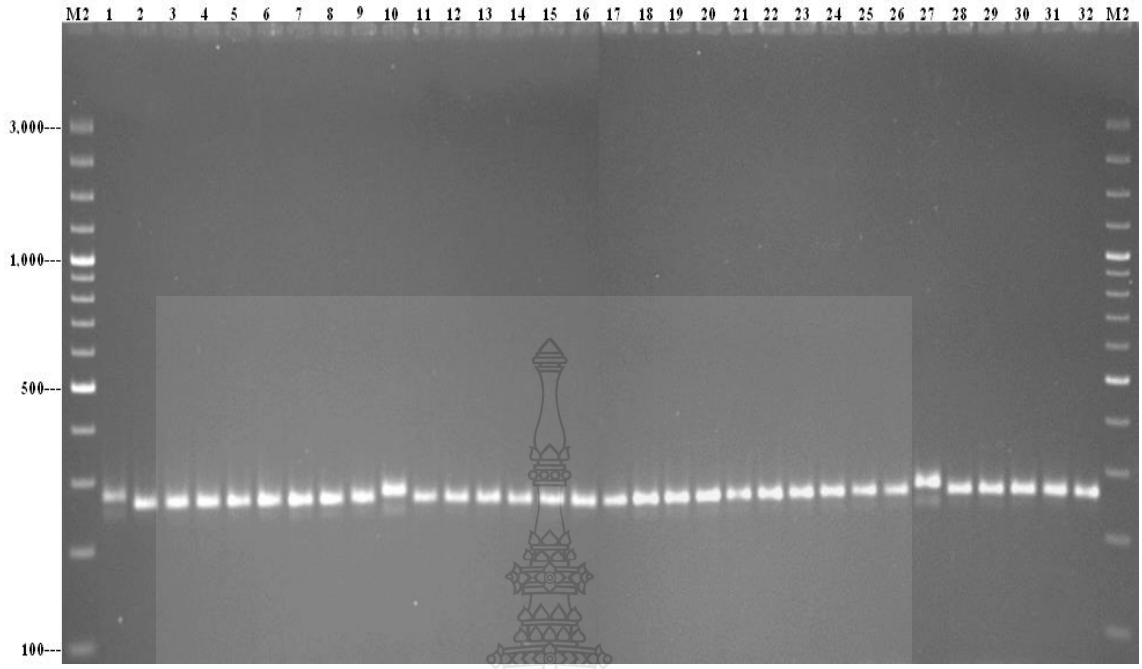
Reverse primer : KK80_19R 5'- GAGATCTTTAATCATATATATATAT -3'

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 817 คู่เบส ที่ได้จากไพร์เมอร์ P16

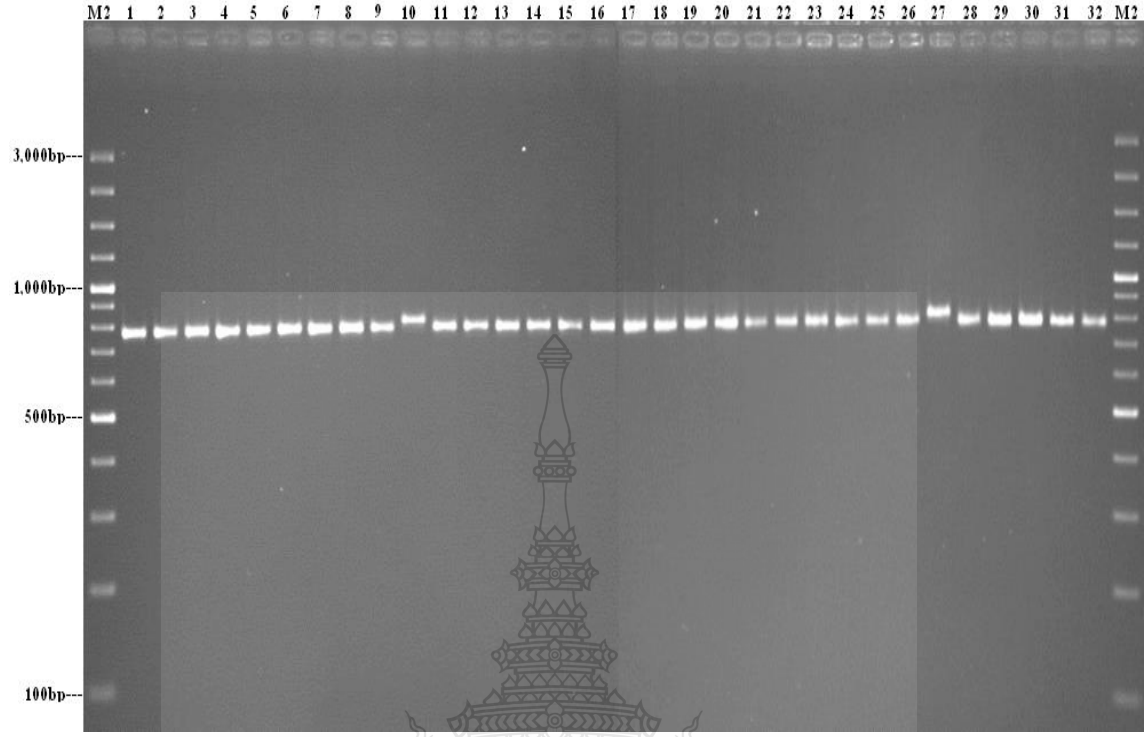
Forward primer : KK80_16F 5'- GAGAGAGAGTTCCTCTCTCTTTAGA-3'

Reverse primer : KK80_16R 5'- GAGAGAAAAAAGAGGGCTTTATTCC-3'

นำคู่ของ SCAR primer ที่ได้มาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนการทำพีซีอาร์เพื่อจำแนกมะละกอขอนแก่น 80 และสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องโดยใช้ดีเอ็นเอมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ที่สกัดได้จากตัวอย่างในขั้นตอนแรก และทำการเตรียมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้ ในปริมาตร 25 ไมโครลิตรประกอบด้วย 1xPCR buffer 0.25mM dNTP 2.5mM $MgCl_2$ 1µM primer (Forward+Reverse) 5unit/µl *Taq* DNA polymerase และดีเอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัมโดยให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตรทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่องพีซีอาร์โดยตั้งโปรแกรมพีซีอาร์ดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 3 นาทีขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 30 วินาทีอุณหภูมิในช่วง annealing คู่ไพรเมอร์ KK80_19F กับ KK80_19R ใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ส่วนคู่ไพรเมอร์KK80_16F กับ KK80_16R ใช้อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 30 วินาทีและอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 นาทีโดยทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 7 นาทีโดยพบว่าผลของรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_19F กับ KK80_19R ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างในสายพันธุ์ ฟลอริดาท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 ขนาดประมาณ 280 คู่เบส โดยในสายพันธุ์อื่นให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 270 คู่เบส (ภาพที่ 4.11) และคู่ไพรเมอร์ KK80_19F กับ KK80_19R ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างในสายพันธุ์ท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 ขนาดประมาณ 800 คู่เบส โดยในสายพันธุ์อื่นให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 780 คู่เบส (ภาพที่ 4.12)




**ภาพที่ 4.11** แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ KK80_19F กับ KK80_19R ช่อง M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ช่อง 1-32 คือ (1) Florida, (2) HO, (3) HOSno.1, (4) HOSno.2, (5) HOSno.3, (6) KDDNs, (7) KDLS1, (8) KDLS2, (9) KD-Si, (10) Khon Kaen 80, (11) KN(SR), (12) KNLS1, (13) LN, (14) MA, (15) MI, (16) Maradol, (17) MIR, (18) SEW58, (19) SK001, (20) SK002, (21) SK003, (22) SK004, (23) Taiwan, (24) Khaek Dum, (25) Khaek Nuan, (26) Khrang, (27) Tha Phra 3, (28) Number 12, (29) Pak Chong, (30) Hybrid Australia, (31) Si Tong และ (32) Hawaii ตามลำดับ



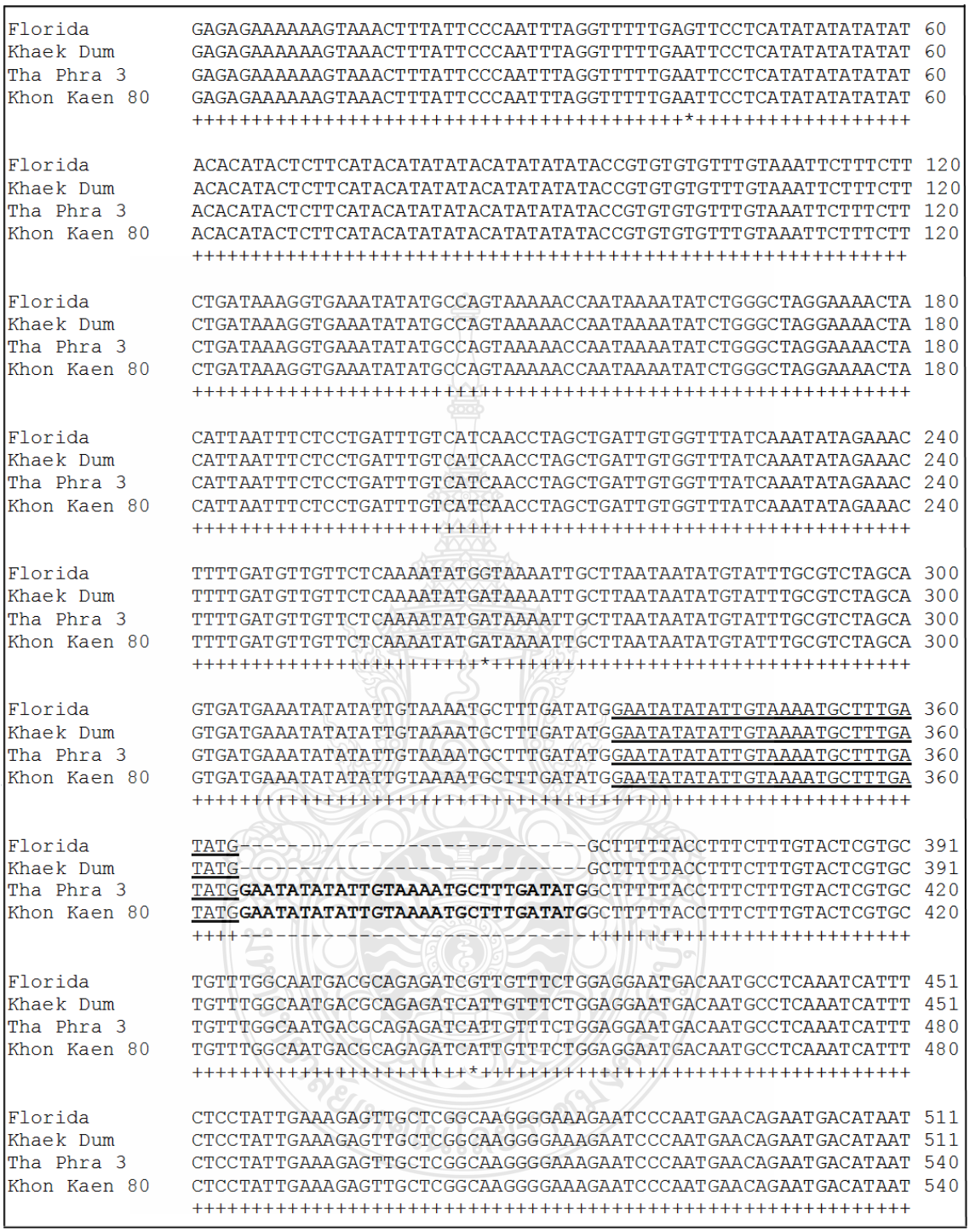

**ภาพที่ 4.12** แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอทั้ง 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ KK80_16F กับ KK80_16R ช่อง M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ช่อง 1-32 คือ (1) Florida, (2) HO, (3) HOSno.1, (4) HOSno.2, (5) HOSno.3, (6) KDDNs, (7) KDLS1, (8) KDLS2, (9) KD-Si, (10) Khon Kaen 80, (11) KN(SR), (12) KNLS1, (13) LN, (14) MA, (15) MI, (16) Maradol, (17) MIR, (18) SEW58, (19) SK001, (20) SK002, (21) SK003, (22) SK004, (23) Taiwan, (24) Khaek Dum, (25) Khaek Nuan, (26) Khrang, (27) Tha Phra 3, (28) Number 12, (29) Pak Chong, (30) Hybrid Australia, (31) Si Tong และ (32) Hawaii ตามลำดับ

## 4.9 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบ

จากผลการตรวจสอบรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาในข้างต้น จึงได้ทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ระหว่างคู่ไพรเมอร์ KK80_P19F กับ KK80_P19R และ คู่ไพรเมอร์ KK80_P16F กับ KK80_P16R กับฟลอริดา แขกดำ (Khaek Dum) ท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 จากนั้นนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างๆ ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ของมะละกอแต่ละพันธุ์/สายพันธุ์ (ภาพที่ 4.13 และภาพที่ 4.14)

```
Florida          GAGACCGTGTATGAATGTATACATGGATGTTTTTATGTGTCTGTTTGTATATACATGTAT 60
Khaek Dum        GAGACCGTGTATGAATGTATACATGGATGTTTTTATGTGTCTGTTTGTATATACATGTAT 60
Tha Phra 3       GAGACCGTGTATGAATGTATACATGGATGTTTTTATGTGTCTGTTTGTATATACATGTAT 60
Khon Kaen 80     GAGACCGTGTATGAATGTATACATGGATGTTTTTATGTGTCTGTTTGTATATACATGTAT 60
                 ++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++

Florida          GTATATATGATGGGTTAATGGTGGTGAATTGGATGTCGTTTTGCAGGAGTTTGTCGTCCA 120
Khaek Dum        GTATATATGATGGGTTAATGGTGGTGAATTGGATGTCGTTTTGCAGGAGTTTGTCGTCCA 120
Tha Phra 3       GTATATATGATGGGTTAATGGTGGTGAATTGGATGTCGTTTTGCAGGAGTTTGTCGTCCA 120
Khon Kaen 80     GTATATATGATGGGTTAATGGTGGTGAATTGGATGTCGTTTTGCAGGAGTTTGTCGTCCA 120
                 ++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++

Florida          TTTTTAAAGAAGAAATATTGCACTGCGTGCAGGCTTGTAAGGTTGGCGGGGAGCTGTTCT 180
Khaek Dum        TTTTTAAAGAAGAAATATTGCACTGCGTGCAGGCTTGTAAGGTTGGCGGGGAGCTGTTCT 180
Tha Phra 3       TTTTTAAAGAAGAAATATTGCACTGCGTGCAGGCTTGTAAGGTTGGCGGGGAGCTGTTCT 180
Khon Kaen 80     TTTTTAAAGAAGAAATATTGCACTGCGTGCAGGCTTGTAAGGTTGGCGGGGAGCTGTTCT 180
                 ++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++

Florida          ATTCACAGCCACAACTCCTTTATTCAACCCTTTGTTTGTCTTTTCCCATTATATATATTA 240
Khaek Dum        ATTCACAGCCACAACTCCTTTATTCAACCCTTTGTTTGTCTTTTCCCATTATATATAT-- 238
Tha Phra 3       ATTCACAGCCACAACTCCTTTATTCAACCCTTTGTTTGTCTTTTCCCATTATATATATTA 238
Khon Kaen 80     ATTCACAGCCACAACTCCTTTATTCAACCCTTTGTTTGTCTTTTCCCATTATATATATTA 240
                 ++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++--

Florida          TATATATATATATATGATTAAAGATCTC 268
Khaek Dum        --------ATATATGATTAAAGATCTC 257
Tha Phra 3       TATATATATATATATGATTAAAGATCTC 268
Khon Kaen 80     TATATATATATATATGATTAAAGATCTC 268
                 ---------++++++++++++++++++++

+ = ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน  * = ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน  — = ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหายไป
```

**ภาพที่ 4.13** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_P19F กับ KK80_P19R ของมะละกอฟลอริดา ท่าพระ 3 แขกดำ และขอนแก่น 80



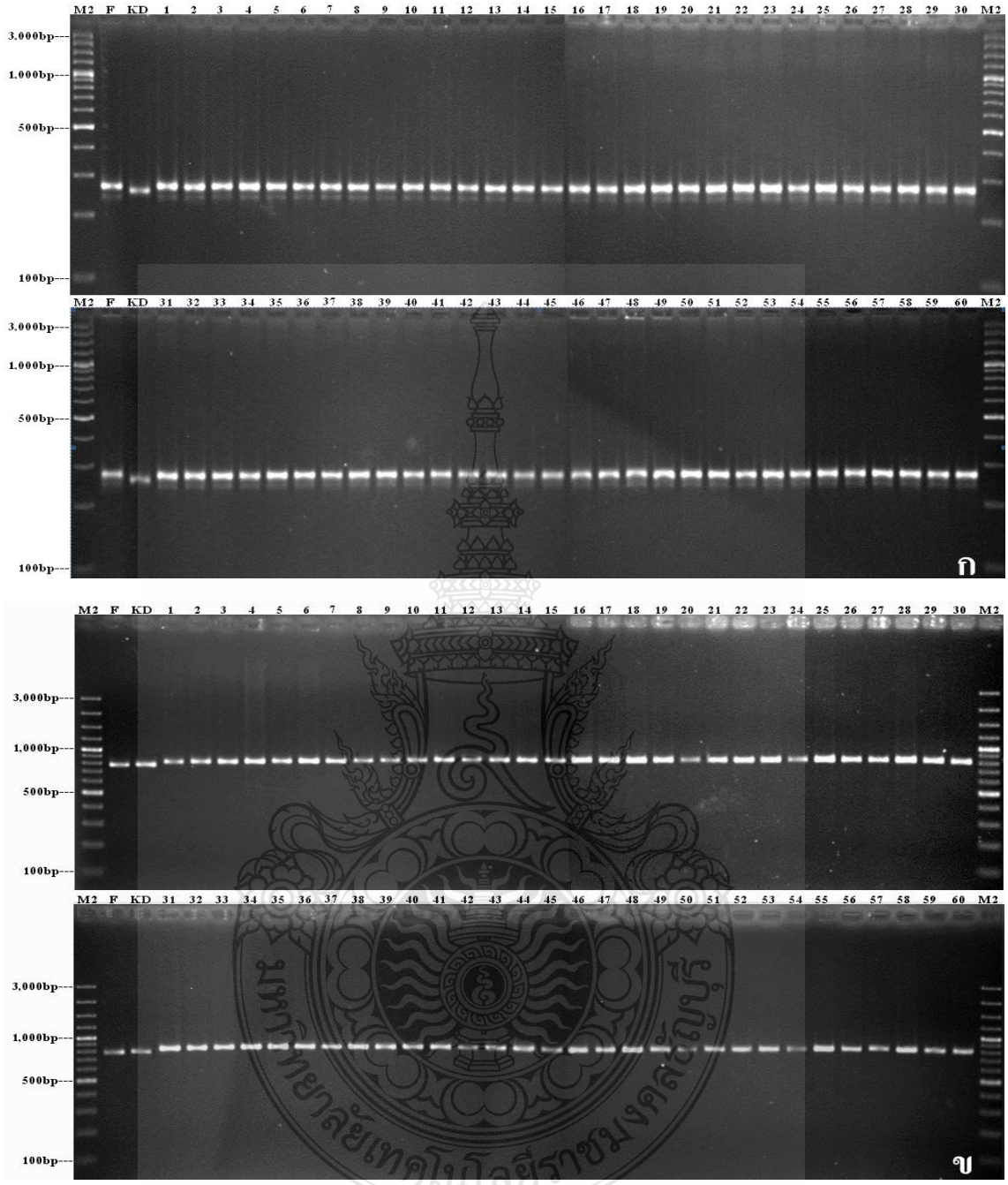

**ภาพที่ 4.14** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_P16F กับ KK80_P16R ของมะละกอฟลอริดา ท่าพระ 3 แขกดำ และขอนแก่น 80

```
Florida          TCATCATCAAATAGGCATATATGCCAGGCATCGGTAATTACTTGAATTGCAATTGCACAA 571
Khaek Dum        TCATCATCAAATAGGCATATATGCCAGGCATCGGTAATTACTTGAATTGCAATTGCACAA 571
Tha Phra 3       TCATCATCAAATAGGCATATATGCCAGGCATCGGTAATTACTTGAATTGCAATTGCACAA 600
Khon Kaen 80     TCATCATCAAATAGGCATATATGCCAGGCATCGGTAATTACTTGAATTGCAATTGCACAA 600
                 ++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++

Florida          TTCATTCACATAGGAAGGTTTGTTCTGGTCGTGGGTCGCTCGAAATAGAAAGATAAAACT 631
Khaek Dum        TTCATTCACATAGGAAGGTTTGTTCTGGTCGTGGGTTGCTCGAAATAGAAAGATAAAACT 631
Tha Phra 3       TTCATTCACATAGGAAGGTTTGTTCTGGTCGTGGGTTGCTCGAAATAGAAAGATAAAACT 660
Khon Kaen 80     TTCATTCACATAGGAAGGTTTGTTCTGGTCGTGGGTTGCTCGAAATAGAAAGATAAAACT 660
                 ++++++++++++++++++++++++++++++++++*++++++++++++++++++++++++

Florida          ACCATGTTGAGTTAGATTTTGTAAGTAACAGCAATCTAGTCTATTTTAATTTCGATGCGG 691
Khaek Dum        ACCATGTTGAGTTAGATTTTGTAAGTAACAGCAATCTAGTCTATTTTAATTTCGATGCAG 691
Tha Phra 3       ACCATGTTGAGTTAGATTTTGTAAGTAACAGCAATCTAGTCTATTTTAATTTCGATGCGG 720
Khon Kaen 80     ACCATGTTGAGTTAGATTTTGTAAGTAACAGCAATCTAGTCTATTTTAATTTCGATGCGG 720
                 ++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++*+

Florida          CATACCTTCCGCAAGTTTTGTATTCTATCATAAGAAACAACTTTTTTCAGTCTAAAGGAG 751
Khaek Dum        CATACCTTCCGCAAG-TTTGTATTCTATCATAAGAAACAACTTTTT-CAGTCTAAAG-AG 748
Tha Phra 3       CATACCTTCCGCAAG-TTTGTATTCTATCATAAGAAACAACTTTTT-CAGTCTAAAG-AG 777
Khon Kaen 80     CATACCTTCCGCAAG-TTTGTATTCTATCATAAGAAACAACTTTTT-CAGTCTAAAG-AG 777
                 +++++++++++++++-++++++++++++++++++++++++++++++-++++++++++-++

Florida          AGAGGGAACTC-CTCTCCTC 770
Khaek Dum        AGAGG-AACTCTCTCTC--- 764
Tha Phra 3       AGAGG-AACTCTCTCTC--- 793
Khon Kaen 80     AGAGG-AACTCTCTCTC--- 793
                 +++++-+++++-++++++---

+ = ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน   * = ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน   – = ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหายไป
```

**ภาพที่ 4.14 (ต่อ)** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_P16F กับ KK80_P16R ของมะละกอฟลอริดา ท่าพระ 3 แขกดำ และขอนแก่น 80

## 4.10 การประยุกต์ใช้เครื่องหมาย SCAR ที่พัฒนามาจากเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

จากการขยายผลการวิจัย โดยนำคู่ของ SCAR primer คือ คู่ไพรเมอร์ KK80_P19F กับ KK80_P19R และ คู่ไพรเมอร์ KK80_P16F กับ KK80_P16R ที่ได้มาจากการศึกษาในครั้งนี้ไปทดสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์ กับตัวอย่างมะละกอขอนแก่น 80 ที่เก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่นจำนวน 60 ต้น พบว่าผลของรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ ตรงกับการศึกษาในการทดลอง 4.8 (ภาพที่ 4.15)




**ภาพที่ 4.15** ผลทดสอบการนำคู่ของ SCAR primer ที่ได้มาจากการศึกษา ทดสอบกับตัวอย่าง มะละกอขอนแก่น 80 จำนวน 60 ต้น ช่อง M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) F คือ ฟลอริดา; KD คือแขกดำ และ 1-60 คือขอนแก่น 80 ต้นที่ 1 ถึง ต้นที่ 60
ก) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_P19F กับ KK80_P19R
ข) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_P16F กับ KK80_P16R

# บทที่ 5
# วิจารณ์ผลการทดลอง สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

## 5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง

### 5.1.1 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนของมะละกอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของของมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์ ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Kang *et al.* (1998) วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดการดูดกลืนแสง พบว่าวิธีการนี้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดี และมีปริมาณมากพอในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์พีซีอาร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส ให้ผลสอดคล้องกับข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Kang *et al.* (1998) มีความเหมาะสมในการเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของมะละกอ

### 5.1.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะละกอ

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์พันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ มีค่าใกล้เคียงกับ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอที่ปลูกในประเทศไทยจำนวน 30 พันธุ์ของ *Janthasri et al*., (2007) โดยใช้เทคนิคเอเอฟเอลพีจากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ พบว่ามีค่า PIC ระหว่าง 0.00-0.50 มีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.202 และค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน ที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.726 ถึง 0.92 ส่วนสาเหตุที่ค่า PIC และค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ มีความแตกต่างอันเนื่องมาจากสายพันธุ์มะละกอที่นำมาศึกษา จำนวนไพรเมอร์ที่นำมาใช้ รวมถึงเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์มีความแตกต่างกัน

นอกจากนี้ยังพบว่ามะละกอ ท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.99 (99%) สอดคล้องกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เนื่องจากมะละกอขอนแก่น 80 เป็นมะละกอที่พัฒนาสายพันธุ์มาจากมะละกอท่าพระ 3 (วิไล และคณะ, 2551) เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ ด้วยวิธี UPGMA และนำมาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ พบว่ามะละกอฟลอริดา ท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 ถูกแยกออกมาจากกลุ่มอื่นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 4.6) สอดคล้องกับข้อมูลการปรับปรุงพันธุ์มะละกอ โดยฟลอริดาเป็นมะละกอที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตอเมริกาเหนือ ส่วนท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 เป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่าง ฟลอริดากับแขกดำ (วิไล และคณะ, 2551)

**5.1.3 การคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์**

แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับมะละกอขอนแก่น 80 เนื่องจากขอนแก่น 80 เป็นพันธุ์ที่ปรับปรุงพันธุ์มาจากสายพันธุ์ท่าพระ 3 จึงมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันมาก เป็นผลทำให้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ไม่สามารถแยกความแตกต่างของมะละกอทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ออกจากกันได้

**5.1.4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบ**

(1) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_P19F กับ KK80_P19R ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับมะละกอฟลอริดาแขกดำ ท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 (ภาพที่ 4.13) เห็นได้ว่ามะละกอฟลอริดา ท่าพระ 3 และ ขอนแก่น 80 ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน แต่สายพันธุ์แขกดำที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างออกไป ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_P19F กับ KK80_P19R ในมะละกอท่าพระ 3 และ ขอนแก่น 80 คือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมมาจากพันธุ์ฟลอริดา

(2) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ KK80_P16F กับ KK80_P16R ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับมะละกอฟลอริดา แขกดำ ท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 (ภาพที่ 4.14) มะละกอท่าพระ 3 และ ขอนแก่น 80 ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน ซึ่งแตกต่างจาก มะละกอฟลอริดาและแขกดำ ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อและแม่ และเมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของมะละกอท่าพระ 3 และ ขอนแก่น 80 เปรียบเทียบกับฟลอริดา จะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แต่ในมะละกอแขกดำมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันยกเว้นลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 365-394 คู่เบส ของมะละกอท่าพระ 3 และ ขอนแก่น 80 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นมาจำนวน 29 คู่เบส ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของโครโมโซม โดยมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเพิ่มเข้ามาภายในโครงสร้าง (duplication) แบบแทนเดมดูพลิเคชัน (tandem duplication) (ภาคผนวก ก) โดยชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่เกินมาจะเข้าไปแทรกตรงตำแหน่งเดิมและมีลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงตามแบบเดิม (ประดิษฐ์, 2550) ทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวขึ้นแตกต่างออกไปจากต้นพ่อและต้นแม่

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่มีความจำเพาะในระดับหนึ่งซึ่งสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการหาลูกผสมของสายพันธุ์ฟลอริดา และใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับมะละกอขอนแก่น 80

### 5.1.5 การประยุกต์ใช้เครื่องหมาย SCAR ที่พัฒนามาจากเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

จากการจากการประยุกต์ใช้เครื่องหมาย SCAR ที่ออกแบบได้จากไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ กับมะละกอขอนแก่น 80 ที่เก็บเพิ่มมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่นจำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่าผลที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำกับตัวอย่างทั้งหมด จึงสามารถยืนยันได้ว่าเครื่องหมาย SCAR ที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้มีความจำเพาะ

## 5.2 สรุปผลการวิจัย

การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะในการแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอขอนแก่น 80 โดยสรุปได้ดังนี้

1. เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสามารถในการจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอในระดับหนึ่ง โดยสามารถจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 สายพันธุ์ออกเป็น 2 กลุ่ม สอดคล้องกับแหล่งกำเนิดของมะละกอ และมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.47 ถึง 0.98

2. เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาจากเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในการศึกษาในครั้งนี้ คู่ไพรเมอร์ KK80_P19F กับ KK80_P19R สามารถจำแนกมะละกอ ฟลอริดา ท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 ออกจากมะละกอสายพันธุ์อื่น และคู่ไพรเมอร์ KK80_P16F กับ KK80_P16R สามารถจำแนกมะละกอ ท่าพระ 3 และ ขอนแก่น 80 ออกจากมะละกอสายพันธุ์อื่น

3. เครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถแยกมะละกอ ท่าพระ 3 และ ขอนแก่น 80 ออกจากกันได้ แต่สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปใช้เป็นแนวทางในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของมะละกอขอนแก่น 80 ได้

## 5.3 ข้อเสนอแนะ

(1) ข้อจำกัดบางประการจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอซ้ำอาจได้ผลการศึกษาไม่เหมือนเดิม ซึ่งสาเหตุบางอย่างอาจเกิดจาก การเปลี่ยนเครื่องพีซีอาร์ การเปลี่ยนบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Meunier and Grimont, 1993) ซึ่งการทดลองที่ควบคุมปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวจะช่วยให้ผลการทดลองมีความเชื่อถือ โดยการใช้ดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ สารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และเครื่องพีซีอาร์ ชุดเดียวกันตลอดการทดลองเพื่อให้ผลการศึกษามีความแม่นยำและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

(2) ข้อจำกัดในการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอเกิดปัญหาได้บ่อยๆ เช่น แถบดีเอ็นเอในบางแถวจางหรือไม่ชัดเจนหรือตำแหน่งอาจคลาดเคลื่อนจากกัน เนื่องจากสาเหตุจากแถบดีเอ็นเอแถวที่อยู่ด้านนอกเคลื่อนที่ไปช้ากว่าแถบดีเอ็นเอที่อยู่แถวกลาง เป็นต้น ในกรณีดังกล่าวนี้ ถ้าแถบดีเอ็นเอในแถวใดไม่ชัดเจนไม่อาจบอกได้แน่ชัด ให้ตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวออกไปไม่ต้องนำมาคิดในการให้คะแนน

(3) ควรมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นๆ เข้ามาช่วยจำแนกมะละกอท่าพระ 3 และขอนแก่น 80 เพื่อให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกมะละกอท่าพระ 3 และ ขอนแก่น 80 ออกจากกันได้

# บรรณานุกรม


เกศิณี ระมิงค์วงศ์. (2530). **ไม้ผลเมืองร้อน.** เชียงใหม่: ภาควิชาพืชสวนคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จรัสศรี นวลศรี. (2548). **เอกสารคำสอนการปรับปรุงพืชสวน.** สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บุญญานาถ นาถวงษ์ และ สุภารัตน์ ปิ่นสุภา. (2550). **DNA มาตรฐานขนาดช่วง 100 คู่เบสและขนาดช่วง 1 กิโลเบส**. กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. (2550). **พันธุศาสตร์.** กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรียา พวงสำลี-หวังสมนึก, สุดารัตน์ คำผา, สนั่น จอกลอย, พินิจ หวังสมนึก, และ ยศินทร์ กิติจันทโรภาส. (2549). การวิเคราะห์จีโนมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.).โดยใช้ ISSR markers. **วารสารแก่นเกษตร 34**(2), 124-138.

ปิยวดี สัมมาเพ็ชร์. (2551). **การศึกษาสมบัติของน้ำมันเมล็ดมะละกอเพื่อพัฒนาเป็นน้ำมันบริโภค.** (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยมหิดล).

พิภพ สมเวที และสิริรัตน์ เพชรเหมือน. (2552). **โครงการการศึกษาสายพันธุ์ระบบการผลิตและการตลาดของมะละกอในจังหวัดกระบี่** (รายงานการวิจัย). กระบี่: มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต.

รัฐพร กลิ่นบรรทม. (2547**). การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์ของเปล้าน้อย (*Croton sublyratus*Kurz.).ในประเทศไทย.** (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย).

วิไล ปราสาทศรี, แววจักร กองพลพรหม, สมศักดิ์ วิชัยนันท์, อาทิตย์ ฟุ้งเกียรติไพบูลย์, สุวิทย์ ชัยเกียรติยศ, เกษมศักดิ์ ผลากร, ปรีชา เชยชุ่ม C. Gonsalves และ D. Gonsalves. (2540). การพัฒนาพันธุ์มะละกอลูกผสมทนทานโรคจุดวงแหวนมะละกอ. ใน **การประชุมสัมมนาทางวิชาการเรื่องมะละกอ** (น. 30-43). ขอนแก่น: โรงแรมเจริญธานีปริ๊นเซส.

วิไล ปราสาทศรี, อุดม คำชา, เฉลิมชัย ปราสาทศรี, รัชนี ศิริยาน, สุวิทย์ ชัยเกียรติยศ และ Dennis Gonsalves. (2551). ขอนแก่น 80 มะละกอผลเล็กเพื่อกินสุกและส่งออก. ใน **เอกสารผลงานวิจัยใช้ได้จริงจากหิ้งสู่ห้าง ครั้งที่ 2** (น. 31-44). กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

ศรีสุข พูนผลกุล, ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์. (2553). **โมเลกุลเครื่องหมายตรวจหาความต้านทานของพริกต่อโรคลำต้นไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora capsici.*** กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยพัฒนาอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, วีรเดชโขนสันเทียะ, รัชนี ขันธหัตถ์, เพียงเพ็ญ ศรวัต, ประพิศ วองเทียม, ศุภชัย สารกาญจน์ และ อัจฉรา ลิ่มศิลา. (2554). **ฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ไทยพันธุ์ลูกผสมและพันธุ์ต่างประเทศ.** ขอนแก่น: ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น.

ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ. (2540). **การศึกษามะละกอทนทานต่อโรคใบด่างไวรัส.** กรุงเทพฯ: อักษรบัณฑิต.

_____. (2543). **การผลิตเมล็ดพันธุ์มะละกอสายพันธุ์ ท่าพระ 1, 2, 3 ทนทานโรคจุดวงแหวนมะละกอและมะละกอแขกดำ.** กรุงเทพฯ: อักษรบัณฑิต.

_____. (2544). **การรวบรวมและศึกษาพันธุ์มะละกอ.** กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตรจังหวัดมหาสารคาม. (2553). **มะละกอพันธุ์ครั่ง.** กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สำนักงานจัดรูปที่ดินจังหวัดอุบลราชธานี. (2556). **สาระน่ารู้ มะละกอ 15 สายพันธุ์ที่ควรรู้เพื่อการเกษตร.** อุบลราชธานี.

สิริกุล วะสี. (2554). **พันธุ์และการปลูกมะละกอ.** นครปฐม: ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

หนูเดือน เมืองแสน. (2556). **เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีที่เกี่ยวของกับปริมาณน้ำมันสูงทานตะวัน** (รายงานการวิจัย). นครราชสีมา: มหาวิทยาเทคโนโลยีสุรนารี.

อรรัตน์ มงคลพร. (2548). **เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์.

อรวรรณ ชลวาณิชย์. (2547). **การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์ของเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*) ในประเทศไทย**. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย).

อรอุมา ตนะดุลย์. (2548). **การควบคุมตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะน้ำหนักเมล็ดถั่วเขียวการวิเคราะห์แบบ bulked segregant**. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์).

Adams, R. P., Schwarzbach, A. E. & Pandey, R. N. (2003). **The Concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from *Juniperus.*** Biochemical Systematics and Ecology 31: 375-387.

Allen, B. M. 1967**. Malayan Fruits.**Donald Moore Press, Singapore.

Basilio, C., Patricio, A., Jorge, P. D., Patricio, M., Rolando, G., Blas, L., Andres, Z., Jorge, B. R., & Peter, D. S. C. (2009). **Genetic structure of highland papayas (*Vasconcelleapubescens* (Lenne´ et C. Koch) Badillo) cultivated along a geographic gradient in Chile as revealed by Inter SimpleSequence Repeats (ISSR)**. Genet Resour Crop Evol. 56: 331-337**.**

Bornet, B. & Branchard, M. (2001). Nonanchored **Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducibleand Specific Tools for Genome Fingerprinting**. Plant Molecular Biology Report 19: 209-215.

Bornet, B., Goraguer, F., Joly, G. & Branchard, M. (2002). **Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* sub sp. *Tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs)**. Genome 45: 481-484.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. & Davis, R. W. (1980) **Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms**. The American Journal of Human Genetics. 32: 314–331.

Chandler, W. H. (1958). **Evergreen Orchards.Lea and Febiger, Philadelphia.Crop** Science 36: 1669-1676.

Conover, R. A., Litz, R. E. & Malo, S. E. (1986). **Cariflora – a Papaya Ringspot Virus tolerant Papaya for South Florida and the Caribean**. Hort Science 21(4): 1072.

Costa, F. R., Telma, N. S. P., Ana, P. C. G. & Messias, G. P. (2011). **NOTE ISSR markers for genetic relationships in Caricaceae and sex differentiation in papaya.** In Biotechnology. 11: 352-357.

Devi, S. (1952). **Studies in the order Parietales. III. Vascular anatomy of the flower of *Carica papaya.*L. with special reference to the structure of the gynoecium.** Proceedings of the Indian Academy of Sciences. Section. B. 36 : 59-69.

Fang, D. Q. & Roose, M. L. (1997). **Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers**. Theoretical Applied Genetics. 95: 408-417.

Gang, M., Chyi, Y. S., Romrro-Severson, J. & Owen, J. L. (1994). **Amplification of DNA markrs from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats**. Theoretical Applied Genetics 89: 998-1006.

Ge, X. J. & Sun, M. (1999). **Reproductive biology and genetic diversity of a crytoviviparous mangrove Aegicerascomice;atum (Myrsinacceae) using allozyme and inter simple sequence repeat (ISSR) analysis.** Molecular Ecology 8: 2061-2069.

Genetics Home Reference. (2015) **Duplication**. (online) retrieved from http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/duplication (10 Apr. 2015)

Gomes, S., Martin-Lopes, P., Lopes, J. & Guedes-Pinto, H. (2009). **Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR.** Plant Molecular Biology Reporter. 27(3): 365-373.

Gonsalves, D., Vegas, A., Prasartsee, V., Drew, R., Suzuki, J. & Tripathi, S. (2006). **Developing Papaya to Control Papaya Ringspot Virus by transgenic Resistance, Intergerie Hybridization, And Tolerance Breeding.** Plant Breeding Review 26: 35-78.

Gower, J. C. (1971). **A General Coefficient of Similarity and Some of Its Properties**. Biometrics, Vol. 27( 4), pp. 857-871.

Hiromi, A., Yokozeki, Y., Inagaki, A., Nakamura, A. & Fujimura, T. (1996). **A codominant DNA Marker closely linked to the rice nuclear restoter gene, *RF-1*, identified with inter SSR fingerprinting.** Genome 39: 1205-1209.

Janthasri, R., Katengam, S. & Khumcha, U. (2007). **An Analysis on DNA Fingerprints of Thirty Papaya Cultivars (*Carica papaya* L.), Grown in Thailand with the Use of Amplified Fragment Length polymorphisms Technique.** Pakistan Jounal of Biological Sciences 10(18): 3072-3078.

Kang, H. W., Cho, Y. G., Yoon, U. H & Eun, M.U. (1998). **A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed.** Plant Molecular Biology Reporter 16: 1-9.

Kochieva, E. Z., Ryzhova, N. N., Khrapalova, I. A. & Pukhalskyi, V. A. (2002). **Genetic diversity And Phylogenetic Relationships in the Genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. as Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Analysis.**Russian Journal of Genetics 38(8).

Lai, J. A., Yang, W. C. & Hsiao, J. Y. (2001). **An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers.** Botanical Bulletin-Academia Sinica 42: 93-100.

Lee, J. W. L., Kim Y. C., Jo, I. H., Seo, A. Y., Lee, J. H., Kim O. T., Hyun, D. Y., Cha, S. W., Bang, K. H., & Cho, J. H. (2011). **Development of an ISSR-Derived SCAR Marker in Korean Ginseng Cultivars (*Panax ginseng* C. A. Meyer).** Journal of Ginseng Research. 35: 52-59

Lynch, M. (1990). **The Similarity Index and DNA Fingerprinting**. Molecular Biology and Evolution, Vol. 7, pp. 478-484.

Lynch, M. (1991). Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting. In ***DNA Fingerprinting: approaches and applications.*** Birkhauser Verlar Basel. pp. 113-126.

Meunier, J. R. & Grimont, P. A. D. (1993). **Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fringerprinting.** Research in Microbiology 144(5): 373-379.

Morgante, M. ℔ Olivieri, A. M. (1993). **PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics.** The Plant Journal. Volume 3: 175-182.

Morris, B. (1994**). Science and future biotechnology.** Cambridege University,. Australia. p. 92.

Nagaoka, T., & Ogihara, Y. (1997). **Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers**. The oretical and applied genetics 94: 597-602.

Nakasone, H. Y. (1975). **Papaya development in Hawaii**. Hort. Science: 10: 198.

National Center for Biotechnology Information (2014) **Sequence-Tagged Sites (STS).** (online) retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techsts/ (3 Aug. 2015)

Niroshini, E., Everard, J. M. D. T., Karunanayake, E. H. & Tirimanne, T. L. S. (2008). **Detection of sequence characterized amplified region (SCAR) markers linked to sex expression in *Carica papaya* L**. Journal Of The National Science Foundation of Sri Lanka. 36(2): 145-150.

Prevost, A. & Wilkinson, M. J. (1999). **Anew system of comparing PCR primer applied to ISSR fingerprinting of potato accession**. Theor. Appl. Genet. 98: 107-112.

Purseglove, J. W. (1974). **Tropical Crops Dicotyledons.** Vol. 1 & 2 Combined. Longman Crop. London.

Raina, P. S., Rani, V., Kojima, T., Singh, K. P.& Devarumath, R. M. (2001). **RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal species**. Genome 44: 763-772.

Redei, G. P. (2008)**. Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics.** Springer Science & Business Media, pp. 2201.

Rita, A., Vaclovas, S., Vanda, P., & Gintaras, B. (2010). **The Genetic Diversity of Fine-Leaved Fescue ( Festuca L.) Species in Lithuania.** Sustainable use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding 2010: 41-45.

Rohlf, F. J. (1998). **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariat Analysis System, Version 3.2.1st Edn.**, Exeter Software, New York.

Ruas, M. P., Claudete, F. R., Leandro, R., Valdemar, P. C., Eduardo, A. R., & Tumoru, S. (2003). **Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (inter-simple sequence repeats) markers.** Genetic and Molecula Biology 26(3): 319-327.

Samson, J. A. (1980)**. Tropical Fruits.** Longman, New York .

Singh, R. A. (1964). **Papaya breeding-A review**. Indian Journal of Horticulture. 21: 148-154.

Storey. (1976). **Papaya. *In* N. W. Simmond, ed. Evolution of Crop Plants**. Longman, New York. pp. 339.

Surzycky, S. (2000). **Basic Techniques in Molecular Biology.** Springer: Berlin, Germany.

Thermo Scientific (2015) **Product Information Thermo Scientific Clone JET PCR Cloning Kit**, Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012707_Clone JET_PCR_Cloning_20rxn_UG.pdf (13 Jun. 2014)

_____.(2015) **Product Information Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder,** Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013004_GeneRuler_1kb_ DNALadder_250ug_UG.pdf (10 Sep. 2015)

_____.(2015) **Product Information Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder,** Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013008_Gene Ruler_100bp _Plus_DNALadder_50ug_UG.pdf (10 Sep. 2015)

Tsumura, Y., Ohba, K. & Strauss, S. H. (1996). **Diversity and inheritance of inter simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir (Pseudotsugamenziesii) and sugi (Cryptomeriajaponica).** Theor. Appl. Genet 92: 40–45.

Urasaki, N., Tokumoto, M., Tarora, K., Ban, Y., Kayano, T., Tanaka, H., Oku, H., Chinen, I. & Terauchi, R. (2002). **A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.) Theor.** The oretical and applied genetics 104: 281–285**.**

Vos, P., Rene, H., Marjo, B., Martin, R., Theo van de, L., Miranda, H., Aarie, F., Jerina, P., Johan, P., Martin, K. & Marc, Z. (1995). **AFLP: A new technique for DNA fingerprintings.** Nucleic Acids. Res. 23: 4407-4414.

Yang, W., Oliveira, A., C.,Godwin, l., Schertz, K. & Bennetzen, J. L. (1996). **Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity. variability in Chinese sorghums**. Crop Science 36: 1669-1676.

Ye, Q., Qiu, Y. X., Quo, Y. q., Chen, J. X., Yang, S. Z., Zhao, M. Z. & Fu, C. X. (2006). **Species-Specific SCAR markers for authentication of *Sinocalycanthus chinensis*** . J Zhejiang University Science B. 7(11): 868-872.

Zajc, I., C.S. Mellersh & J. Sampson. (1997). **Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds.** Mammalian Genome 8: 182-185.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก
# การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในโครโมโซมประเภทดูพลิเคชัน (duplication)

# ภาคผนวก ก

**การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในโครโมโซมประเภทดูพลิเคชัน (duplication)** คือการที่มีส่วนใดส่วนหนึ่งของโครโมโซมเพิ่มขึ้นมาจำแนกตามตำแหน่งที่มีชิ้นส่วนของโครโมโซมเพิ่มขึ้นมาได้ 5 แบบดังนี้

1. แทนเดมดูพลิเคชัน (tandem duplication) เกิดจาก ชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เกินมาจะจะเข้าไปแทรกตรงตำแหน่งเดิมและมีลำดับยีนเรียงตามแบบเดิม เช่น AB • CDE**DE**FG

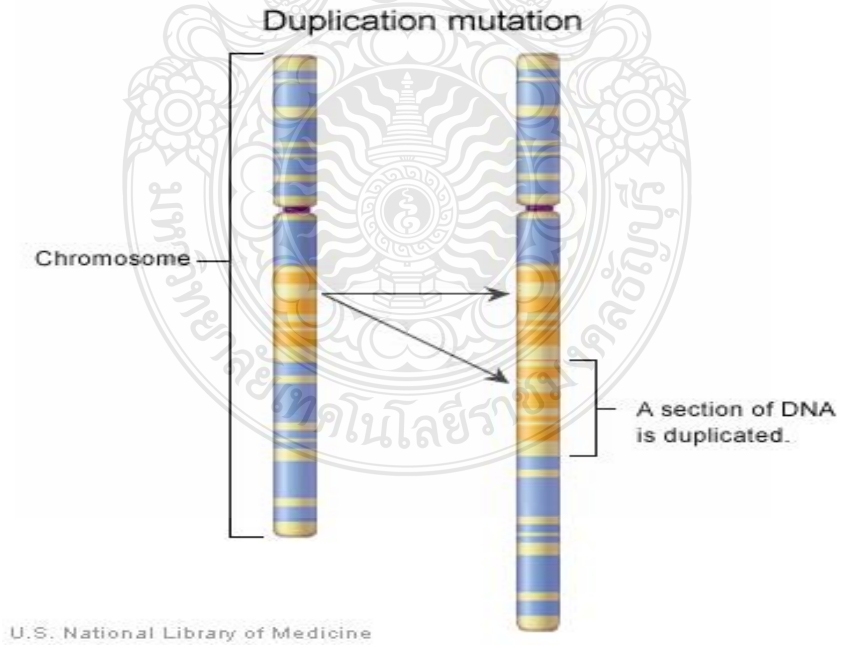
2. รีเวอร์สแทนเดมดูพลิเคชัน (reverse tandem duplication) เกิดจาก ชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เกินมาจะจะเข้าไปแทรกตรงตำแหน่งเดิมแต่ลำดับของยีนจะกลับกับยีนเดิมเช่น AB • CDE**ED**FG

3. ดีสเพลสดูพลิเคชัน (displace duplication) เกิดจากชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เกินมาจะเข้าไปแทรกอยู่ผิดตำแหน่ง มี 2 แบบ คือ

อยู่บนแขนโครโมโซมข้างเดียวกัน (homobrichial displacement) เช่น AB • CEDEFGDE

อยู่บนแขนโครโมโซมคนละข้างกัน (heterobrichial displacement) เช่น ABDE • CEDEFG

4. ทรานส์โพซิชันดูพลิเคชัน (transposition duplication) หมายถึง ชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เกินมา มาจากโครโมโซมอื่นที่ไม่ใช่คู่กัน AB • CDE**MN**FG (ประดิษฐ์, 2550)




**ที่มา:** Genetics Home Reference (2015)

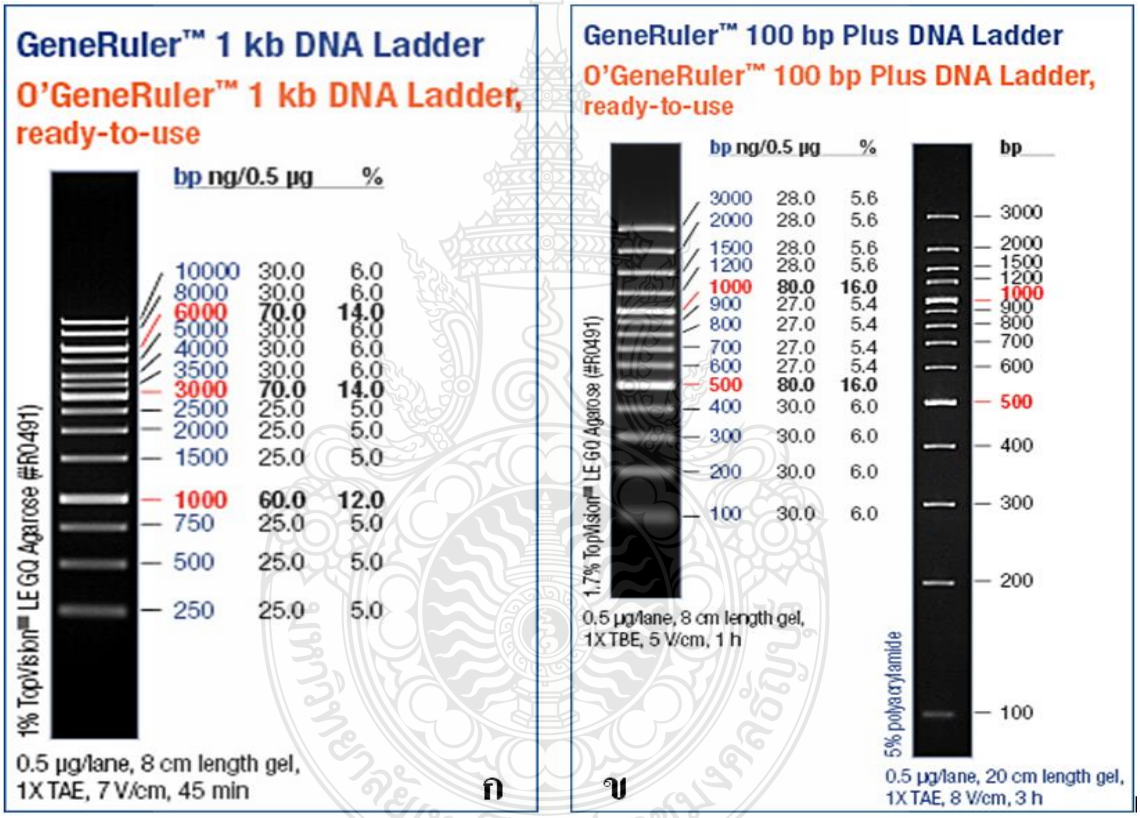
**ภาพผนวกที่ 1** การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในโครโมโซมประเภทดูพลิเคชัน (duplication)

# ภาคผนวก ข

# รูปแสดงแถบแถบดีเอ็นเอและค่าสัญลักษณ์ตัวเลขจากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ

# ภาคผนวก ข

**ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA molecular weight standard)** คือชุดของ DNA ขนาดต่างๆ ซึ่งทราบขนาดที่แน่นอนของดีเอ็นเอแต่ละชิ้นและเมื่อนำดีเอ็นเอมาตรฐานมาแยกในแผ่นเจล โดยใช้กระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ดีเอ็นเอจะเกิดการเคลื่อนที่ในแผ่นเจล โดยที่ดีเอ็นเอขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่ จึงปรากฏเป็นแถบขั้นบันไดของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ซึ่งแถบขั้นบันไดของดีเอ็นเอมาตรฐานนี้สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อประมาณค่าขนาดของดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ต้องการศึกษา (ภาพผนวกที่ ข.1) (บุญญานาถ และ สุภารัตน์, 2550)



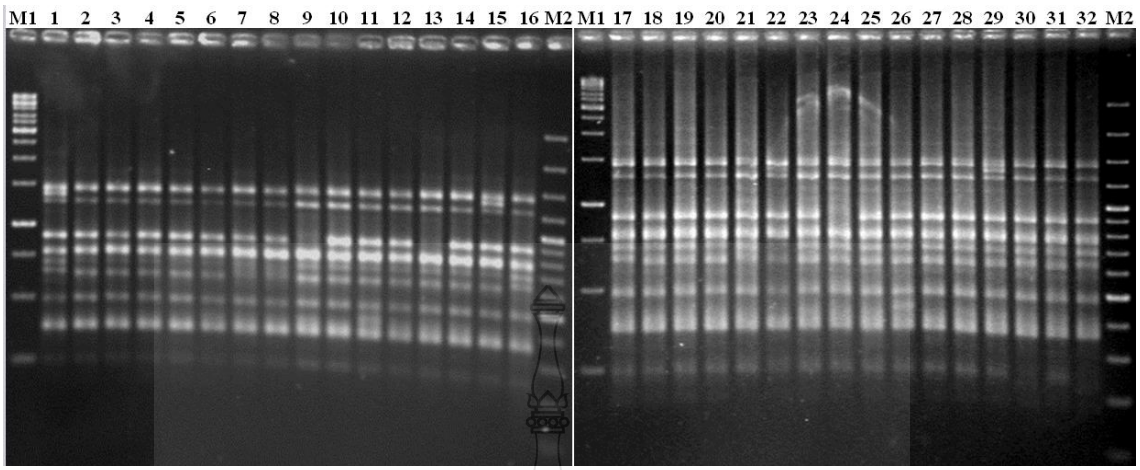

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Thermo Scientific (2015) Product Information Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Thermo Scientifi (2015) Product Information Thermo Scientific GeneRuler 100 bpPlus DNA Ladder.

**ภาพผนวกที่ 2** แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากดีเอ็นเอมาตรฐาน

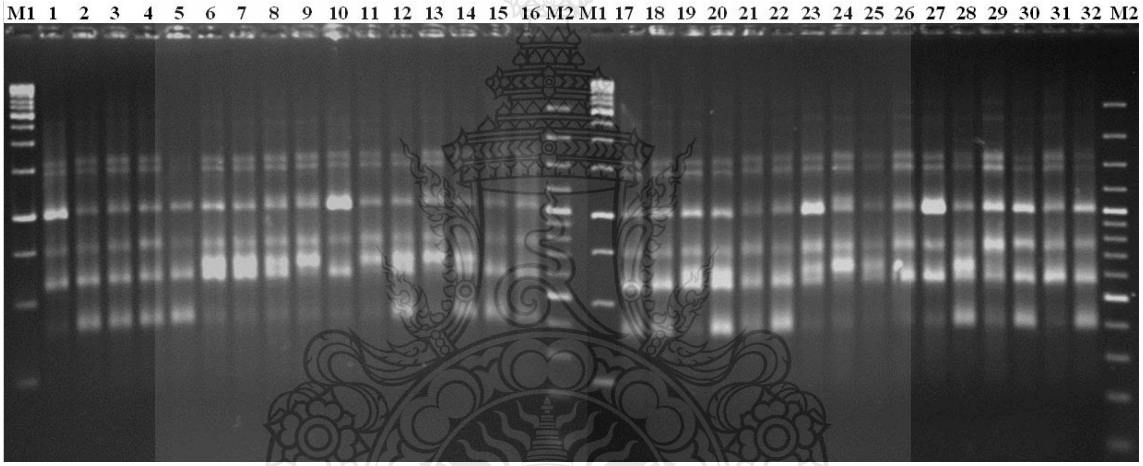
ก) 1 kb ladder (Fermentas)

ข) 100 bp DNA ladder plus (Fermentas)

**Primer P1**

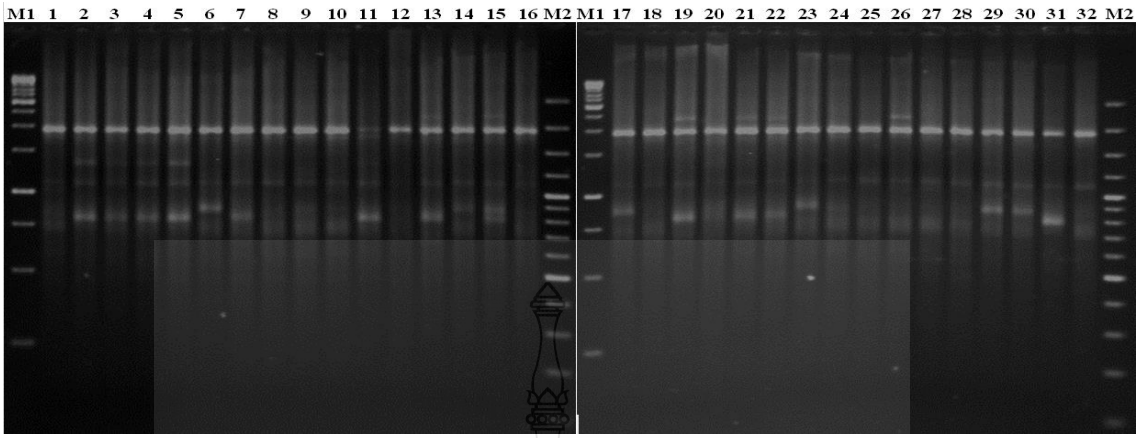



**Primer P2**

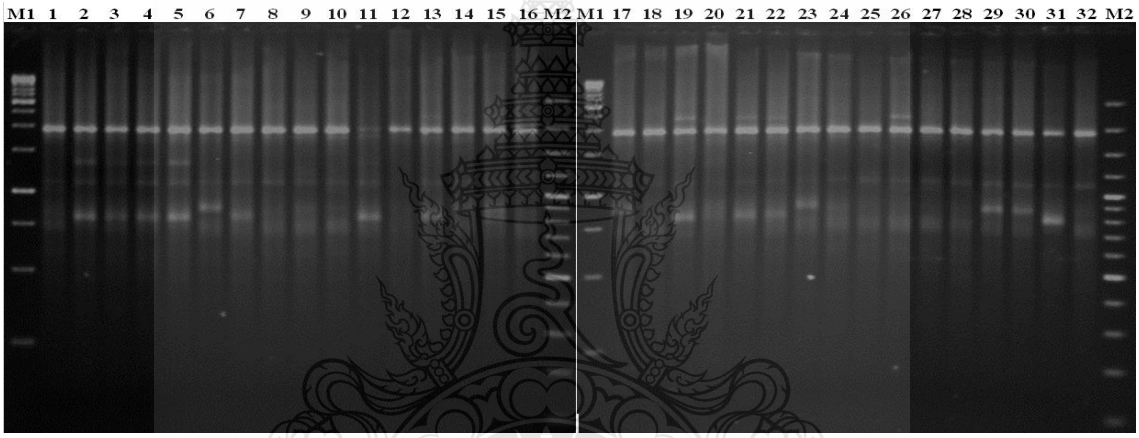



**ภาพผนวกที่ 3** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์ โดยช่อง M1 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (Fermentas), M2 คือเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ช่อง 1-32 คือ (1) Florida, (2) HO, (3) HOSno.1, (4) HOSno.2, (5) HOSno.3, (6) KDDNs, (7) KDLS1, (8) KDLS2, (9) KD-Si, (10) KhonKaen 80, (11) KN(SR), (12) KNLS1, (13) LN, (14) MA, (15) MI, (16) Maradol, (17) MIR, (18) SEW58, (19) SK001, (20) SK002, (21) SK003, (22) SK004, (23) Taiwan, (24) Khaek Dum, (25) Khaek Nuan, (26) Khrang, (27) ThaPhra 3, (28) Number 12, (29) Pak Chong, (30) Hybrid Australia, (31) Si Tong และ (32) Hawaii ตามลำดับ

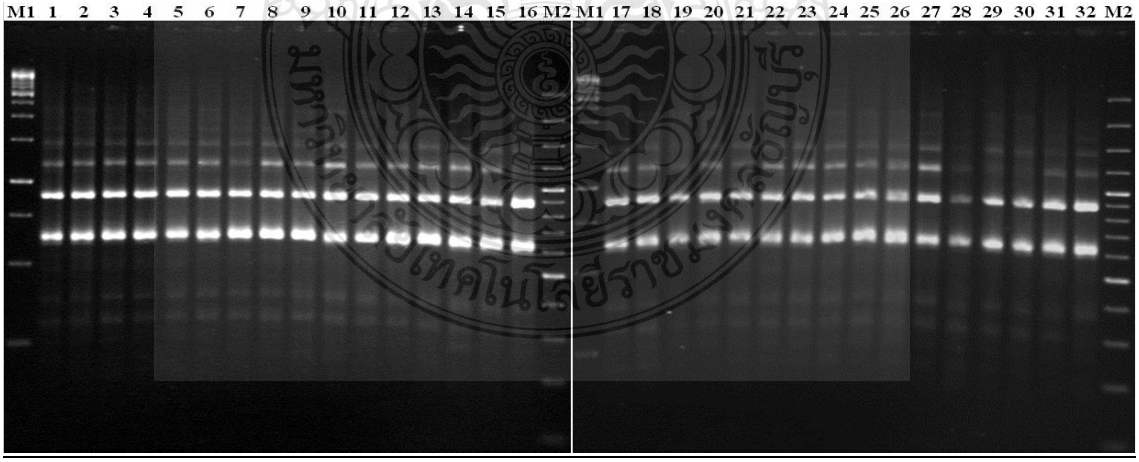
**Primer P3**




**Primer P4**

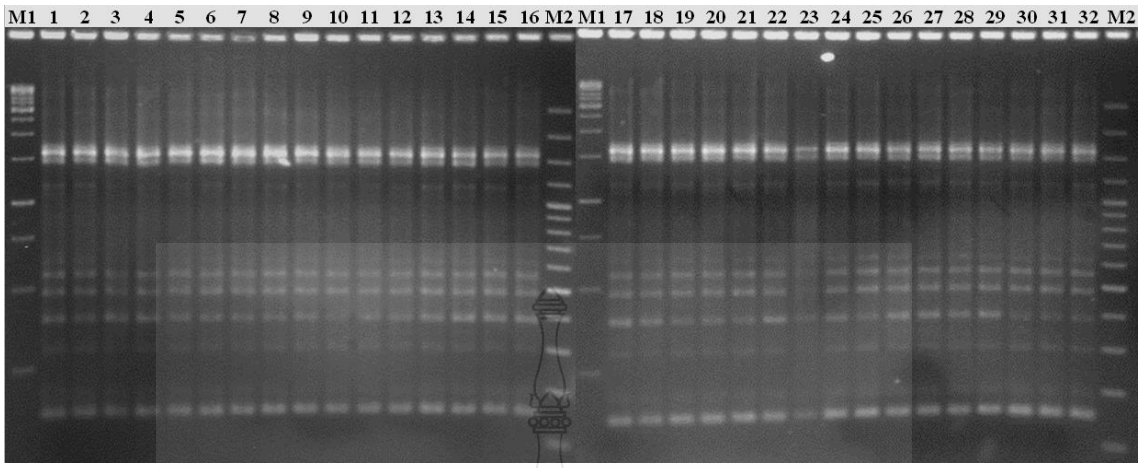



**Primer P5**

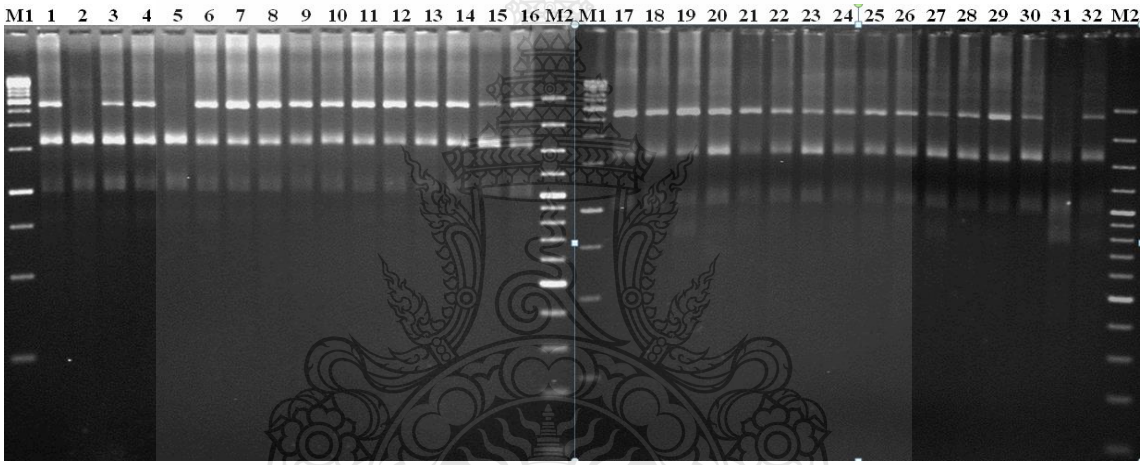



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

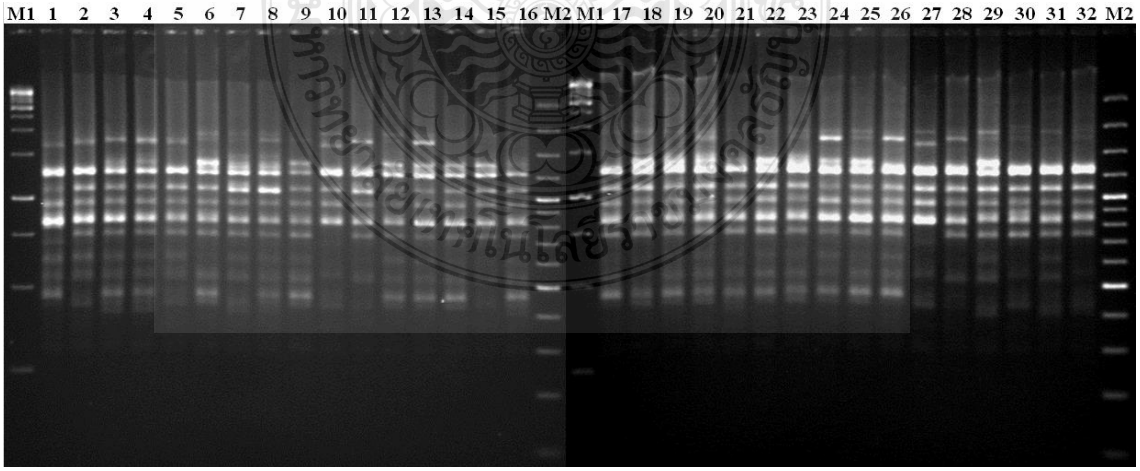
**Primer P6**




**Primer P7**

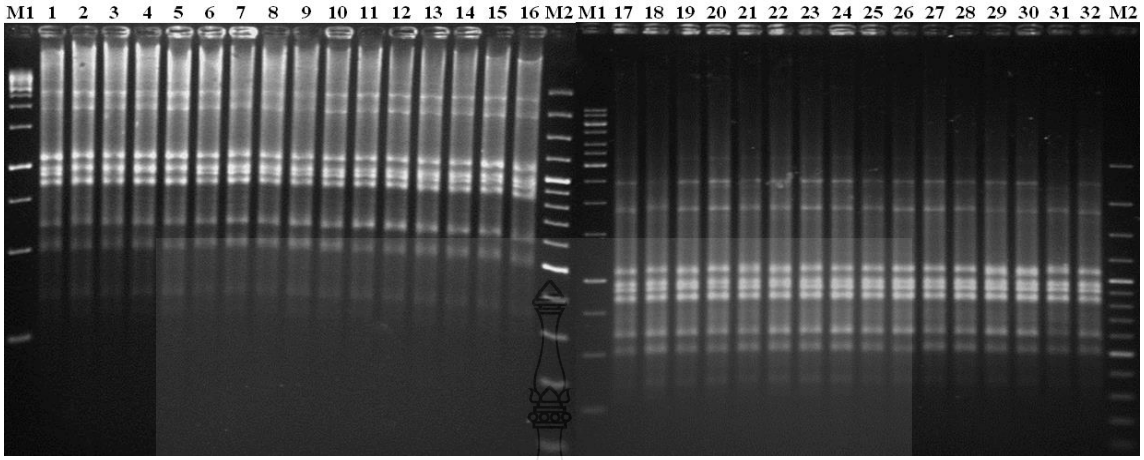



**Primer P8**

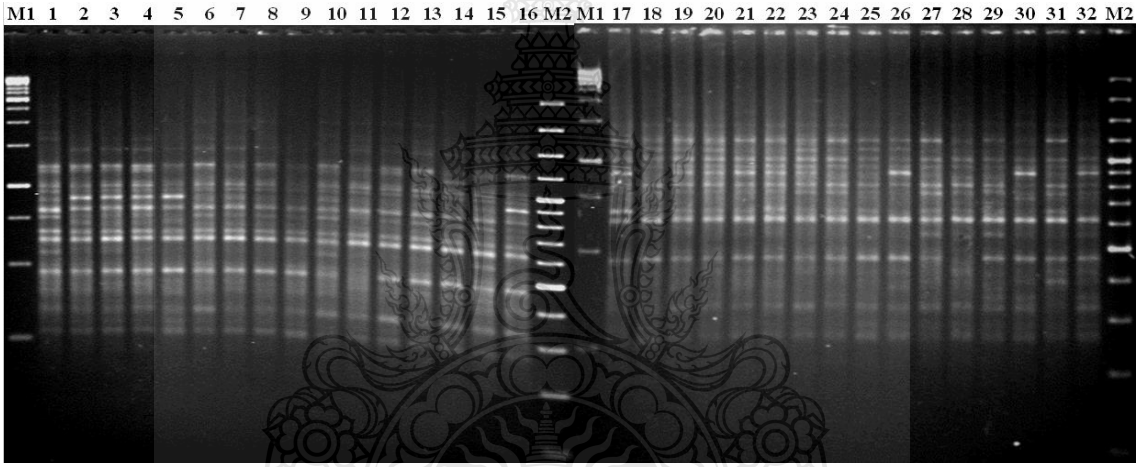



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

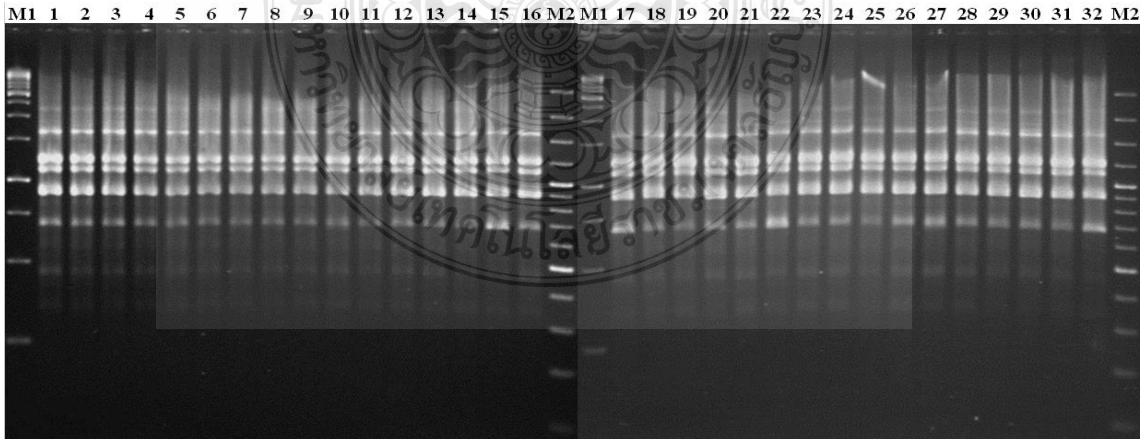
**Primer P9**




**Primer P10**

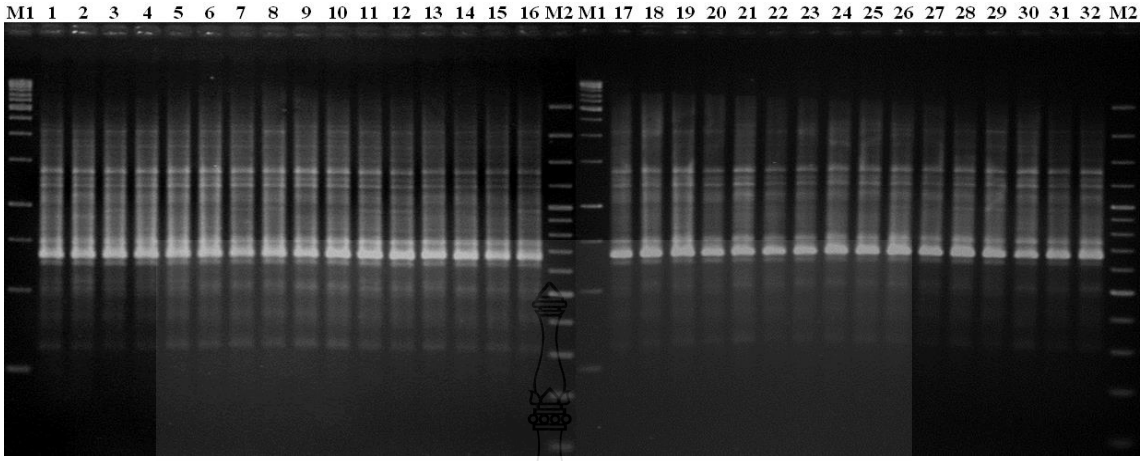



**Primer P11**

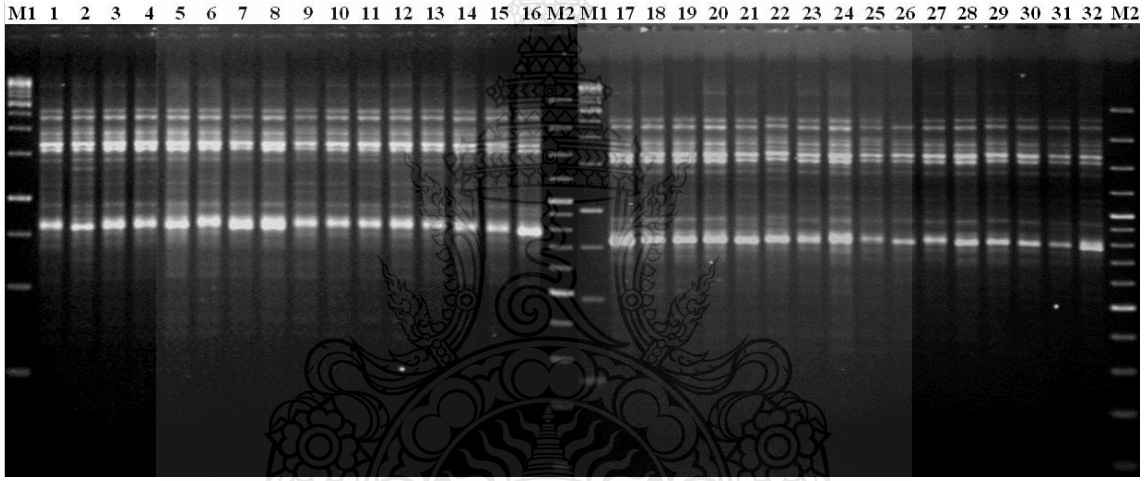



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

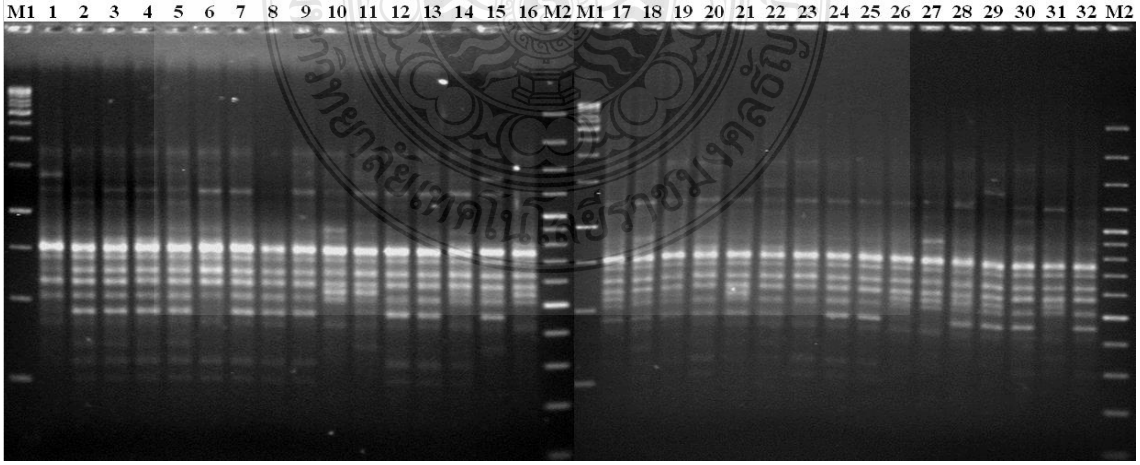
**Primer P12**




**Primer P13**

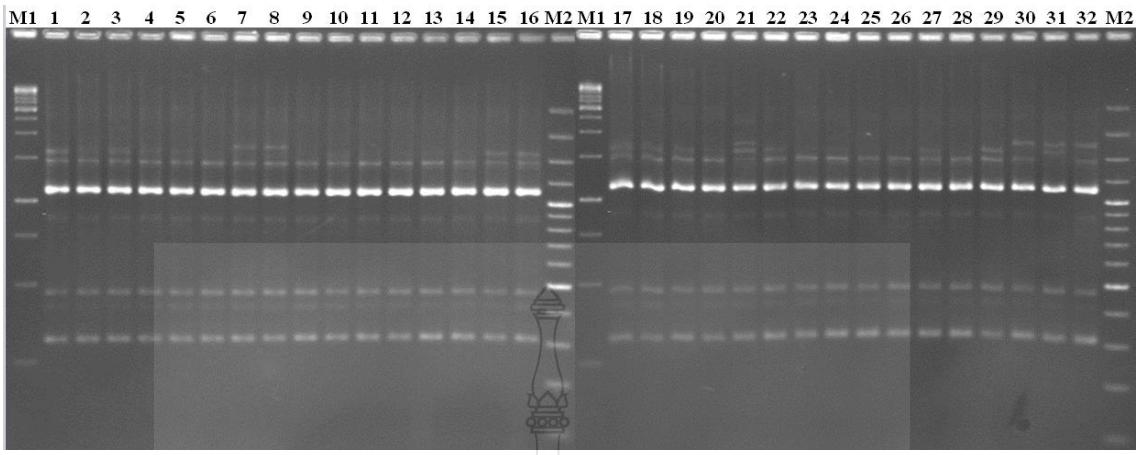



**Primer P14**

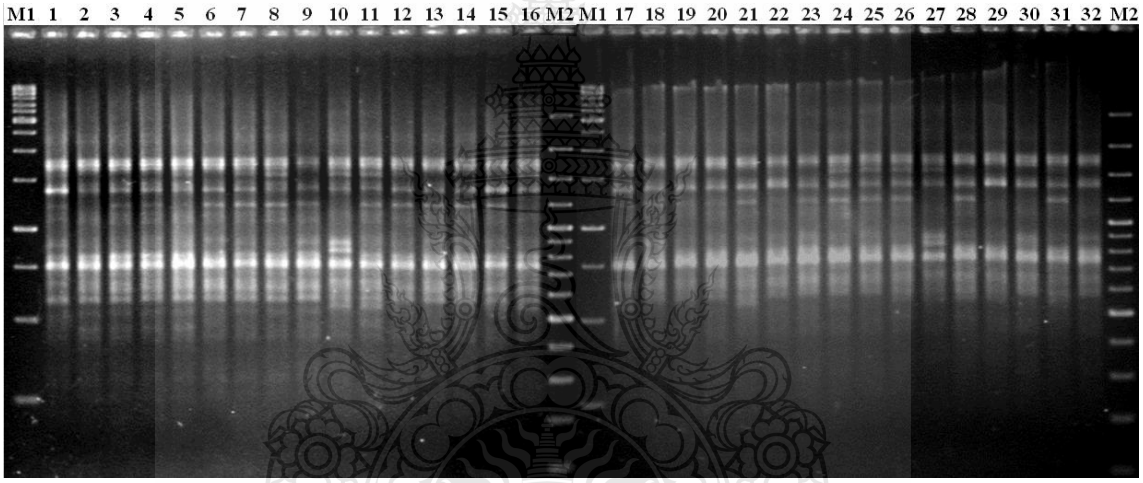



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

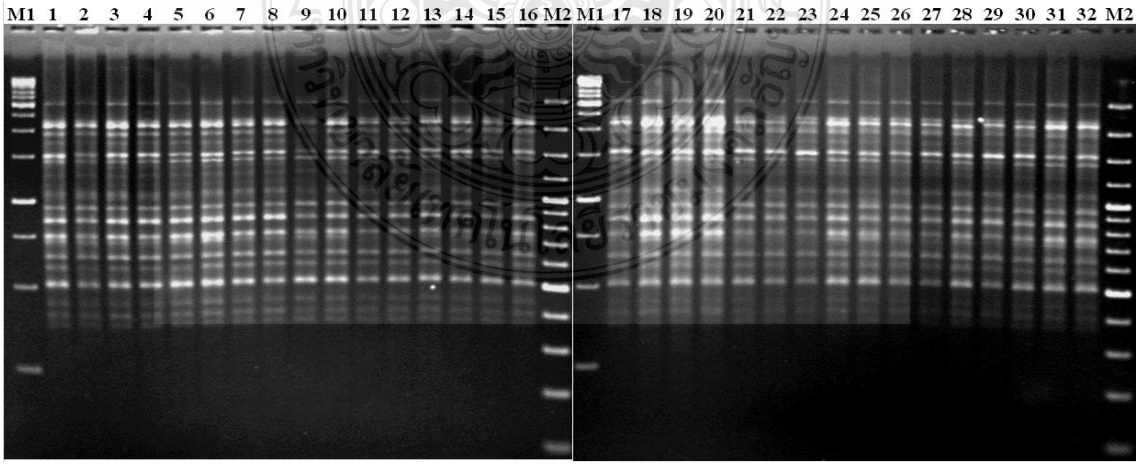
**Primer P15**




**Primer P16**

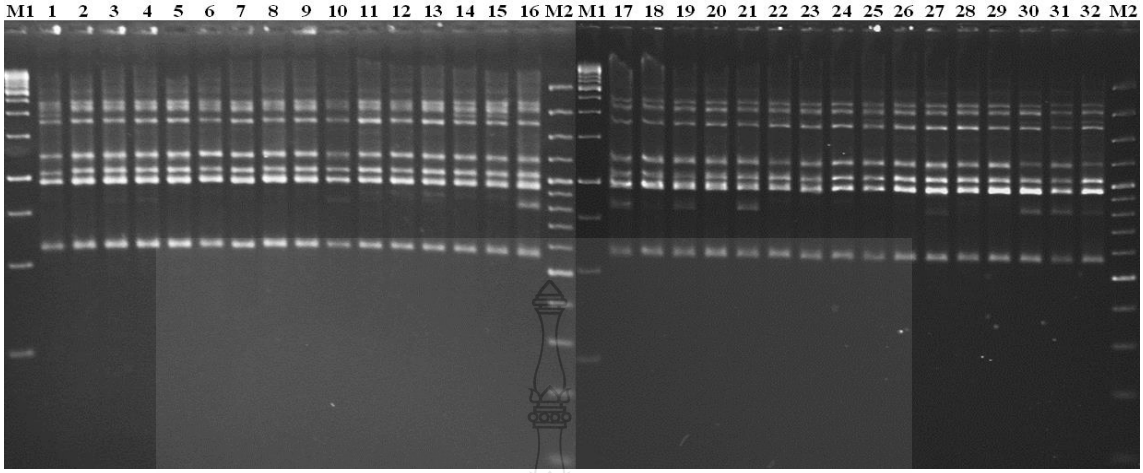



**Primer P17**

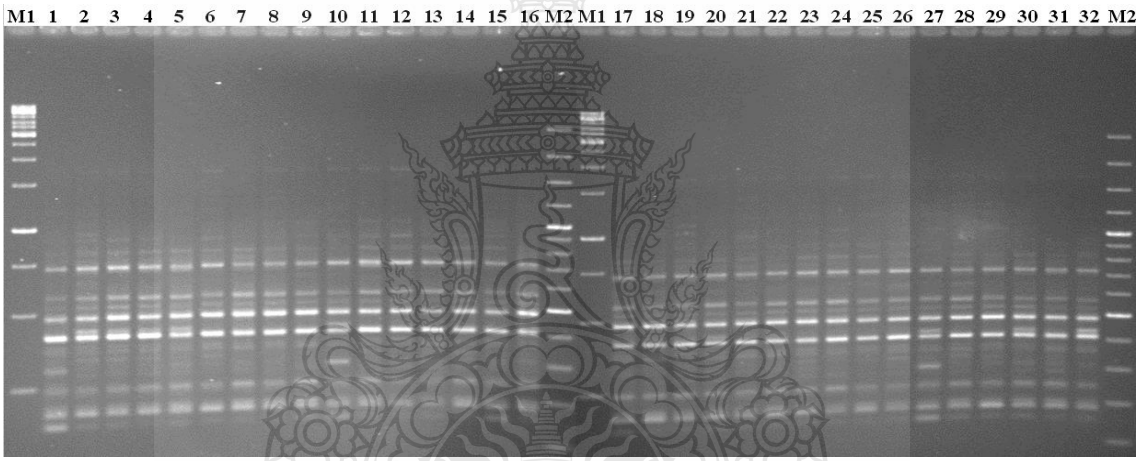



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

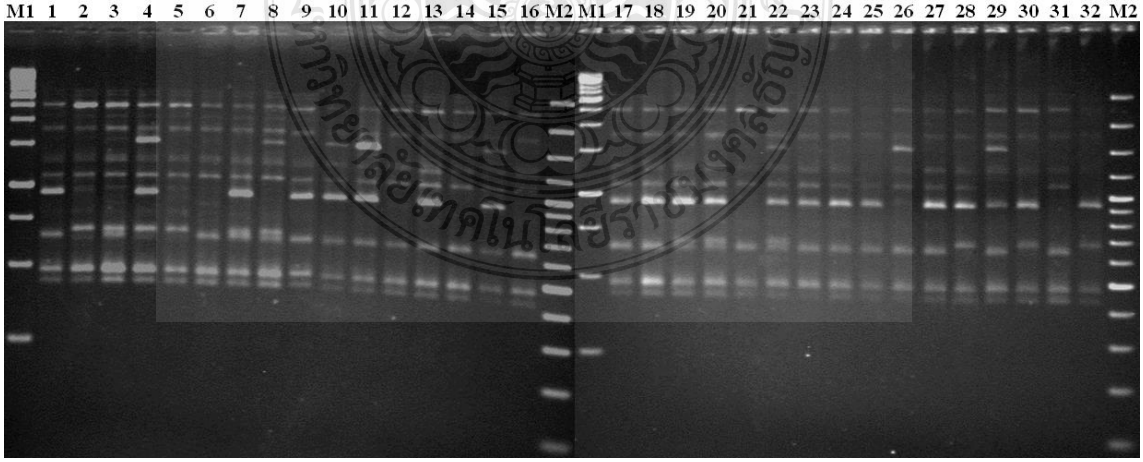
**Primer P18**




**Primer P19**

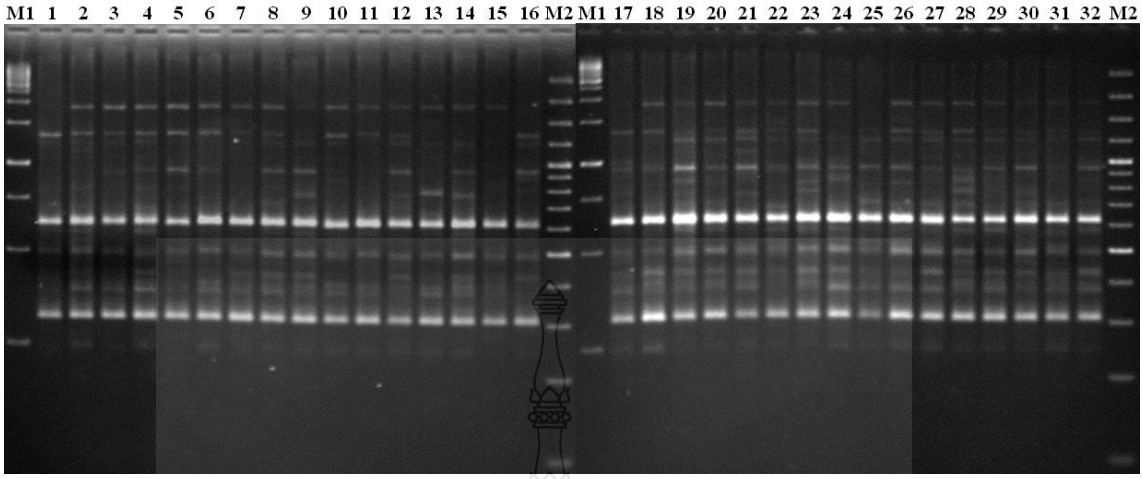



**Primer P20**

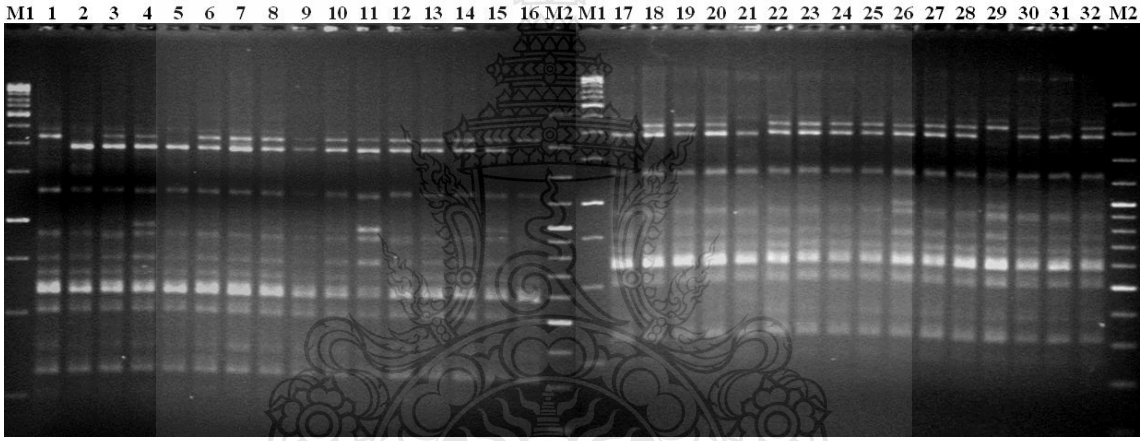



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

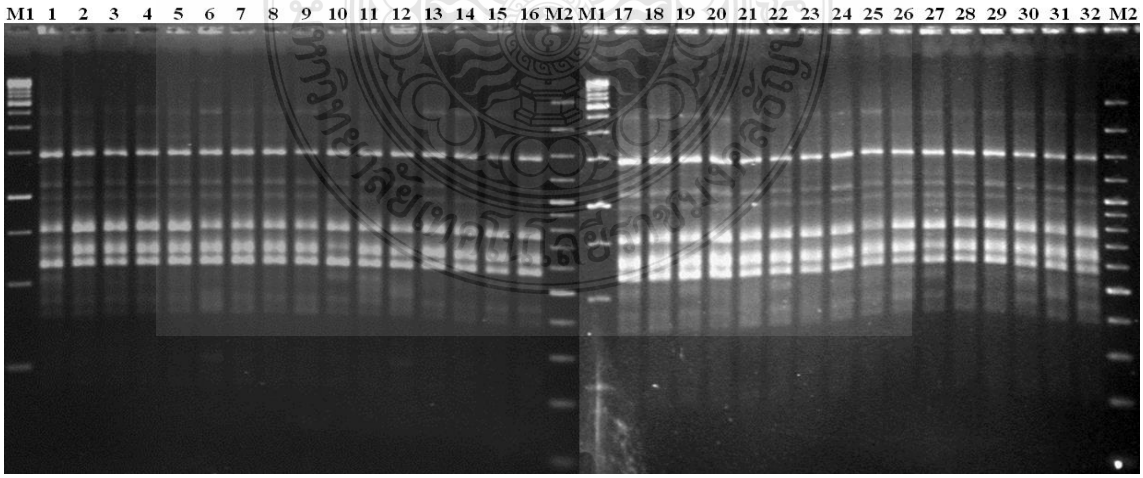
**Primer P21**




**Primer P22**

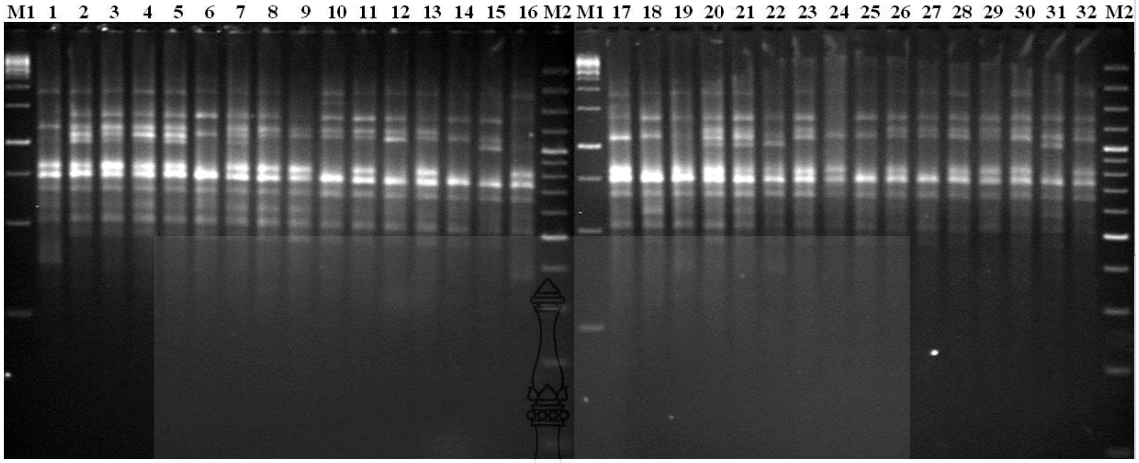



**Primer P23**

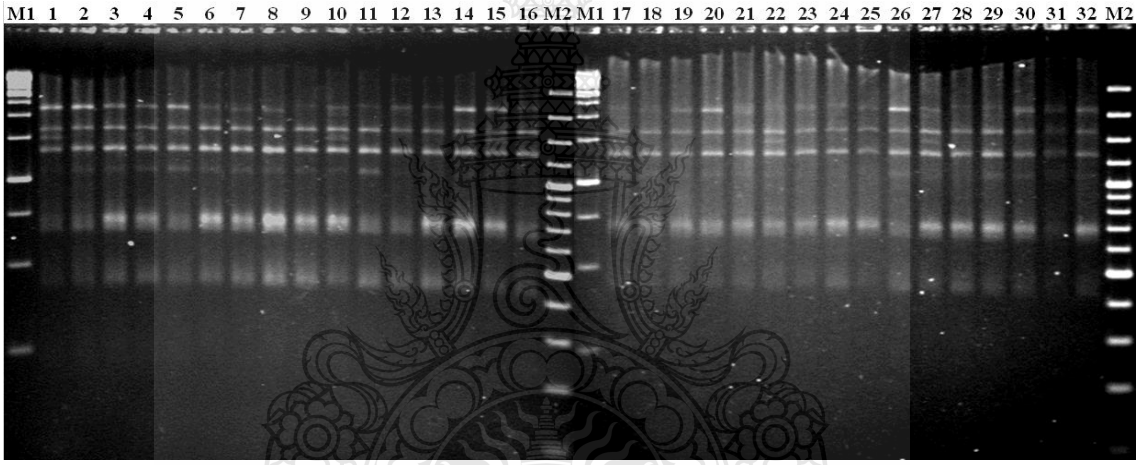



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

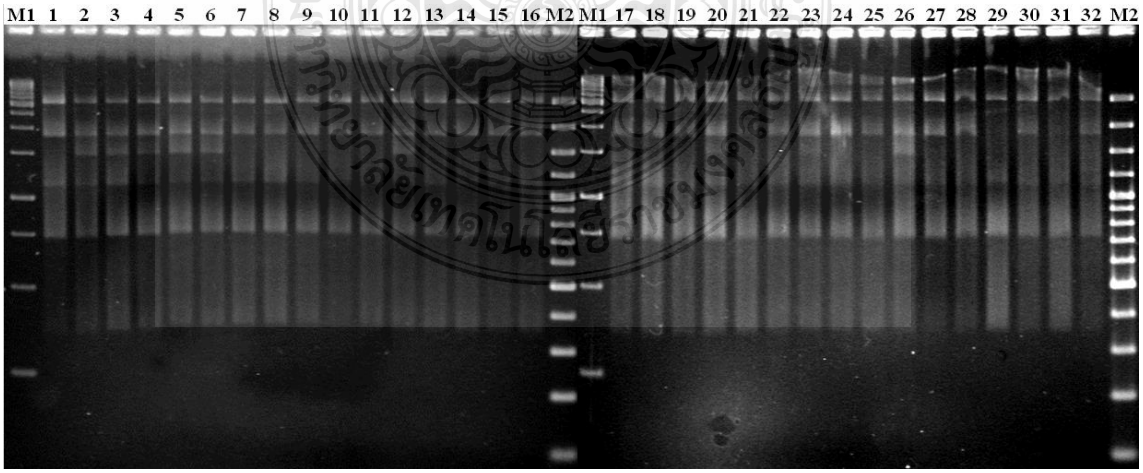
**Primer P24**




**Primer P25**

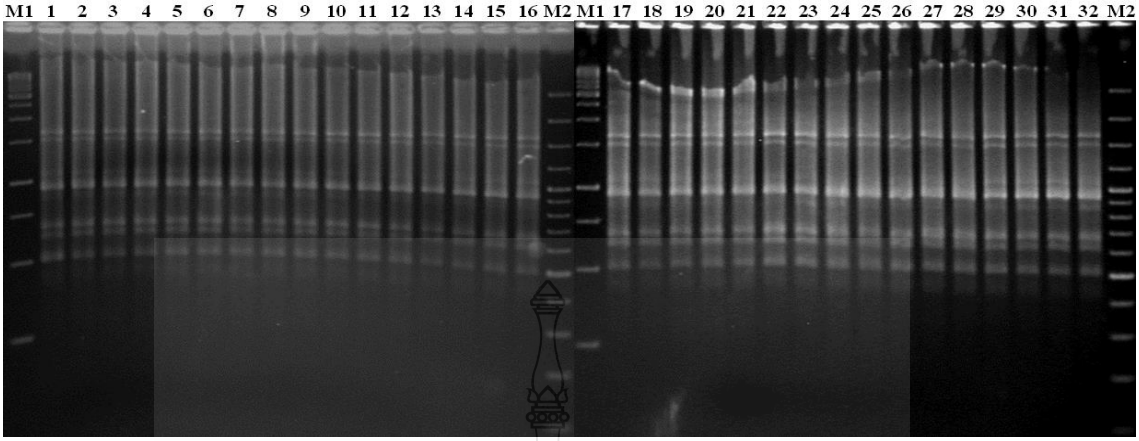



**Primer P26**

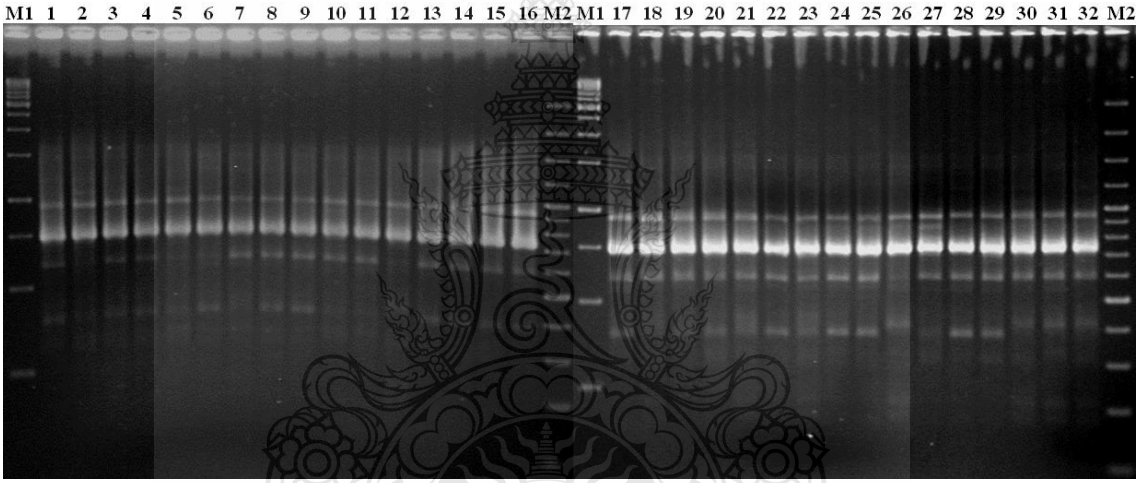



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

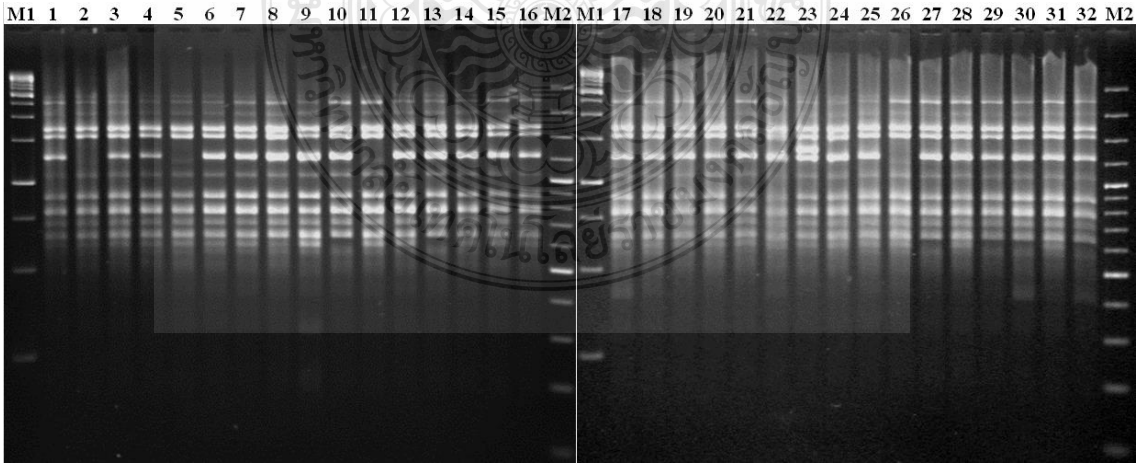
**Primer P27**




**Primer P28**

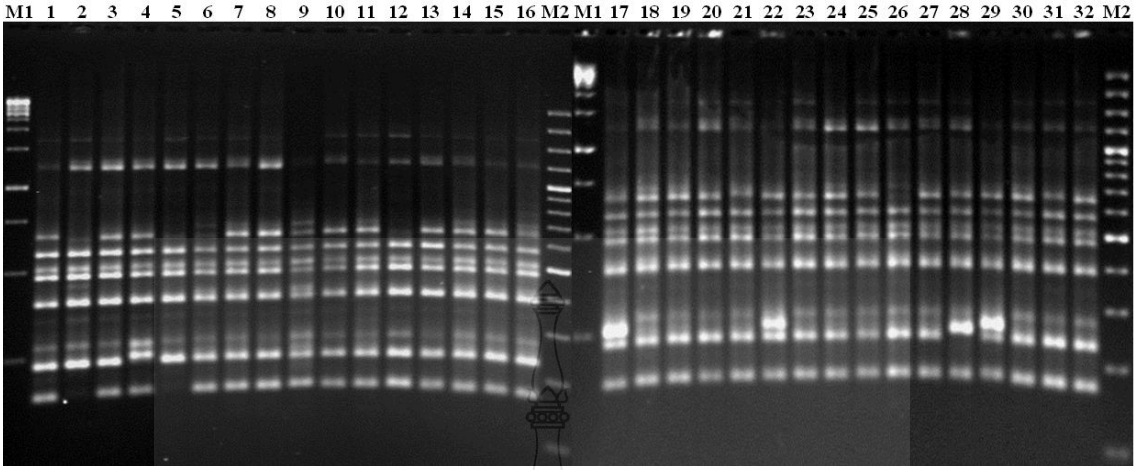



**Primer P29**

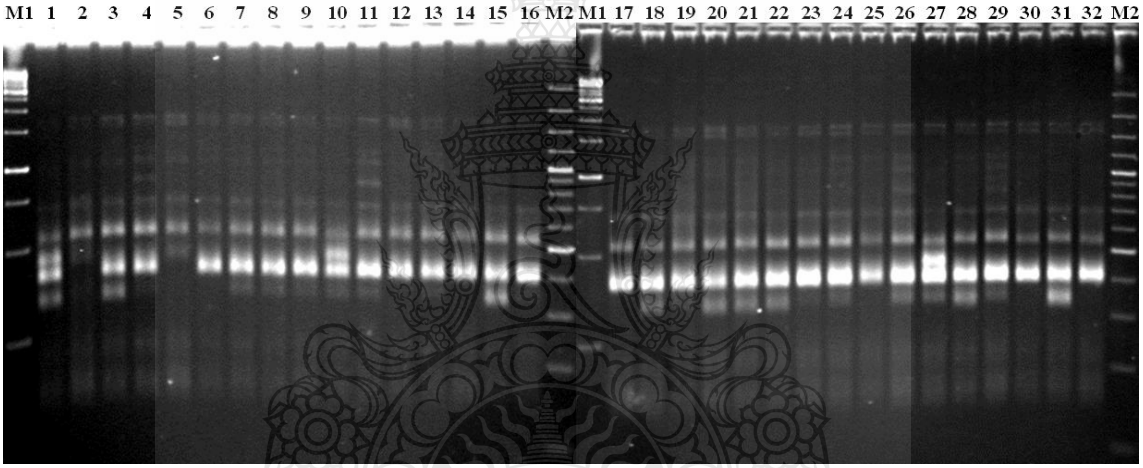



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

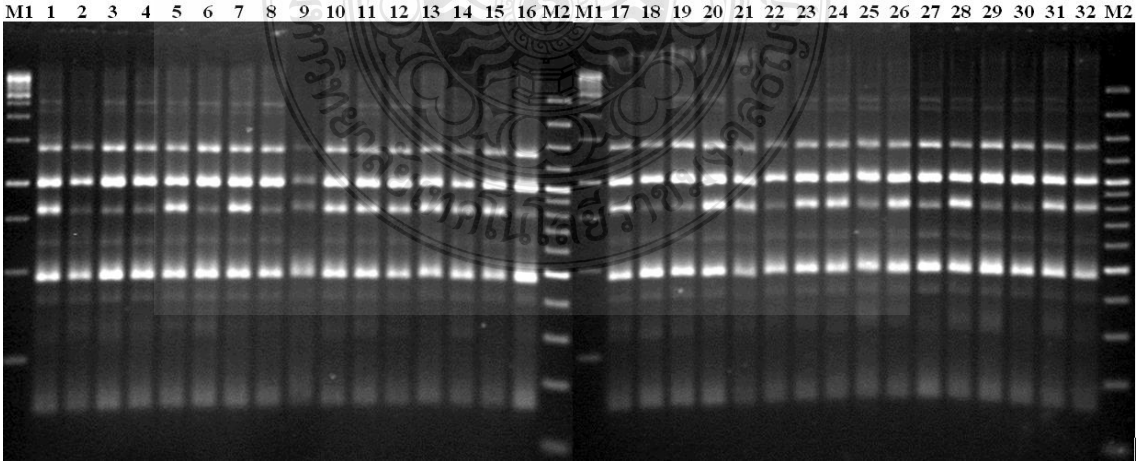
**Primer P30**




**Primer P31**

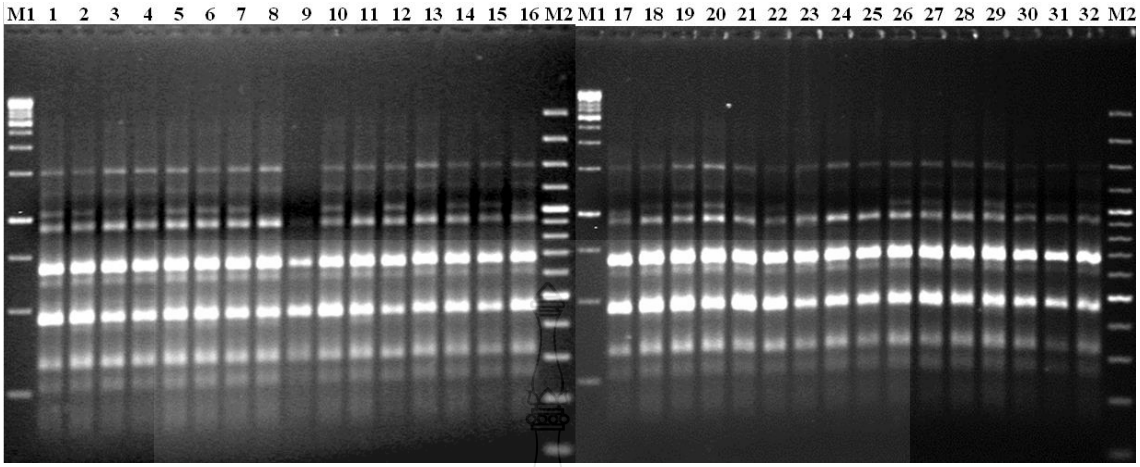



**Primer P32**

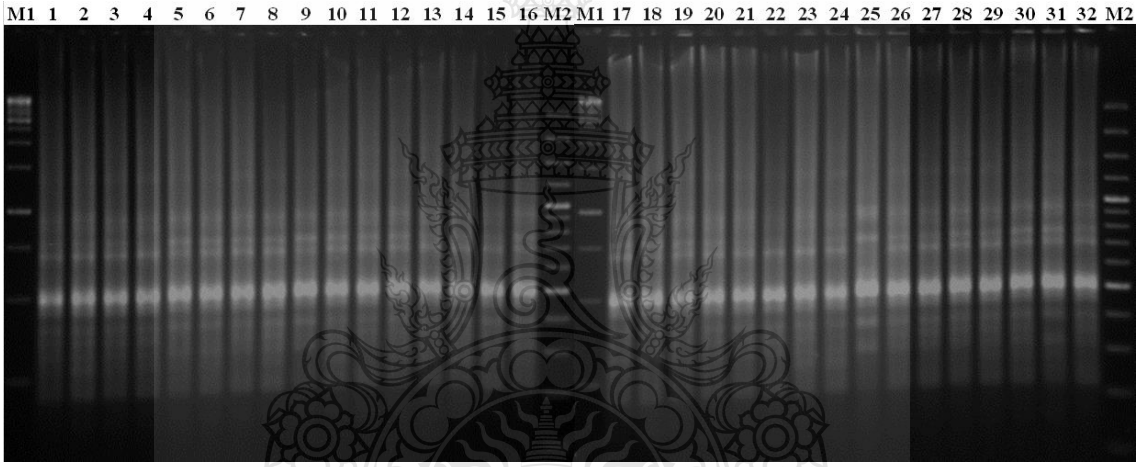



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

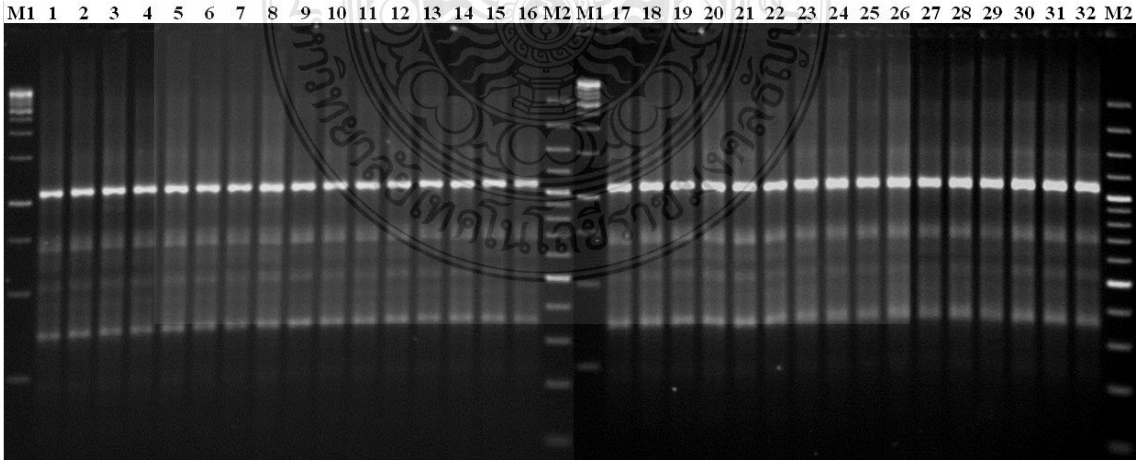
**Primer P33**




**Primer P34**

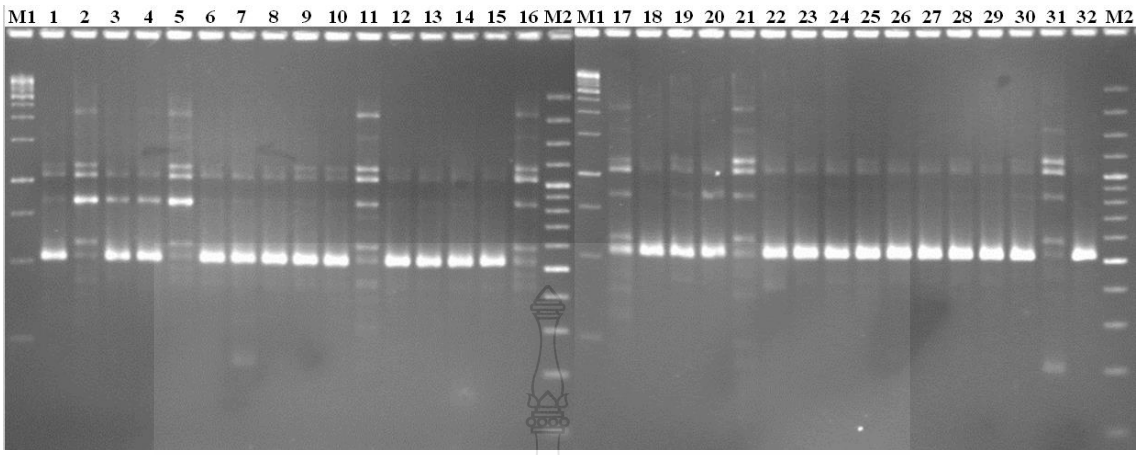



**Primer P35**

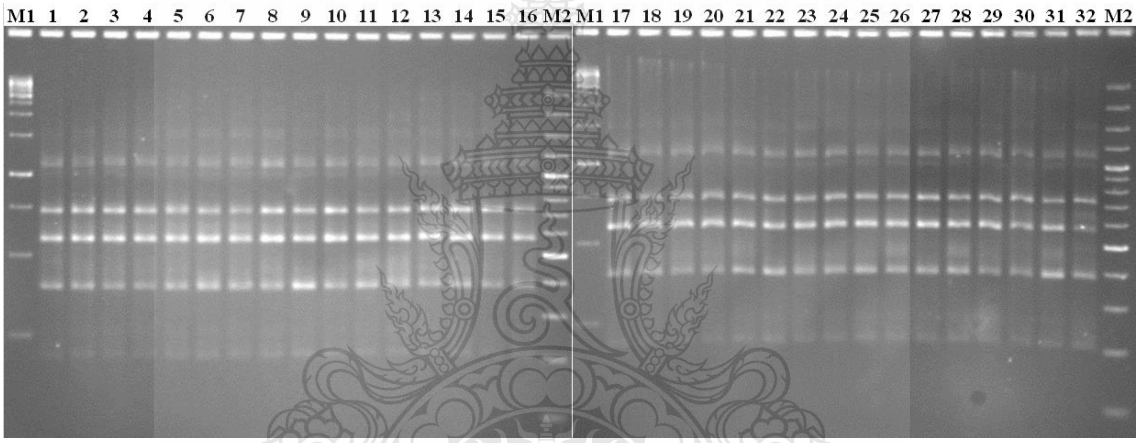



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

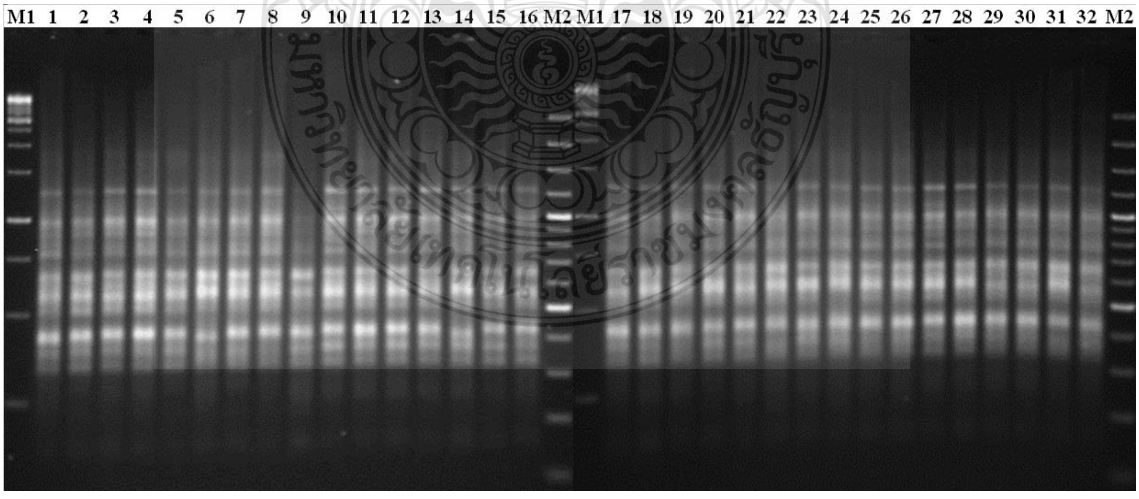
**Primer P36**




**Primer P37**

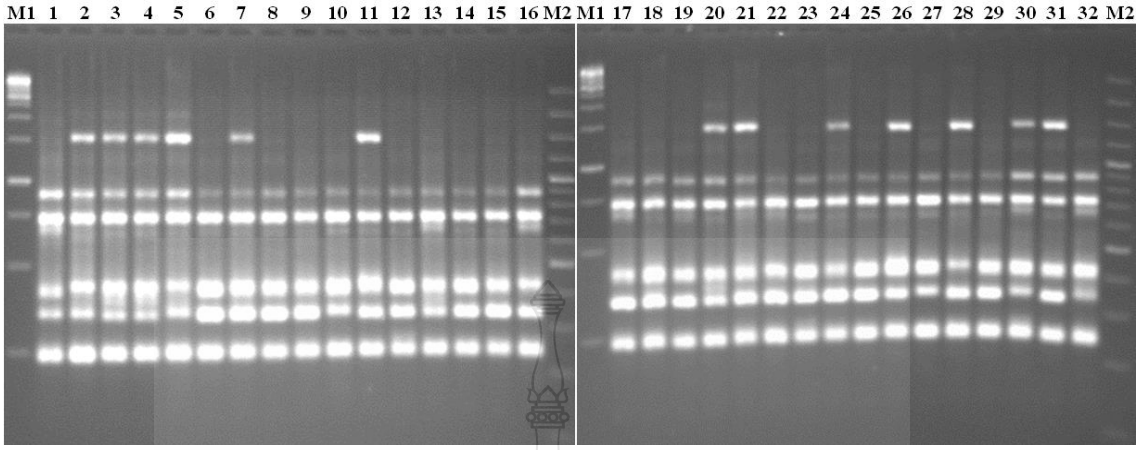



**Primer P38**

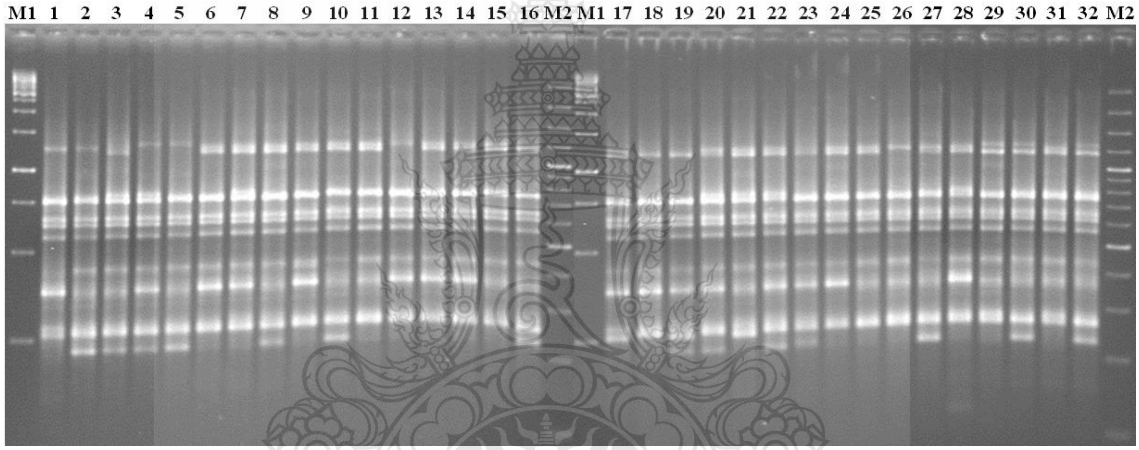



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

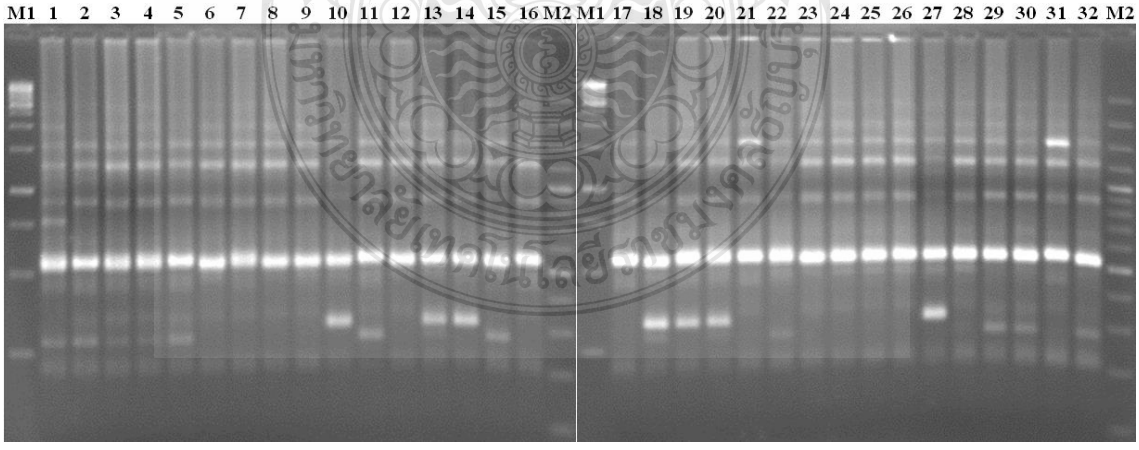
**Primer P39**




**Primer P40**

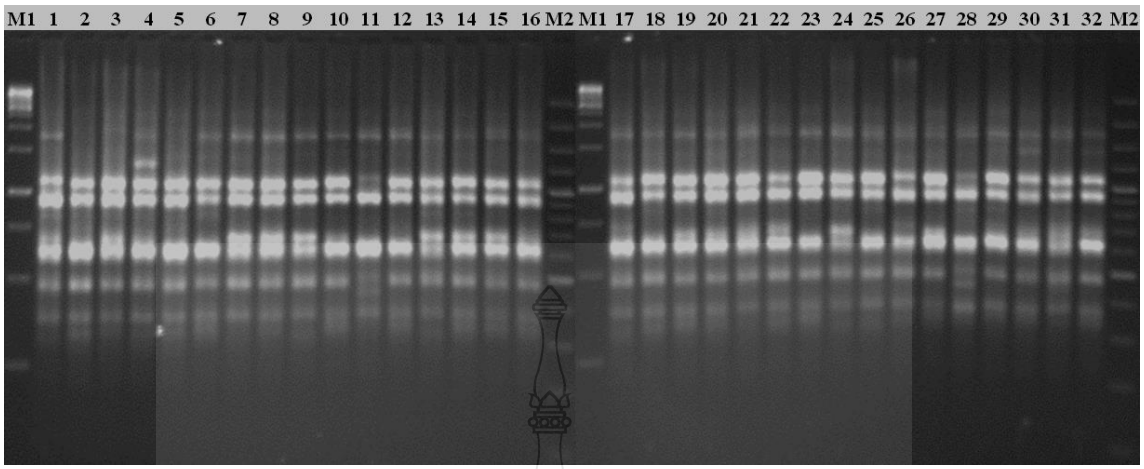



**Primer P41**

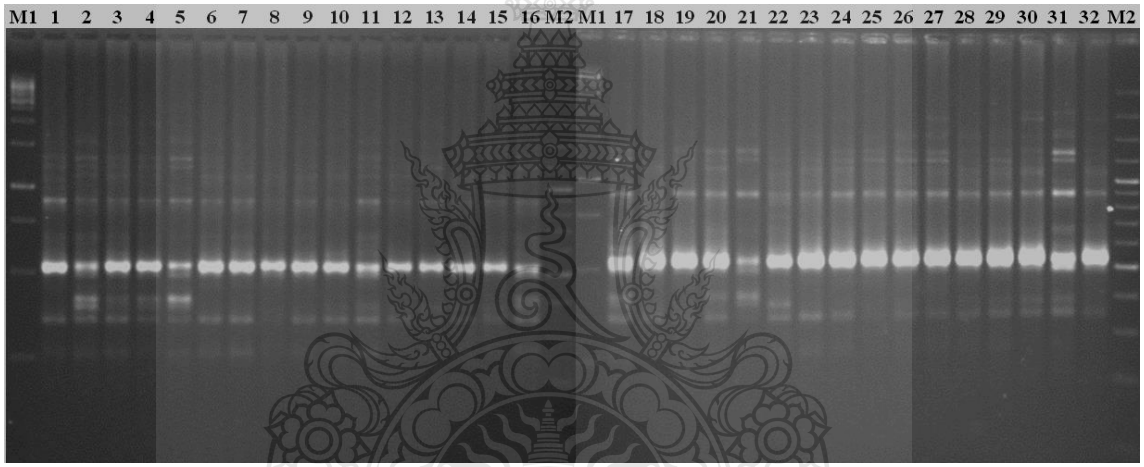



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

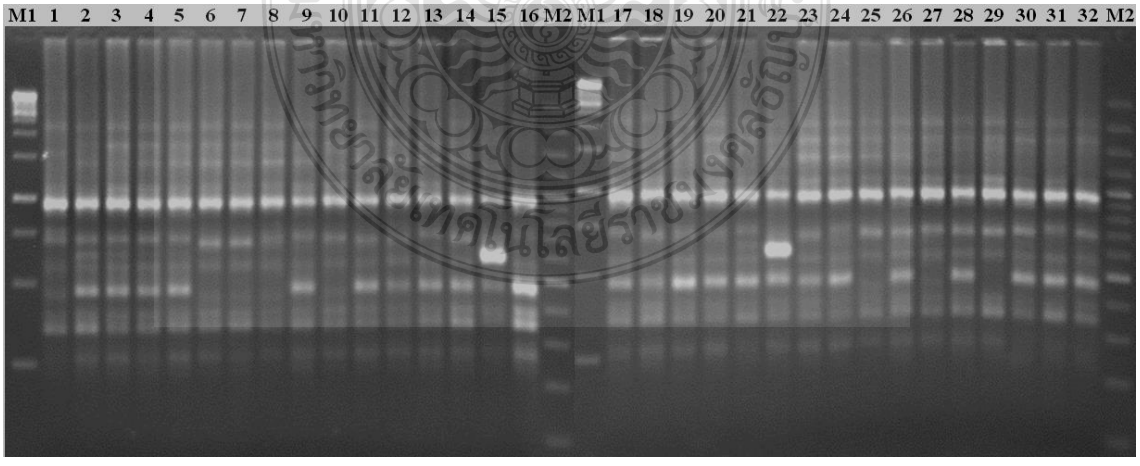
**Primer P42**




**Primer P43**

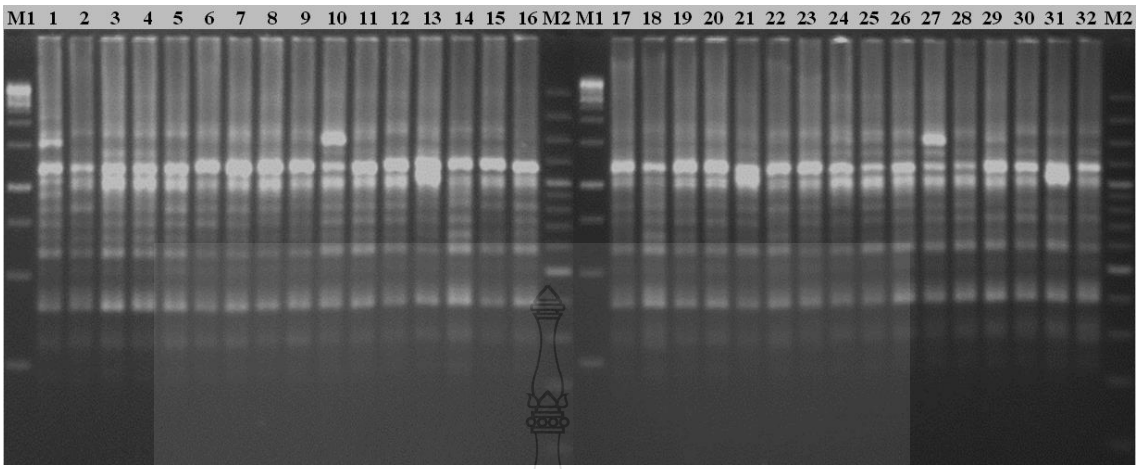



**Primer P44**

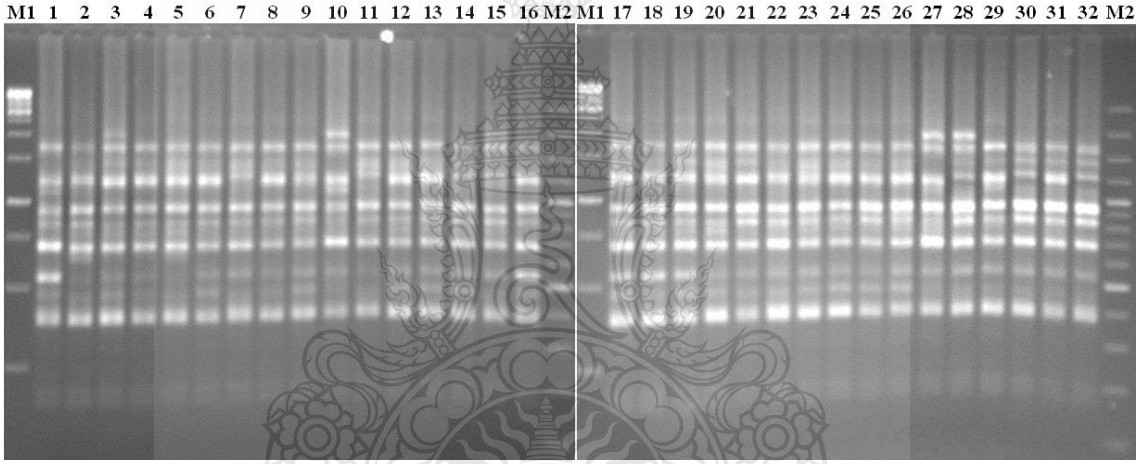



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

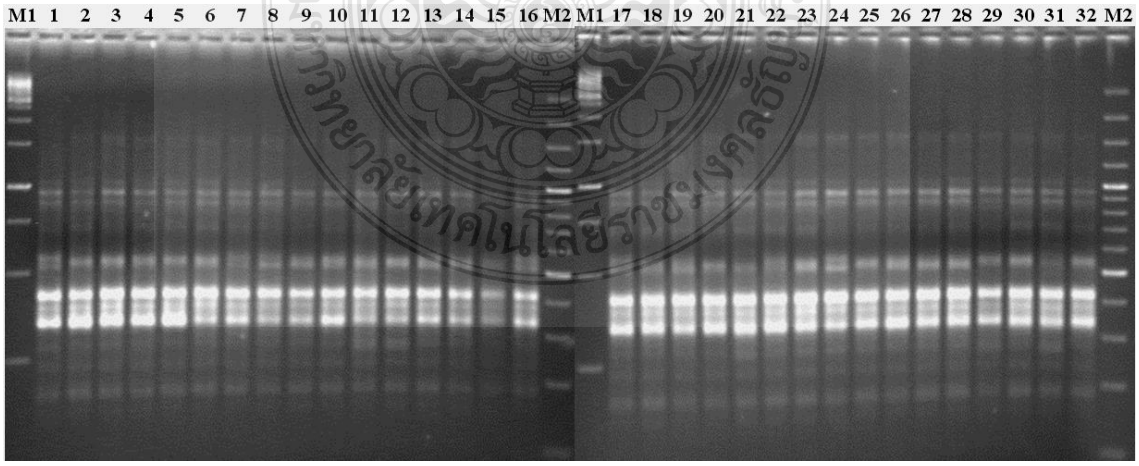
**Primer P45**




**Primer P46**

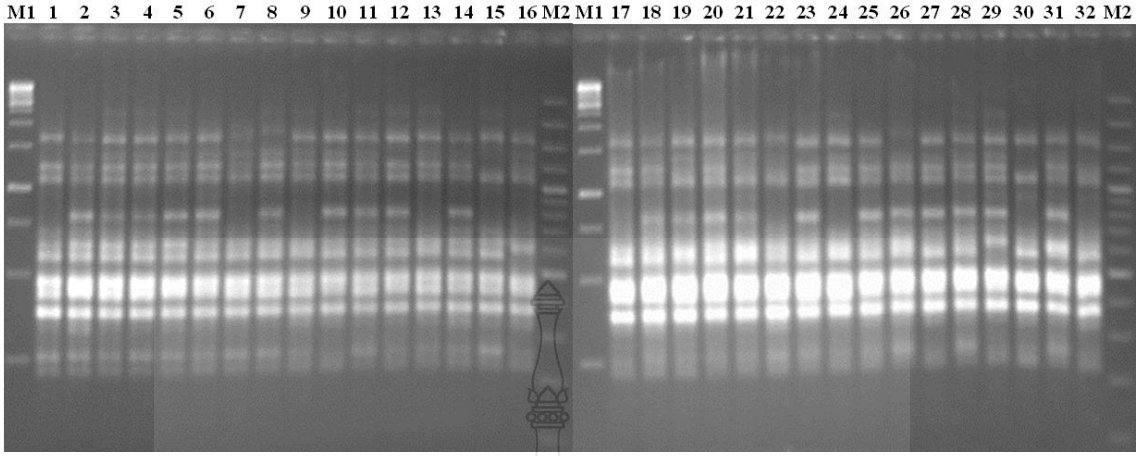



**Primer P47**

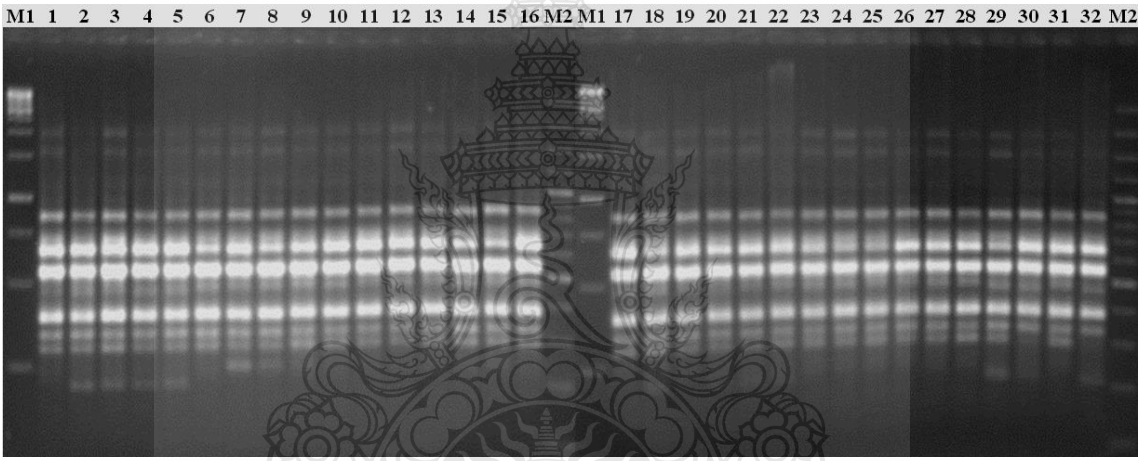



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

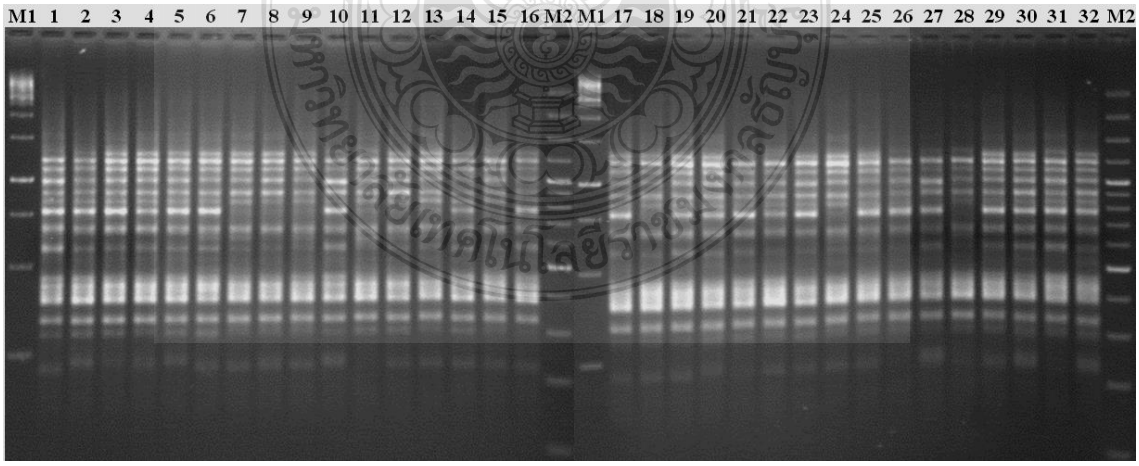
**Primer P48**




**Primer P49**

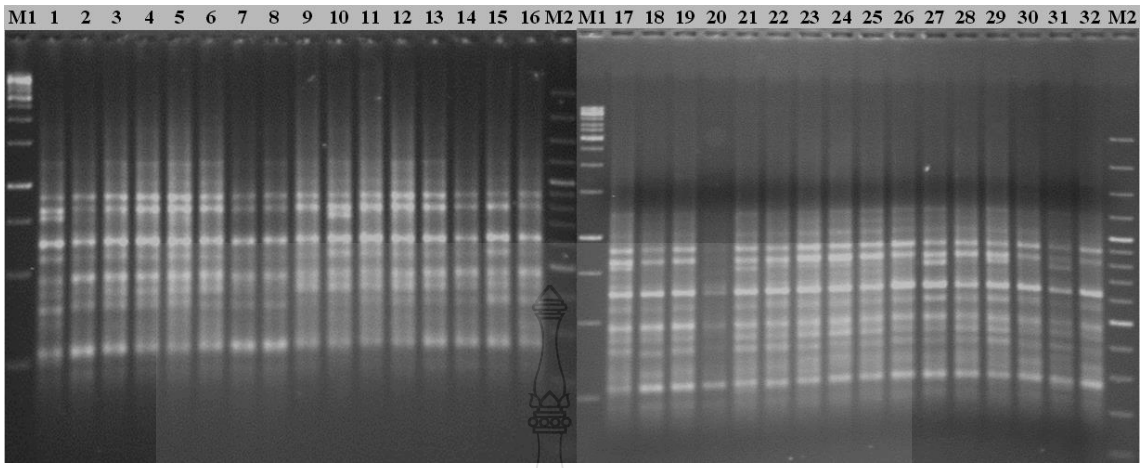



**Primer P50**

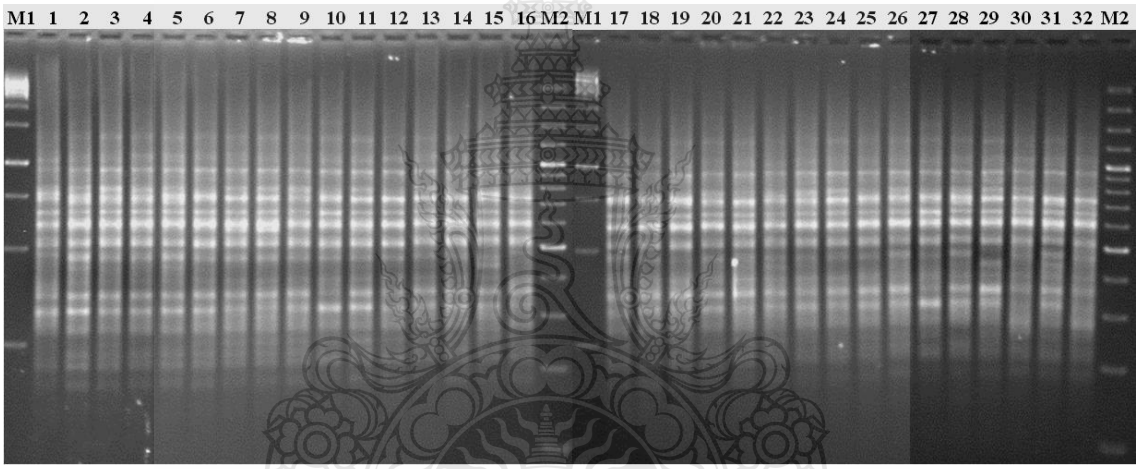



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

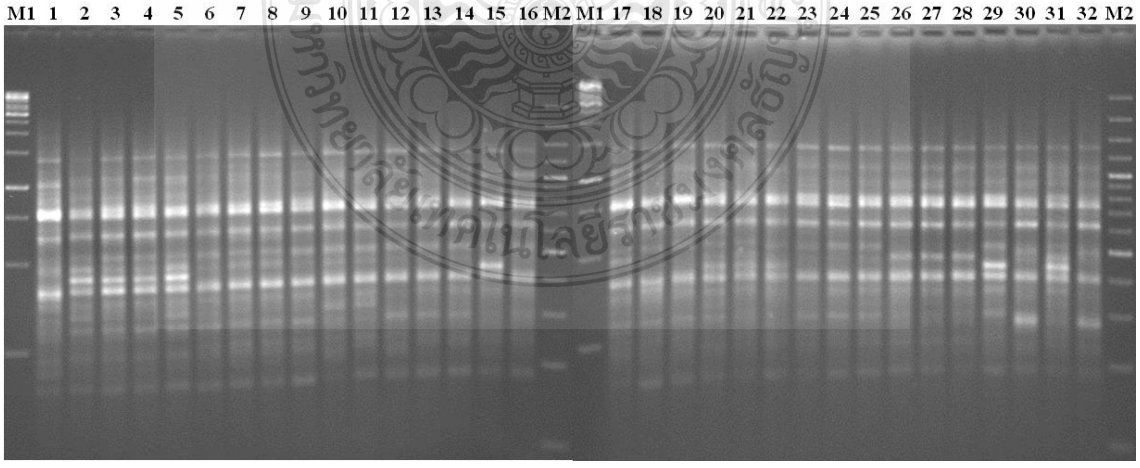
**Primer P51**




**Primer P52**

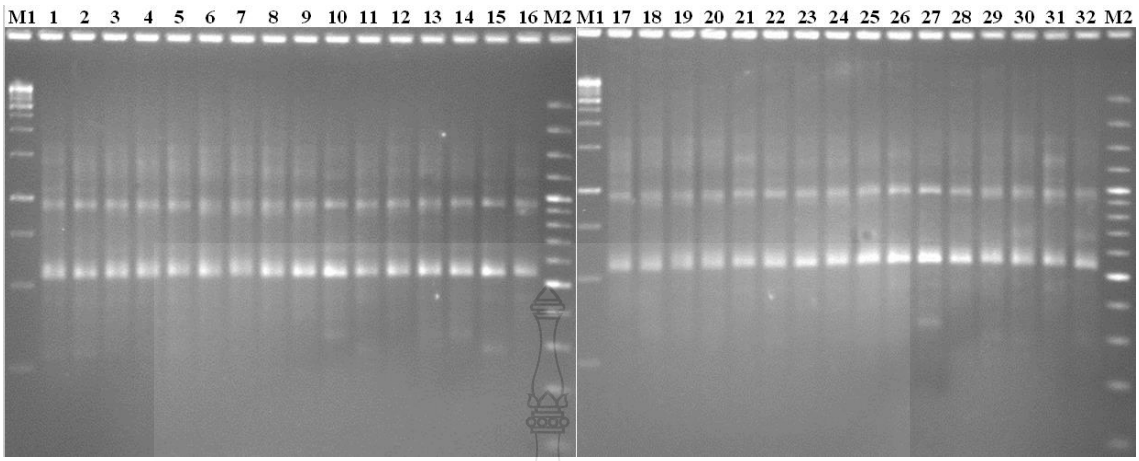



**Primer P53**

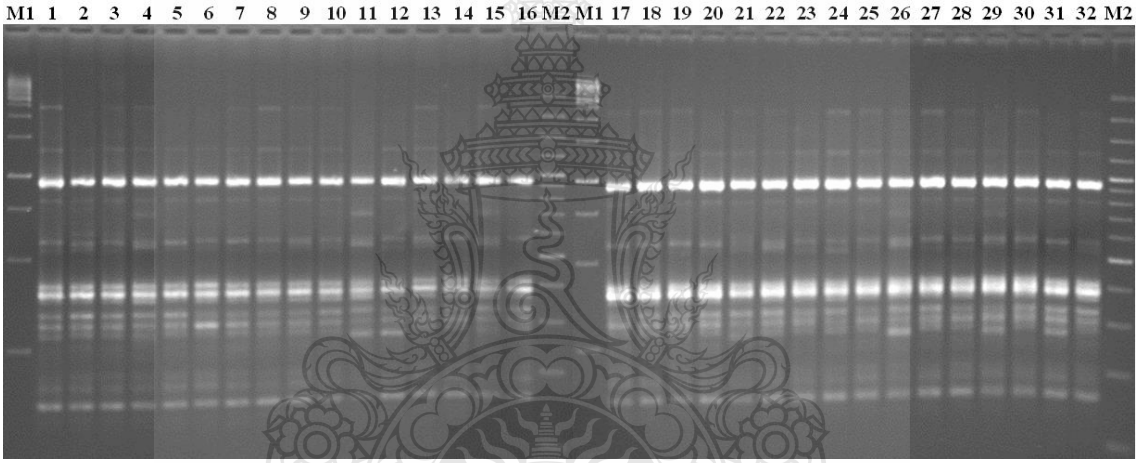



**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

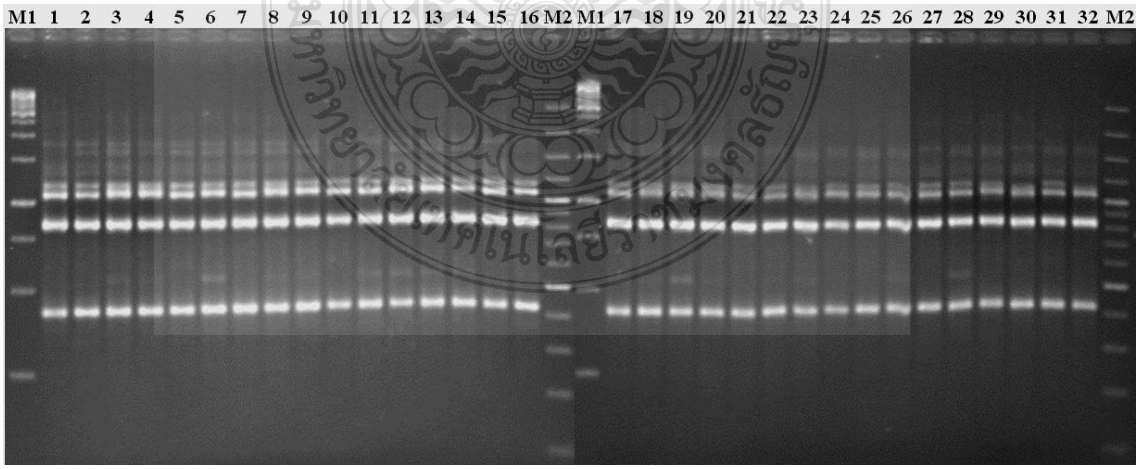
**Primer P54**




**Primer P55**

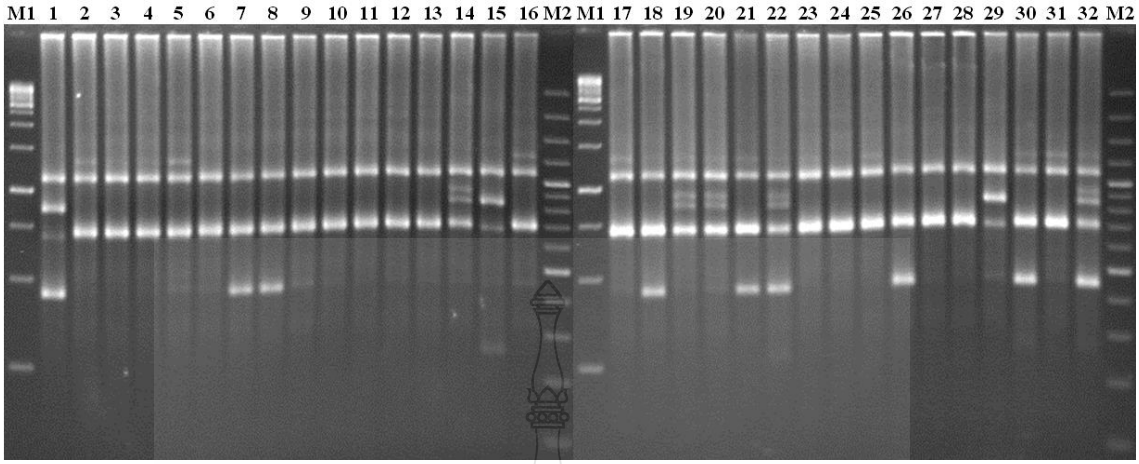



**Primer P506**




**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

**Primer P57**




**ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์

**ตารางผนวกที่ 1** ค่าสัญลักษณ์ตัวเลขจากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของมะละกอ 32 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 57 ไพรเมอร์ ช่อง 1-32 คือ (1) Florida, (2) HO, (3) HOSno.1, (4) HOSno.2, (5) HOSno.3, (6) KDDNs, (7) KDLS1, (8) KDLS2, (9) KD-Si, (10) KhonKaen 80, (11) KN(SR), (12) KNLS1, (13) LN, (14) MA, (15) MI, (16) Maradol, (17) MIR, (18) SEW58, (19) SK001, (20) SK002, (21) SK003, (22) SK004, (23) Taiwan, (24) Khaek Dum, (25) KhaekNuan, (26) Khrang, (27) ThaPhra 3, (28) Number 12, (29) Pak Chong, (30) Hybrid Australia, (31) Si Tong และ (32) Hawaii ตามลำดับ

**Primer P1**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,300 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 900 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 630 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 620 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 410 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 250 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |

**Primer P2**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,300 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 480 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 380 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P3**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,050 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 650 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 590 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 400 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |

**Primer P4**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,250 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 890 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 810 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

**Primer P7**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,700 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 1,600 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 1,050 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 800 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P8**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 1,900 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,800 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 1,700 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,300 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 730 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 700 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 570 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 540 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 400 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |

**Primer P9**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,500 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 910 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

**Primer P10**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,150 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 900 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |  | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 670 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 550 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P13**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,700 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,300 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 900 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 800 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 780 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

**Primer P14**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,250 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 900 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 530 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 450 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P16**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,750 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 1,650 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 1,600 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,550 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 1,380 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 1,200 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 750 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 700 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 610 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 540 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |

**Primer P18**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,800 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 810 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |

**Primer P219**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 400 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 390 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P20**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,550 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 1,100 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 950 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 690 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 660 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |

**Primer P21**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,900 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,330 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,300 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,250 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 950 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 900 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 890 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 880 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 800 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 780 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 470 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 430 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P22**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,200 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 1,900 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 950 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

**Primer P23**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 900 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 480 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 440 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |

**Primer P24**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,150 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,100 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 1,050 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 1,000 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 800 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 480 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |

**Primer P25**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,000 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P26**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,800 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 1,500 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**Primer P28**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 900 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 420 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 380 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |

**Primer P29**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,350 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,250 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 600 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P30**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,250 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 650 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 640 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 450 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 290 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 270 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 250 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 240 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 180 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

**Primer P31**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 450 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 400 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 350 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 320 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |

**Primer P33**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,350 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 1,050 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P34**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 700 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

**Primer P36**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,200 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,550 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 1,150 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,050 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 850 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 780 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

**Primer P38**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 850 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 600 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 500 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P39**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,500 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 680 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 650 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 430 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 410 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 390 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 340 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 330 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |

**Primer P40**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,250 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 1,200 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 1,150 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 800 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 260 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 255 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 230 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P41**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 750 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 530 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 510 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 450 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 310 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 290 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |

**Primer P42**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,450 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 1,200 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 700 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 680 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 500 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 480 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 450 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 330 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P43**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,100 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 540 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 410 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 390 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |

**Primer P44**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 750 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |  | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 700 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 680 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 610 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 600 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 550 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 480 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 460 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 440 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 260 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P45**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,350 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 1,000 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 900 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**Primer P46**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,000 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,500 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,400 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,250 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,200 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 1,100 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 750 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 700 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**Primer P47**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 560 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 540 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 520 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P48**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,700 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,600 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1,350 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 1,200 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 800 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 550 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |

**Primer P49**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 490 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 485 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 300 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 250 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 200 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P50**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,400 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 1,350 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 1,000 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 980 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 780 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 600 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 240 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 220 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |

**Primer P51**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 770 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 760 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

**Primer P52**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 800 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 750 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 720 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 490 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 480 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 450 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P53**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 800 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 520 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 500 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 460 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 430 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 380 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 300 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 280 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |

**Primer P54**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 680 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 320 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**Primer P55**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 700 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 600 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 540 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 530 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 280 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 270 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

**Primer P56**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,650 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 1,150 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 520 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**Primer P57**

| Papaya No. / Size of band | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,250 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 910 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 840 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 460 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 170 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |

# ภาคผนวก ค

# ผลงานที่ตีพิมพ์เผยแพร่

# การใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะละกอ

# The use of ISSR markers for genetic diversity of papaya cultivars

สุทวัฒน์ สินธีรโรจน์[1], ปิยะวดี เจริญวัฒนะ[1*], คำรพ รัตนสุต[2] และ อรุโณทัย ซาววา[3]

**Suttawat Sinthirarot[1], Piyavadee Charoenwattana[1*], Kumrop Ratanasut[2] and Aroonothai Sawwa[3]**

**บทคัดย่อ**: การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ จากการทดสอบไพรเมอร์ 60 สายไพร์เมอร์ พบว่า 57 ไพร์เมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ จึงได้นำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 612 แถบ มีแถบที่แสดงความแตกต่างกัน จำนวน 240 แถบ (39%) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาด 160-3,000 คู่เบส ค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.47 ถึง 0.98 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยใช้ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) สามารถจัดมะละกอออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งกำเนิดของมะละกอ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สามารถช่วยในการประเมินและปรับปรุงพันธุ์มะละกอได้ต่อไป

**คำสำคัญ**: ไอเอสเอสอาร์, มะละกอ, ความหลากหลายทางพันธุกรรม

**ABSTRACT**: Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers were used for genetic diversity analysis of 32 papaya cultivars (*Carica papaya* L). Fifty-seven selected ISSR primers amplified 612 bands ranging in size from 160-3,000 bp and 240 bands were polymorphic (39%). The similarity index ranged from 0.47 to 0.98. Cluster analysis using unweighted pair group method arithmetic mean (UPGMA) method based on genetic similarity indexes indicated that the 32 cultivars were clustered into three major groups. These clusters are in accordance with their geographical locations. The ISSR marker system is useful for identification and analysis of genetic diversity of papaya cultivars, and also for papaya breeding in future.

**Keywords**: ISSR markers, papaya, genetic diversity

[1] สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
Division of Crop Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi

[2] ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
Department of AgriculturalScience, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment,Naresuan University

[3] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงกระเกษตรและสหกรณ์
Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives

* Corresponding author: piyavadee55@gmail.com

## บทนำ

มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นไม้ผลเขตร้อนชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางอาหารสูง เป็นพืชที่ปลูกง่าย เจริญเติบโตเร็วและให้ผลผลิตตลอดทั้งปี ในประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมะละกอในเชิงการค้าขนาดใหญ่ของประเทศอยู่ในภาคต่างๆ ทั่วประเทศ ซึ่งการผลิตมะละกอมีทั้งเพื่อการบริโภคภายในประเทศ และเพื่อการส่งออก สามารถทำรายได้ปีละหลายล้านบาท ผลผลิตมะละกอเฉลี่ยต่อปีมีจำนวนทั้งสิ้น 134,443 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 2,633 กิโลกรัม/ไร่ โดยประเทศไทยได้ส่งออกมะละกอสดจำนวน 1,600 ตัน คิดเป็นมูลค่า 19.40 ล้านบาท และมะละกอบรรจุภาชนะอัดลม 2,348 ตัน มูลค่าการส่งออก 76.10 ล้านบาท (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2550) นอกจากนั้นยังมีการผลิตมะละกอเพื่อกรีดน้ำยางไปใช้ในทางอุตสาหกรรม (พิภพ และสิริรัตน์, 2552) และมีการศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันเมล็ดมะละกอเพื่อพัฒนาเป็นน้ำมันพืชเพื่อการบริโภคได้ (ปิยวดี, 2551) มะละกอจึงกลายเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีผู้นิยมปลูกกันมากขึ้น มีการพัฒนาสายพันธุ์ และ การสร้างพันธุ์ลูกผสมเพื่อให้ได้พันธุ์มะละกอที่มีคุณภาพ สำหรับมะละกอพันธุ์ที่นิยมปลูกในปัจจุบันมีความหลากหลายของสายพันธุ์ การจำแนกแหล่งที่มาและความเกี่ยวข้องกันทางพันธุกรรมค่อนข้างยาก บางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม และมีการตั้งชื่อพันธุ์มะละกอเป็นพันธุ์ใหม่ไปเรื่อยๆ ตามถิ่นที่ปลูกหรือตามลักษณะที่เปลี่ยนไป ทำให้เกิดความสับสนในการเรียกชื่อพันธุ์ การซื้อเมล็ดพันธุ์ ตลอดจนการผลิตเมล็ดพันธุ์ในอนาคต ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพผลผลิตของมะละกอที่ไม่ได้มาตรฐานตรงตามพันธุ์ (Janthasri *et al*., 2007)

การนำเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาและบันทึกข้อมูลพันธุกรรมของมะละกอ เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการจัดจำแนกสายพันธุ์มะละกอให้มีความถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น ในประเทศไทยได้มีการนำเอาเครื่องหมาย เอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphisms) มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ (Janthasri *et al*., 2007) แต่เนื่องจากวิธีดังกล่าวมีข้อเสียคือ ค่าใช่จ่ายสูง วิธีการใช้ค่อนข้างซับซ้อน และไม่เหมาะสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่าง หรือเหมือนกันมากๆ (สุรินทร์, 2545) นอกจากนี้มีการนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ช่วยในการคัดเลือกเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ (Oliveira *et al*., 2010) การใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์ Caricaceae และการจำแนกเพศของมะละกอ (Costa *et al*., 2011) และการประเมินค่า genetic distance ในมะละกอผสมกลับรุ่นลูก (Ramos *et al*., 2012) ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาโดยการใช้เครื่องหมายไอ เอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeats) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสในจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่จะศึกษา จึงไม่มีข้อจำกัดในการใช้งาน (Godwin *et al*., 2001) มีความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) เกิดความแตกต่าง (polymorphism) สูง ใช้เวลาน้อย วิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน (อรวรรณ, 2547) ข้อมูลเชื่อถือได้ จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกหมวดหมู่มะละกอจำนวน 32 สายพันธุ์ ที่รวบรวมไว้ในศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษโดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์มะละกอต่อไป

## วิธีการทดลอง

### ตัวอย่างพืช

พันธุ์มะละกอจากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ จำนวน 32 พันธุ์ดังนี้ Forida, HO, HOSno.1, HOSno.2, HOSno.3, KDDNs, KDLS1, KDLS2, KD-Si, KK80, KN(SR), KNLS1, LN, MA, MI, Maradol, MIR, SEW58, SK001, SK002, SK003, SK004, Taiwan, Khaek Dum, Khaek Nuan, Khrang, Tha Phra3,

Number 12, Pak Chong, Hybrid Australia, Si Tong และ Hawaii โดยเก็บตัวอย่างใบอ่อนจากต้นกล้าอายุ 2 เดือนจำนวนต้นละ 1-2 ใบ เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

**การสกัดดีเอ็นเอ**

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของมะละกอด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Kang *et al.* (1998) แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์

**การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์**

การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยการเตรียมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้ ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1xPCR buffer 0.4 mM dNTP 2 mM $MgCl_2$ 0.6 mM primer 0.5 unit *Taq*polymerase (Fermentas) และดีเอ็นเอต้นแบบ 50 ng ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรม PCR ดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 นาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที โดยทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ ขั้นสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่องถ่ายภาพสารพันธุกรรม (Gel documentation) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder plus และ100 bp DNA ladder plus (Fermentas) คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ และให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างชัดเจน

**การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล**

ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะละกอแต่ละสายพันธุ์ ได้ทำการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาไอเอสเอสอาร์-พีซีอาร์โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 0 คำนวณหาค่าดัชนีความเหมือน (similarity index, S.I.) จากสูตร $S.I. = 2n_{ab}/(n_a+n_b)$(Lynch, 1991) เมื่อ $n_a$ และ $n_b$ แทนจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในตัวอย่าง a และ b ตามลำดับ และ $n_{ab}$ คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทั้ง 2 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) ก่อนนำมาจัดกลุ่มทางพันธุกรรม เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอทั้ง 32 สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.1 (Rohlf, 1998)

## ผลการศึกษา

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะละกอ 32 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 60 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ 57 ไพรเมอร์หรือคิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ (Table 1) โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 612 แถบ มีแถบที่แสดงความแตกต่างกัน จำนวน 240 แถบ (39%) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาดประมาณ 160-3,000 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ $(GT)_7AG$ มีขนาดประมาณ 270-1,300 คู่เบส (**Figure 1**) จากการวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ Florida กับ HOSno.3 มีค่าต่ำที่สุด (0.47) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ Tha Phra3 กับสายพันธุ์ KK80 มีค่าสูงที่สุด (0.98) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ค่าดัชนีความเหมือน และสร้างแผนภาพ แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) ของมะละกอทั้ง 32 สายพันธุ์ สามารถจัดเป็น 3 กลุ่มที่แตกต่างกันทางพันธุกรรม โดยกลุ่มที่ 1 อยู่ในเขตอเมริกาเหนือ กลุ่มที่ 2 และ 3 อยู่ในเขตแปซิฟิก (**Figure 2**)

## วิจารณ์

จากการทดลองพบว่ามะละกอสายพันธุ์ Tha Phra3 กับ KK80 มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.98 (98%) ซึ่งสอดคล้องกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เนื่องจากมะละกอ KK80 เป็นมะละกอที่พัฒนาสายพันธุ์มาจากมะละกอTha Phra3 (วิไล และคณะ, 2551) เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ 32 สายพันธุ์ ด้วยวิธี UPGMA และนำมาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ 32 สายพันธุ์ พบว่ามะละกอสายพันธุ์ Florida Tha Phra3 และ KK80 ถูกแยกออกมาจากกลุ่มอื่นอย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องกับข้อมูลการปรับปรุงพันธุ์มะละกอ โดย Florida เป็นมะละกอที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตอเมริกาเหนือ ส่วน Tha Phra3 และ KK80 เป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่าง Florida กับแขกดำ (วิไล และคณะ, 2551) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอทั้ง 32 สายพันธุ์ ค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.63 ถึง 0.98 ซึ่งมีช่วงความเหมือนทางพันธุกรรมกว้างกว่าความเหมือนทางพันธุกรรมของการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมะละกอที่ปลูกในประเทศไทยจำนวน 30 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเอเอฟเอลพี จากการใช้ไพรเมอร์ จำนวน 12 คู่ พบว่าค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.726 ถึง 0.92 และจำแนกเป็น 6 กลุ่ม (Janthasri *et al*., 2007) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสายพันธุ์มะละกอที่นำมาศึกษาและเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์มีความแตกต่างกัน ไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายที่สามารถใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวในการตรวจสอบครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน (สุรินทร์, 2552) ในขณะที่เอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายแบบ codominant สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygote และ heterozygote และใช้เป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์แท้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มะละกออย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว (Oliveira *et al*., 2010)

**Table 1** Total number of DNA bands and polymorphic bands from ISSR analysis of thirty-two papaya cultivars using 60 primers.

| Primer | Number of DNA bands | | Ta* | Primer | Number of DNA bands | | Ta* | Primer | Number of DNA bands | | Ta* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | total | polymorphic | (° C) | | total | polymorphic | (° C) | | total | polymorphic | (° C) |
| $(AG)_8T$ | 12 | 6 | 50 | $(GACA)_4$ | 14 | 13 | 55 | $(CA)_8G$ | 11 | 6 | 55 |
| $(GA)_8T$ | 12 | 3 | 50 | $(CAA)_5$ | 12 | 3 | 50 | $(AC)_8G$ | 13 | 8 | 50 |
| $(CT)_8A$ | 9 | 5 | 55 | $(GA)_8A$ | 13 | 3 | 50 | $(CA)_8RT$ | 9 | 4 | 50 |
| $(GT)_8YT$ | 6 | 4 | 55 | $(GT)_8A$ | 11 | 7 | 50 | $(CA)_8RG$ | 14 | 10 | 55 |
| $(AG)_8YA$ | 6 | 0 | 50 | $(TC)_8A$ | 7 | 1 | 50 | $(GT)_8YC$ | 14 | 5 | 55 |
| $(CAC)_3GC$ | 9 | 0 | 55 | $(TC)_8G$ | 6 | 2 | 50 | $(AC)_8YG$ | 16 | 8 | 50 |
| $(CT)_8RC$ | 5 | 4 | 50 | $(TG)_8C$ | 6 | 0 | 50 | $(ATG)_6$ | 12 | 3 | 50 |
| $(AC)_8YA$ | 15 | 10 | 55 | $(GA)_8YT$ | 6 | 3 | 50 | $(GAA)_6$ | 13 | 6 | 50 |
| $(ACC)_6$ | 9 | 2 | 50 | $(CTC)_6$ | 13 | 4 | 55 | $(GGAGA)_3$ | 13 | 5 | 50 |
| $DBD(AC)_7$ | 18 | 5 | 55 | $(GA)_8C$ | 15 | 9 | 55 | $DVD(TC)_7$ | 17 | 8 | 55 |
| $(CAG)_5$ | 6 | 0 | 55 | $(CT)_8T$ | 8 | 4 | 55 | $BDB(CA)_7$ | 10 | 2 | 55 |
| $(AGC)_5GR$ | 8 | 0 | 55 | $(CT)_8G$ | 8 | 0 | 50 | $VHV(GT)_7$ | 17 | 6 | 55 |
| $(AGC)_5AY$ | 14 | 5 | 55 | $(TC)_8C$ | 12 | 3 | 50 | $HVH(TG)_7$ | 15 | 8 | 50 |
| $CA(GA)_8$ | 11 | 4 | 50 | $(AGC)_6$ | 8 | 1 | 55 | $A(CA)_8G$ | 4 | 2 | 50 |
| $(GAG)_3GC$ | 9 | 4 | 55 | $(CCG)_6$ | 8 | 1 | 50 | $(ATG)_6G$ | 17 | 7 | 55 |
| $GC(GA)_8$ | 12 | 6 | 55 | $(CA)_6GT$ | 9 | 7 | 55 | $CT(CCT)_3CAC$ | 9 | 3 | 50 |
| $(AGC)_5Y$ | 19 | 0 | 55 | $(GA)_6CC$ | 5 | 0 | 55 | $(GT)_7AG$ | 7 | 5 | 55 |
| $GGGT(GGGGT)_2G$ | 9 | 2 | 55 | $(CCCT)_4$ | 11 | 3 | 50 | (CA)7TC | 0 | 0 | - |
| $(GA)_8YC$ | 9 | 2 | 55 | $(AG)_8C$ | 10 | 8 | 55 | $(GATA)_4$ | 0 | 0 | - |
| $(CAGA)_4$ | 10 | 5 | 50 | $(AG)_8G$ | 14 | 7 | 55 | $(AT)_8G$ | 0 | 0 | - |

B=(C,G,T), D=(A,G,T), Y=(C,T), R=(A,G), V=(A,C,G), H=(A,C,T)

*Ta = annealing temperatures

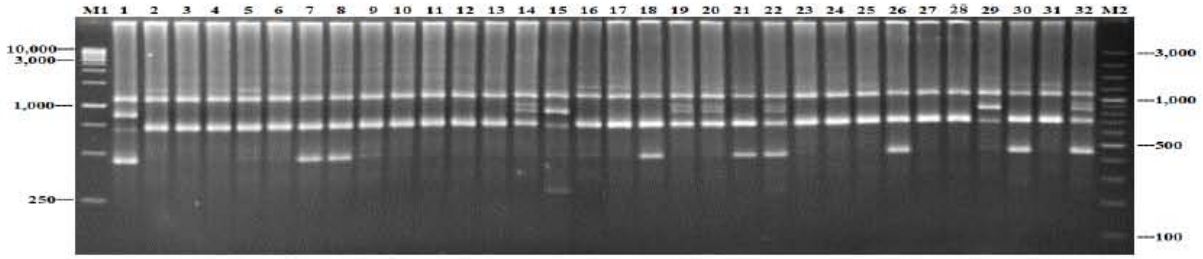



Figure 1 ISSR patterns of thirty-two papaya cultivars (using primer $(GT)_7AG$ Lane M1, 1kb DNA ladder plus; Lane 1-32, Forida, HO, HOSno.1, HOSno.2, HOSno.3, KDDNs, KDLS1, KDLS2, KD-Si, KK80, KN(SR), KNLS1, LN, MA, MI, Maradol, MIR, SEW58, SK001, SK002, SK003, SK004, Taiwan, Khaek Dum, Khaek Nuan, Khrang, Tha Phra3, Number 12, Pak Chong, Hybrid Australia, Si Tong and Hawaii; Lane M2,100 bp DNA ladder plus.

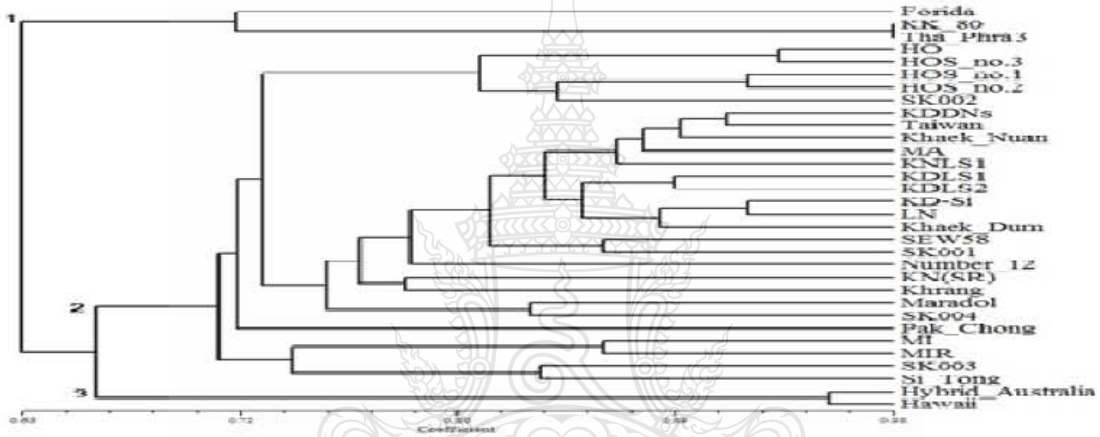



Figure 2 Dendrogram of thirty-two papaya cultivars based on ISSR data using 57 primers with UPGMA cluster analysis.

## สรุป

เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสามารถในการจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอในระดับหนึ่ง โดยสามารถจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 สายพันธุ์ออกเป็น 3 กลุ่ม สอดคล้องกับแหล่งกำเนิดของมะละกอ และมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.47 ถึง 0.98 ซึ่งงานวิจัยนี้ยังแสดงถึงศักยภาพของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในการจำแนกสายพันธุ์มะละกอได้เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น เช่น มะกอกน้ำมัน (Gomes *et al.*, 2009) ถั่วลิสง (Raina *et al.*, 2001) และ ชา (Lai *et al.*, 2001) เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการประเมินสายพันธุ์มะละกอจากแหล่งต่างๆ มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มะละกอ เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีคุณภาพและให้ผลผลิตสูง

## เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. เกษตรฯ เร่งแก้ปมมะละกอลดฮวบแม่ค้าส้มตำสะเทือน เหตุไวรัสจุดวงแหวนระบาดหนัก หวั่นกระทบยอดส่งออก-ผลผลิตขาดตลาดกว่า 1.5 หมื่นตันต่อปี (ออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.moac.go.th/ewt_news.php?nid=2970&filename=NFC. ค้นเมื่อ 21 พฤศจิกายน 2555.

ปิยวดี สัมมาเพ็ชร์. 2551. การศึกษาสมบัติของน้ำมันเมล็ดมะละกอเพื่อพัฒนาเป็นน้ำมันบริโภค. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยมหิดล.

พิภพ สมเวที และสิริรัตน์ เพชรเหมือน. 2552. โครงการการศึกษาสายพันธุ์ระบบการผลิตและการตลาดของมะละกอในจังหวัดกระบี่. มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต.

วิไล ปราสาทศรี, อุดม คำชา, เฉลิมชัย ปราสาทศรี, รัชนี ศิริยาน, สุวิทย์ ชัยเกียรติยศ และ Dennis Gonsalves. 2551. ขอนแก่น 80 มะละกอผลเล็กเพื่อกินสุกและส่งออก. กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____ . 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: 64.

อรวรรณ ชลวาณิชย์. 2547. การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์ของเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*) ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Costa, F.R., N.S.P, Telma, P.C.G., Ana and G.P., Messias. 2011. NOTE ISSR markers for genetic relationships in Caricaceae and sex differentiation in papaya. In Biotechnology 11: 352-357.

Godwin, I.D., E.S. Mace and Nurzuhairawaty. 2001. Genotyping Pacific Island Taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) Germplasm, pp.109-128. In: Plant Genotyping the DNA Fingerprinting of Plants,

Henry, ed. Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants. CABI Publishing, Australia.

Gomes, S., P.M. Lopes, J. Lopes and H. Guedes-Pinto. 2009. Assessing genetic diversity *in Olea europaea*L. using ISSR and SSR. Plant Molecular Reporter 27(3): 365-373.

Janthasri, R., S. Katengam and U. Khumcha. 2007. .An Analysis on DNA Fingerprints of Thirty Papaya Cultivars (*Carica papaya* L.), Grown in Thailand with the Use of Amplified Fragment Length Polymorphisms Technique. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 3072-3078.

Kang, H.W., Y.G. Cho, U.H. Yoon and M.U. Eun. 1998. A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. Plant Molecular Biology Reporter 16 : 1-9.

Lai, J.A., W. C. Yang and J. Y. Hsiao. 2001. An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. Botanical Bulletin- Academia Sinica 42: 93-100.

Lynch, M. 1991. analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting, DNA Fingerprinting: Approaches and Application, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.

Oliveira, E.J., A. Santos Silva, F. M. Carvalho, L. F. Santos, J. L. Costa, V. B. Oliveira Amorim and J. L. L. Dantas. 2010. Polymorphic microsatellite marker set for *Carica papaya* L. and its use in molecular- assisted selection. Euphytica 173: 279-287.

Raina, P. S., V. Rani, T. Kojima, K.P.Singh and R. M. Devarumath. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification. and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species.Genome 44: 763-772.

Ramos, H.C.C., M.G., Pereira, L.S.A., Gonçalves. A.P.C.G., Berilli, F.O. Pinto and E.H. Ribeiro. 2012 Multivariate analysis to determine the genetic distance among backcross papaya (Carica papaya) progenies. Genetics and Molecular Research 11 (2): 1280-1295.

Rohlf, F.J., 1998. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariat Analysis System, Version 3.2. 1st Edn., Exeter Software, New York.

# ประวัติผู้วิจัย

| | |
|---|---|
| **ชื่อ-สกุล** | นายสุทวัฒน์ สินธีรโรจน์ |
| **วัน เดือน ปีเกิด** | 30 สิงหาคม 2527 |
| **ที่อยู่** | 439 หมู่ที่ 4 ตำบลเมืองแหง อำเภอเวียงแหง จังหวัดเชียงใหม่ 50350 |
| **การศึกษา** | สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี พ.ศ. 2550 |
| **ประสบการณ์ทำงาน** | ผู้ช่วยนักวิจัยในห้องปฏิบัติการ ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ คลอง 6 อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี กรมวิชาการเกษตร พ.ศ. 2551 ถึงปัจจุบัน |
| **ผลงานทางวิชาการ** | นำเสนอผลงานทางวิชาการ ในหัวข้อ การใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะละกอ ในการประชุมวิชาการ พืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 13 “ นวัตกรรมพืชสวนเพื่อชีวิตที่ยืนยาวอย่างเป็นสุข” ณ โรงแรมเซ็นทาราแอนด์คอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ จังหวัดขอนแก่น 29-31 กรกฎาคม 2557 |
| **เบอร์โทรศัพท์** | 081-0300011 |
| **อีเมล์** | aojung_naja@hotmail.com |