แบบ 1

(แบบฟอร์ม)

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย : โครงการวิจัยการศึกษา สำรวจ และประเมินเชื้อพันธุกรรมพืช (พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น) ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (โครงการเดี่ยว)

2. โครงการวิจัย : โครงการวิจัยการศึกษา สำรวจ และประเมินเชื้อพันธุกรรมพืช (พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น) ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การศึกษาเทคนิคการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Technical education on DNA fingerprinting technique of native plants/indigenous plants in Germplasm Bank.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: นางสาวสุกัลยา ศิริฟองนุกูล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	: นางศิริลักษณ์ อินทะวงศ์	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่
	: นางรัชนก ทองเวียง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	: นางฐิตามินทร์ คงสำราญ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ

พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น จำนวน 50 หมายเลขพันธุ์ 4 วงศ์ (Family) ได้แก่ LEGUMINOSAE LAMIACEAE UMBELLIFERAE และ SOLANACEAE ที่ได้เก็บเชื้อพันธุกรรมไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (Gene Bank) สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ. ปทุมธานี ประเทศไทย ถูกนำมาจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) และใช้ ISSR primer ในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังกล่าว จำนวน 20 ชนิด ได้ผลดังนี้ (1) พืชที่อยู่ในวงศ์ LEGUMINOSAE มี ISSR primer ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและตรวจนับได้ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ $(CA)_6GT$, $(GA)_6CC$, $(AG)_7AAC$, $(AG)_7AAG$, $(AC)_8C$ และ $(ATG)_6$ สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้สูงที่สุดในถั่วปี คิดเป็นร้อยละ 100 (2) พืชที่อยู่ในวงศ์ LAMIACEAE มี ISSR primer ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและตรวจนับได้ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ $(CAC)_3GC$, $(CA)_6AC$ และ $(AG)_7AA$ สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้สูงที่สุดในแมงลัก คิดเป็นร้อยละ 71.4 (3) พืชที่อยู่ในวงศ์ UMBELLIFERAE มี ISSR primer ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและตรวจนับได้ จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ $(CAC)_3GC$, $(CA)_6AC$, $(GAG)_3GC$, $(CA)_6GT$, $(AG)_7AAG$, $(AG)_8G$, $(GA)_8C$ และ $(CTC)_6$ สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้สูงที่สุดในผักชีลาว คิดเป็นร้อยละ 64.3 และ (4) พืชที่อยู่ในวงศ์ SOLANACEAE มี ISSR primer ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและตรวจนับได้ จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ $(CAC)_3GC$, $(CA)_6AC$, $(CA)_8GT$, $(AG)_7AA$, $(AG)_8T$, $(AG)_8C$, $(AG)_8G$, $(ATG)_6$ และ $A(CA)_8T$ สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้สูงที่สุดในมะเขือขื่น คิดเป็นร้อยละ 90

6. คำนำ

ประเทศไทยถือว่าเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ด้านทรัพยากรธรรมชาติแห่งหนึ่งของโลกเนื่องจากตั้งอยู่ในแถบศูนย์สูตร ซึ่งเป็นบริเวณที่มีสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการอยู่อาศัยและการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต แต่เป็นที่น่าวิตกว่าในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา ป่าธรรมชาติดั้งเดิมได้ถูกทำลายลงไปมาก ทำให้ถิ่นที่อยู่ของพรรณพืชหลายชนิดถูกทำลาย หรือ เปลี่ยนสภาพไป เป็นเหตุให้พืชพรรณนานาชนิดอันเป็นทรัพยากรของประเทศหลายชนิดที่อาจมีศักยภาพทางเศรษฐกิจ และเป็นประโยชน์ต่อมนุษยชาติในอนาคต เสี่ยงต่อการถูกทำลายและสูญพันธุ์ไปจากโลกหรือจากประเทศก่อนที่จะได้นำมาใช้ประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจ โดยเฉพาะพรรณพืชที่มีสถานภาพเป็นพืชท้องถิ่น (domestic plant) และ พืชพื้นบ้าน (indigenous plant) (สุรพล, 2554)

การอนุรักษ์พันธุ์พืชพื้นบ้านและพืชท้องถิ่นนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง ทำให้พืชพื้นบ้านและพืชท้องถิ่นบางชนิดถูกทำลายและสูญหายในที่สุด ดังนั้นวิทยาการในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชจึงมีบทบาทสำคัญที่จะดำรงทรัพยากรนี้ให้ยั่งยืน เมื่อเป็นเช่นนี้แล้วทางกลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จึงได้มีนโยบายในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช โดยการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ของพืชพื้นบ้าน/พืชท้องถิ่นจากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช เพื่อป้องกันการสูญหายของเชื้อพันธุกรรมพืชดังกล่าว ซึ่งในปีงบประมาณ 2554 (ต.ค. 53 – ก.ย. 54) ได้มีการสำรวจรวบรวมเมล็ดพันธุ์พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นได้มากกว่า 200 ชนิด

ขั้นตอนสำคัญอีกขั้นตอนหนึ่งของการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช คือ การศึกษาพันธุกรรมของพืชที่เก็บรวบรวมเพื่อเป็นฐานข้อมูลและการใช้ประโยชน์ในอนาคต การศึกษาพันธุกรรมพืชและการจำแนกกลุ่มพืช สามารถทำได้โดยอาศัยความแตกต่างของสัณฐานวิทยาที่ปรากฏ อย่างไรก็ตามการอาศัยลักษณะดังกล่าวมีข้อจำกัดมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าพืชเหล่านั้นมีลักษณะใกล้เคียงกัน การใช้เทคนิคทางด้านอณูชีวโมเลกุลจะเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาดังกล่าว เทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) เป็นหนึ่งในเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มพืช รวมไปถึงการใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการจำแนกพืชเพื่อจัดทำฐานพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์พืชต่อไป จะทำให้การประเมินลักษณะพันธุกรรมของพืชมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น (Bornet and Branchard, 2001)

การศึกษาความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชสมุนไพร และพืชหายากสามารถทำได้โดยอาศัยวิธีการดั้งเดิมคือการใช้ลักษณะสัณฐานเป็นตัวเปรียบเทียบ แต่เนื่องจากข้อจำกัดหลายประการ ทำให้การใช้ลักษณะสัณฐานไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรม การใช้

เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล เช่น RAPD และ ISSR เป็นต้น จึงเข้ามามีบทบาทเป็นอย่างมากโดยเฉพาะในทศวรรษที่ผ่านมา ยกตัวอย่างเช่น

Takano (2003) ใช้เทคนิค ISSR จำแนกพืชวงศ์ขิงชนิด *Globba leucantha* var. *bicolor* จำนวน 90 ต้น จาก 2 แหล่ง คือ Malay Peninsular และ Sumatra โดยพบ ISSR marker จำนวน 22 แถบ ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ดั้งเดิมและพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาแล้ว

Sukrong *et al*. (2005) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสมุนไพรไทยสกุล *Derris* 5 ชนิด ได้แก่ *D. scandens* (เถาวัลย์เปรียง), *D. elliptica* (หางไหลแดง), *D. malaccensis* (หางไหลขาว), *D. trifoliate* (ถอบแถบน้ำ), และ *D. reticulate* (ชะเอมเหนือ) โดยใช้ไพรเมอร์ 9 ชนิด คือ OPS-03, OPS-05, OPS-07, OPS-08, OPS-12, OPS-14, OPS-16, OPS-17, และ OPS-19 ซึ่งพบว่า เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทั้ง 9 ไพรเมอร์ สามารถแบ่งกลุ่มสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดนี้ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ *D. scandens*, *D. elliptica*, *D. malaccensis* และ *D. reticulate* และ กลุ่ม 2 ได้แก่ *D. trifoliate*

Syamkumar and Sasikumar (2007) ใช้เทคนิค ISSR เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 15 ชนิด พบว่า ไพรเมอร์ 8 ชนิด สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 91 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งหมด 87 แถบ เมื่อนำข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมาวิเคราะห์ UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) พบว่า สามารถแบ่งพืชออกได้ 7 กลุ่ม ที่สอดคล้องกับลักษณะของพืชที่ปรากฏ

Chaveerach *et al*. (2008) ใช้เทคนิค ISSR หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Curcuma* ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นใหม่ 2 ชนิด คือ C. *sattayasaii* A. Chaveerach & R. Sudmoon ที่มีลักษณะคล้ายกับ C. *longa* L. และ C. *zedoaroides* A. Chaveerach & T. Tanee ที่มีลักษณะคล้ายกับ C. *zedoaria* (Christm.) Roscoe โดยใช้ไพรเมอร์ 36 ชนิด พบว่า ไพรเมอร์ 16 ชนิด สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 947 แถบ ที่มีขนาด 200-2000 bp เมื่อนำข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมาวิเคราะห์เดนโดรแกรมเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า สามารถแยกกลุ่ม *Curcuma* ทั้ง 4 ชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน แม้ว่าลักษณะของพืชที่ปรากฏอาจมีความคล้ายคลึงกันก็ตาม

George *et al.* (2009) ใช้เทคนิค ISSR ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม และจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของประชากรกล้วยไม้หายากชนิด *Piperia yadonii* จำนวน 7 กลุ่มประชากร จากการใช้ ISSR ไพรเมอร์ 9 ชนิด พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างภายในกลุ่มประชากรถึง 99% โดยสามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรได้ที่ 60%

Wang *et al.* (2009) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรม (phylogenetic) และหาเครื่องหมายอณูชีวโมเลกุลของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) 31 ชนิด จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค ISSR โดยใช้ ISSR ไพรเมอร์ 17 ชนิด พบว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 2,368 แถบ เป็น ISSR loci จำนวน 224 แถบ และพบแถบที่เฉพาะเจาะจงในระดับชนิด (species-specific ISSR marker) จำนวน 9 แถบสำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย 9 ชนิดที่นำมาศึกษา เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์ด้วยวิธี Unweighted pair-group mean analysis (UPGMA) พบว่า สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย 31 ชนิดที่นำมาศึกษาได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม ที่ระดับความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม 0.637

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้ จึงใช้ เทคนิค ISSR ซึ่งมีวิธีการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่ให้ผลได้แม่นยำและสามารถทำซ้ำได้ (Bornet and Branchard, 2001) เพื่อศึกษาวิธีการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นที่มีอยู่ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

7. วิธีดำเนินการ

1. นำตัวอย่างใบอ่อนของพืชพื้นเมือง /พืชท้องถิ่น (จากตารางที่ 1) มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNAzol EX reagent จากนั้นปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 5 ng/µl โดยใช้ 1.0% agarose gel electrophoresis

2. นำไปผสมใน reaction mixture ปริมาตรรวม 25 µl ต่อ 1 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย 5 ng/µl DNA template, 1× PCR buffer, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTPs, 0.5 µM primer, 1.25 unit *Taq* DNA polymerase และ น้ำกลั่น

3. นำ reaction mixture ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามวิธีการของ Chaveerach *et al.* (2008) ดังนี้ อุณหภูมิ 94°C 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย อุณหภูมิ 92 °C 1 นาที 45-60 °C 2 นาที และ 72 °C 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ อุณหภูมิ 72 °C 300 sec. จำนวน 1 รอบ โดยใช้ ISSR primer จำนวน 20 ชนิด ที่มีอุณหภูมิในช่วง annealing แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

4. นำ PCR product ที่ได้จากข้อ 3. ไปวิเคราะห์ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค 1.8% agarose gel electrophoresis ใน 1× TBE buffer ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย 0.1 µg/ml ethidium bromide แล้วนำไปบันทึกภาพภายใต้แสง UV เพื่อตรวจดูลักษณะ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชแต่ละชนิดที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์

ตารางที่ 1 พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น จำนวน 50 หมายเลขพันธุ์ ที่นำมาทดสอบ

ลำดับที่	หมายเลขพันธุ์	วงศ์	ชนิดพืช	ลำดับที่	หมายเลขพันธุ์	วงศ์	ชนิดพืช
1	R23	Leguminosae	อัญชัน	26	R1011	Umbelliferae	หอมแย้,ผักชีไร่
2	R37	Leguminosae	อัญชัน	27	R960	Umbelliferae	ผักชีลาว
3	R486	Leguminosae	ถั่วพุ่ม	28	R993	Umbelliferae	ผักชีลาว
4	R1269	Leguminosae	ถั่วพุ่ม	29	R1035	Umbelliferae	ผักชีหอม
5	R874	Leguminosae	ถั่วแปป	30	R1258	Umbelliferae	ผักชีลาว
6	R396	Leguminosae	ถั่วแปป	31	R 388	Solanaceae	มะแว้งต้น
7	R476	Leguminosae	ถั่วปี	32	R 1205	Solanaceae	มะแว้งต้น
8	R940	Leguminosae	ถั่วปี	33	R 386	Solanaceae	มะเขือขื่น
9	R651	Leguminosae	ถั่วปี	34	R 1458	Solanaceae	มะเขือขื่น
10	R650	Leguminosae	ถั่วปี	35	R 1097	Solanaceae	มะเขือขื่น
11	R630	Leguminosae	ถั่วพู	36	R 1295	Solanaceae	มะเขือขื่น
12	R702	Leguminosae	คราม	37	R 918	Solanaceae	มะเขือลาย
13	R394	Leguminosae	คราม	38	R 1402	Solanaceae	มะเขือลาย
14	R812	Leguminosae	unknown	39	R 1288	Solanaceae	มะเขือคางกบ
15	R1336	Leguminosae	ถั่วมะแฮะ	40	R 1279	Solanaceae	มะเขือคางกบ
16	R632	Lamiaceae	แมงลัก	41	R 1048	Solanaceae	มะเขือเปราะ
17	R915	Lamiaceae	แมงลัก	42	R 1180	Solanaceae	มะเขือเปราะ
18	R919	Lamiaceae	แมงลัก	43	R 1200	Solanaceae	มะอึก
19	R1115	Lamiaceae	แมงลัก	44	R 1037	Solanaceae	มะอึก
20	R1245	Lamiaceae	แมงลัก	45	R 1594	Solanaceae	มะอึก
21	R652	Lamiaceae	งาขี้ม้อน	46	R 459	Solanaceae	มะเขือยักษ์
22	R869	Lamiaceae	กะเพรา	47	R 1351	Solanaceae	มะเขือจานเดียว
23	R871	Lamiaceae	โหระพา	48	R 1436	Solanaceae	มะเขือเจ้าพระยา
24	R470	Umbelliferae	ผักชีลาว	49	R 1063	Solanaceae	มะเขือใหญ่
25	R484	Umbelliferae	ผักชีลาว	50	R 1540	Solanaceae	มะเขืออุ๊กป่าว

ตารางที่ 2 ISSR primer จำนวน 20 ชนิด ที่มีอุณหภูมิในช่วง annealing แตกต่างกัน

Annealing temperature (° C)	Primer code	ISSR Primer sequence	Primer no.
45	1	$(CAC)_3GC$	1
	2	$(GAG)_3GC$	2

49	1	$(CA)_6AC$	3
	2	$(CA)_6GT$	4
52	1	$(AG)_7AA$	5
	2	$(GA)_6CC$	6
55	1	$(AG)_7AAC$	7
	2	$(AG)_7AAG$	8
58	1	$(AG)_8C$	9
	2	$(CA)_9A$	10
53	UBC807	$(AG)_8T$	11
	UBC808	$(AG)_8C$	12
	UBC809	$(AG)_8G$	13
	UBC811	$(GA)_8C$	14
	UBC825	$(AC)_8T$	15
	UBC826	$(AC)_8C$	16
	UBC864	$(ATG)_6$	17
	UBC866	$(CTC)_6$	18
	I2	$A(CA)_8T$	19
	I4	$A(CA)_8G$	20

<u>เวลาและสถานที่ทำการทดลอง</u>

การทดลองนี้เริ่มต้น เดือน ตุลาคม 2555 สิ้นสุด เดือน กันยายน 2558 โดยดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ (บางเขน) สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น จำนวน 50 หมายเลขพันธุ์ (ตารางที่ 1) ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการของ Chaveerach *et al*. (2008) ดังนี้ อุณหภูมิ 94˚C 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย อุณหภูมิ 92 °C 1 นาที 45-60 °C 2 นาที และ 72 °C 2 นาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 °C 5 นาที จำนวน 1 รอบ โดยใช้ ISSR primer 20 ชนิด (ตารางที่ 2) ได้ผลดังนี้

1. พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น ที่อยู่ในวงศ์ LEGUMINOSAE จำนวน **15** หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ ถั่วปี 4 หมายเลขพันธุ์ ถั่วแปบ 2 หมายเลขพันธุ์ อัญชัญ 2 หมายเลขพันธุ์ คราม 2 หมายเลขพันธุ์ ถั่วพู 1 หมายเลขพันธุ์ ถั่วพุ่ม 2

หมายเลขพันธุ์ ถั่วมะแฮะ 1 หมายเลขพันธุ์ และ ถั่วไม่ทราบชนิด (unknown) 1 หมายเลขพันธุ์ พบว่า มี ISSR primer 6 ชนิด ที่สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและตรวจนับจำนวนแถบได้ (ตารางที่ 3) ได้แก่ $(CA)_6GT$, $(GA)_6CC$, $(AG)_7AAC$, $(AG)_7AAG$, $(AC)_8C$ และ $(ATG)_6$ มีรายละเอียดดังนี้

ถั่วปี (*Vigna* spp.) จำนวน 4 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จำนวนแถบได้มากที่สุดคือ $(AG)_7AAG$ สามารถสังเคราะห์ได้ 13 แถบ มีขนาด 1500-100 คู่เบส และไพรเมอร์ที่พบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างถั่วปีทั้ง 4 หมายเลขพันธุ์ ได้สูงที่สุดคือ $(CA)_6GT$, $(AG)_7AAC$, $(AG)_7AAG$ และ $(AC)_8C$ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันทั้งหมด (ภาพที่ 1-1, 2-1, 3-1 และ 4-1)

ถั่วแปบ (*Dolichos lablab* Linn.) จำนวน 2 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จำนวนแถบได้มากที่สุดคือ $(GA)_6CC$ สามารถสังเคราะห์ได้ 12 แถบ มีขนาด 3000-100 คู่เบส และไพรเมอร์ที่พบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างถั่วแปบทั้ง 2 หมายเลขพันธุ์ ได้สูงที่สุดคือ $(CA)_6GT$ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ 8 แถบ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันทั้งหมด (ภาพที่ 1-1)

อัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) จำนวน 2 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จำนวนแถบได้มากที่สุด คือ $(AG)_7AAC$, $(AC)_8C$ มีขนาดอยู่ระหว่าง 800-200 คู่เบส และ $(ATG)_6$ มีขนาดอยู่ระหว่าง 3000-200 คู่เบส สามารถสังเคราะห์ได้ 7 แถบ และไพรเมอร์ที่พบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างอัญชันทั้ง 2 หมายเลขพันธุ์ ได้สูงที่สุดคือ $(AC)_8C$ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ 7 แถบ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันร้อยละ 71.4 (ภาพที่ 4-1)

คราม (*Indigofera tinetoria* L.) จำนวน 2 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จำนวนแถบได้มากที่สุดคือ $(CA)_6GT$ สามารถสังเคราะห์ได้ 9 แถบ มีขนาด 3000-200 คู่เบส และพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างครามทั้ง 2 หมายเลขพันธุ์ ได้สูงที่สุดด้วยเช่นกัน โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันทั้งหมด (ภาพที่ 1-1)

ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* L.) จำนวน 2 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จำนวนแถบได้มากที่สุดคือ $(AG)_7AAG$ สามารถสังเคราะห์ได้ 10 แถบ มีขนาด 1500-100 คู่เบส และไพรเมอร์ที่พบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างถั่วพุ่มทั้ง 2 หมายเลขพันธุ์ ได้สูงที่สุดคือ $(CA)_6GT$ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ 8 แถบ โดยมีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอร้อยละ 87.5 (ภาพที่ 1-1)

สำหรับถั่วพู ถั่วมะแฮะ และ ถั่ว unknown มีตัวอย่างละ 1 หมายเลขพันธุ์ สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและตรวจนับแถบดีเอ็นเอได้ แต่เนื่องจากมีเพียงชนิดละ 1 หมายเลขพันธุ์ จึงไม่มีการเปรียบเทียบกันระหว่างหมายเลขพันธุ์ของพืชชนิดเดียวกัน อย่างไรก็ตาม การใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพาะเมล็ดซึ่งแต่ละเมล็ดแทน 1 ตัวอย่างของแต่ละหมายเลขพันธุ์ และ 1 หมายเลขพันธุ์ มี 3 หรือ 4 ตัวอย่าง ซึ่งหมายถึงดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ด 3 หรือ 4 เมล็ด ถึงแม้ว่าจะเป็นพืชชนิด/พันธุ์เดียวกันก็ตาม ในโครโมโซมนั้นจะมีดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน

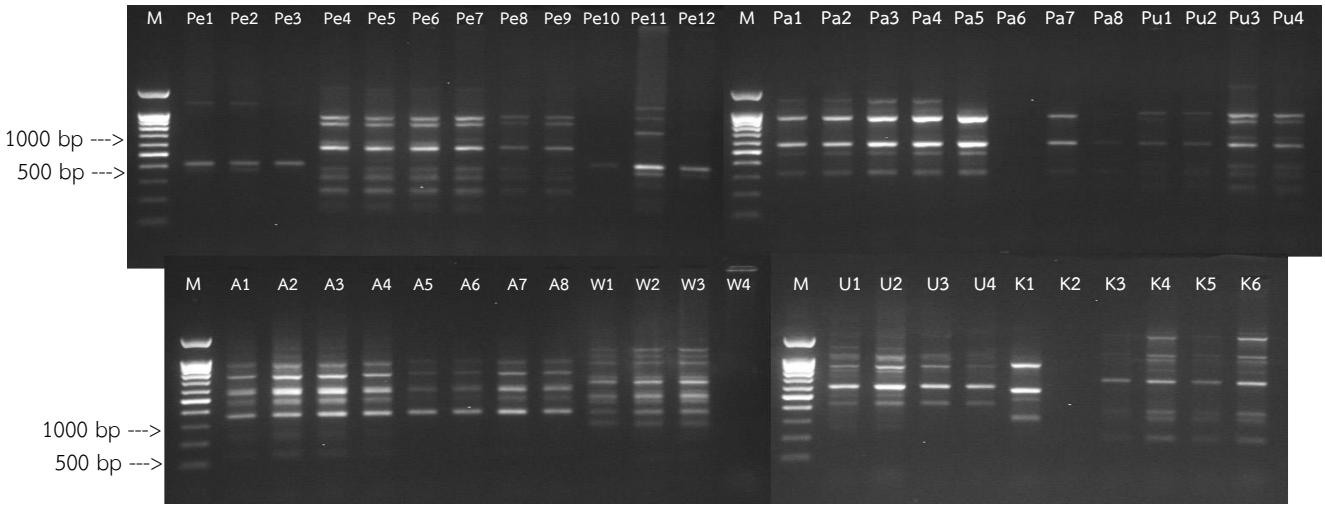
(polymorphism) อันเนื่องมาจากการแบ่งตัวในระดับโครโมโซมและดีเอ็นเอระหว่างการสืบพันธุ์นั่นเอง ทำให้อาจเกิดความแตกต่างกันได้ในพืชหมายเลขพันธุ์เดียวกัน (ประดิษฐ์, 2543; นิตย์ศรี, 2551)(ภาพที่ 1-1, 2-1, 3-1 และ 4-1) ยกตัวอย่างเช่น ไพรเมอร์ $(AG)_7AAG$ สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในถั่วพูได้ 7 แถบ และแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันได้ร้อยละ 85.7 (ตารางที่ 3, ภาพที่ 3-1) ในขณะที่ ไพรเมอร์ $(AG)_7AAC$ สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วมะแฮะได้ 6 แถบ และแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันได้ทั้งหมด (ตารางที่ 3, ภาพที่ 2-2) และ unknown ถูกสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถตรวจนับได้รวมทั้งสามารถแสดงความแตกต่างได้ถึงร้อยละ 87.5 ด้วยไพรเมอร์ $(CA)_6GT$

ตารางที่ 3 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่สามารถสังเคราะห์ได้ชัดเจนและตรวจนับจำนวนแถบได้ในพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น วงศ์ LEGUMINOSAE

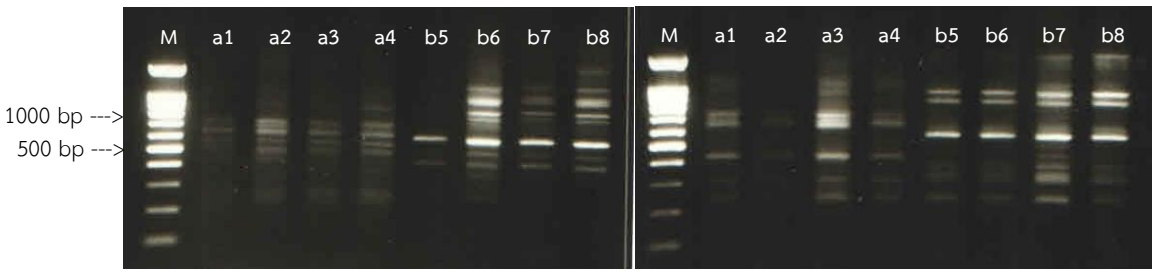
	ISSR primer sequence	Rang of amplicons (bp)	Total no. of bands	No. of monomorphic bands	No. of polymorphic bands	Percent of polymorphism (%)
ถั่วปี	$(CA)_6GT$	2000-100	10	0	10	100.0
Vigna **spp.**	$(GA)_6CC$	800-100	8	2	6	75.0
	$(AG)_7AAC$	700-300	8	0	8	100.0
	$(AG)_7AAG$	1500-100	13	0	13	100.0
	$(AC)_8C$	800-200	9	0	9	100.0
	$(ATG)_6$	3000-200	8	5	3	37.5
ถั่วแปบ	$(CA)_6GT$	3000-200	8	0	8	100.0
Dolichos lablab Linn.	$(GA)_6CC$	3000-100	12	5	7	58.3
	$(AG)_7AAC$	1500-200	9	4	5	55.6
	$(AG)_7AAG$	2000-100	8	3	5	62.5
	$(AC)_8C$	3000-200	6	6	0	0
	$(ATG)_6$	800-200	6	5	1	16.7
อัญชัน	$(CA)_6GT$	2000-300	6	4	2	33.3
Clitoria ternatea L.	$(GA)_6CC$	800-200	5	5	0	0
	$(AG)_7AAC$	800-200	7	3	4	57.1
	$(AG)_7AAG$	600-200	4	4	0	0
	$(AC)_8C$	2000-300	7	2	5	71.4
	$(ATG)_6$	800-200	7	5	2	28.6
คราม	$(CA)_6GT$	3000-200	9	0	9	100.0

	ISSR primer sequence	Rang of amplicons (bp)	Total no. of bands	No. of monomorphic bands	No. of polymorphic bands	Percent of polymorphism (%)
Indigofera tinetoria L.	$(GA)_6CC$	2000-100	6	2	4	66.7
	$(AG)_7AAC$	600-200	6	4	2	33.3
	$(AG)_7AAG$	500-200	4	2	2	50.0
	$(AC)_8C$	2000-400	4	4	0	0
	$(ATG)_6$	2000-200	6	2	4	66.7
ถั่วพุ่ม	$(CA)_6GT$	3000-400	8	1	7	87.5
Vigna unguiculata L.	$(GA)_6CC$	600-100	4	3	1	25.0
	$(AG)_7AAC$	800-200	7	5	2	28.6
	$(AG)_7AAG$	1500-100	10	6	4	40.0
	$(AC)_8C$	700-200	6	6	0	0
	$(ATG)_6$	500-200	3	3	0	0
ถั่วพู	$(CA)_6GT$	3000-200	7	4	3	42.9
Psophocarpus	$(GA)_6CC$	800-500	4	2	2	50.0
tetragonolobus (L.) DC.	$(AG)_7AAC$	1500-200	6	4	2	33.3
	$(AG)_7AAG$	600-200	7	1	6	85.7
	$(AC)_8C$	3000-200	8	8	0	0
	$(ATG)_6$	600-100	6	6	0	0
ถั่วมะแฮะ	$(CA)_6GT$	3000-200	8	4	4	50.0
Cajanus canja (L) Millsp.	$(GA)_6CC$	2000-100	7	4	3	42.9
	$(AG)_7AAC$	800-300	6	0	6	100.0
	$(AG)_7AAG$	700-300	5	4	1	20.0
	$(AC)_8C$	800-200	5	5	0	0
	$(ATG)_6$	2000-200	6	6	0	0
Unknown	$(CA)_6GT$	3000-300	8	1	7	87.5
	$(GA)_6CC$	2000-100	9	8	1	11.1
	$(AG)_7AAC$	3000-200	6	5	1	16.7
	$(AG)_7AAG$	400-300	2	2	0	0
	$(AC)_8C$	2000-100	8	8	0	0
	$(ATG)_6$	1500-400	2	2	0	0

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น ที่อยู่ในวงศ์ LEGUMINOSAE จำนวน **15** หมายเลขพันธุ์

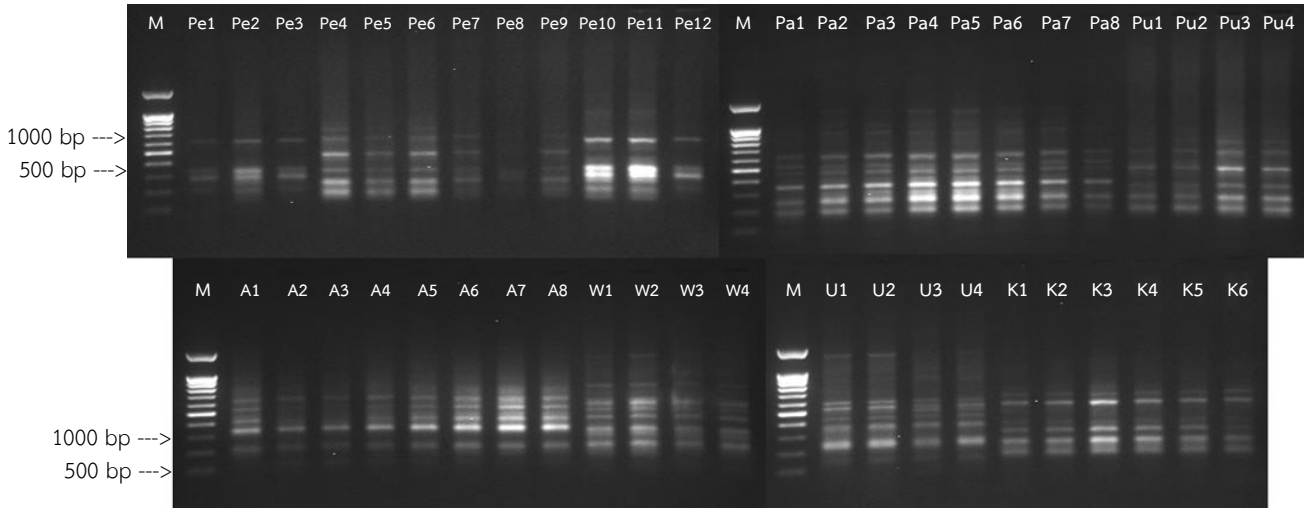


ภาพ 1-1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 13 หมายเลขพันธุ์ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(CA)_6GT$ ได้แก่ ถั่วปี 4 หมายเลขพันธุ์ คือ R650 (Pe1-3), R940 (Pe4-6), R476 (Pe7-9) และ R651 (Pe10-12) ถั่วแปบ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R874 (Pa1-4) และ R396 (Pa5-8) ถั่วพุ่ม 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R486 (Pu1-4) อัญชัญ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R23 (A1-4) และ R37 (A5-8) ถั่วพู 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R630 (W1-4) ถั่วไม่ทราบชนิด (unknown) 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R812 (U1-4) และ คราม 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R702 (K1-3) และ R394 (K4-6) และ M คือ standard marker: 100BP Ladder DNA marker, Axygen

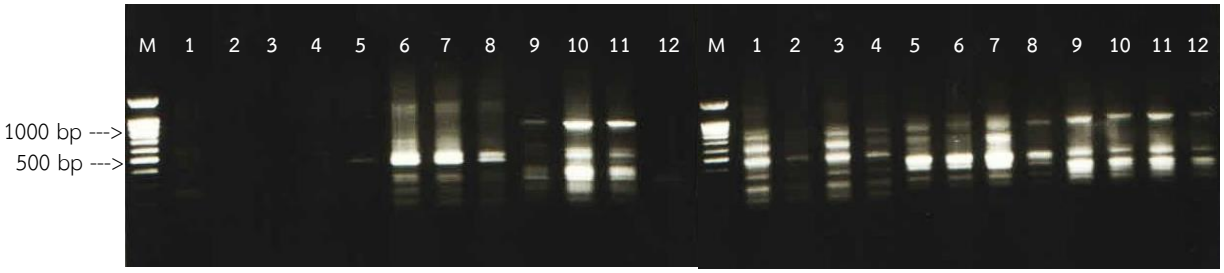


(ก) (ข)

ภาพ 1-2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น จำนวน 2 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ (ก) ถั่วพุ่ม (R1269) และ (ข) ถั่วมะแฮะ (R1336) ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(CA)_6AC$ (a1-a4) และ ISSR primer $(CA)_6GT$ (b5-b8)

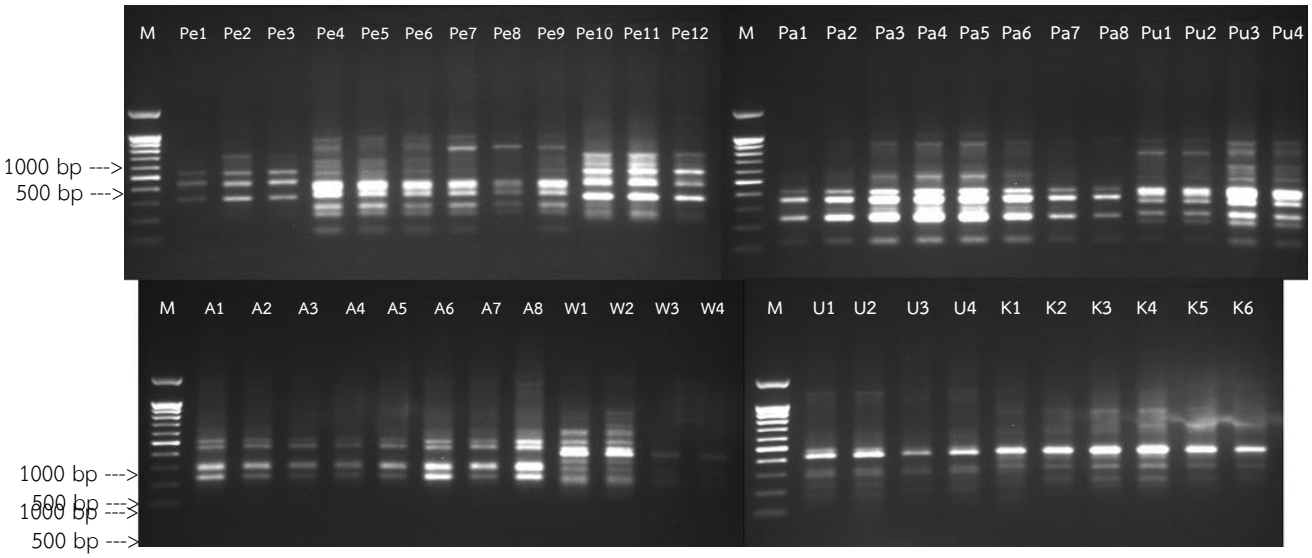


ภาพ 2-1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 13 หมายเลขพันธุ์ ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(AG)_7AAC$ ได้แก่ ถั่วปี 4 หมายเลขพันธุ์ คือ R650 (Pe1-3), R940 (Pe4-6), R476 (Pe7-9) และ R651 (Pe10-12) ถั่วแปบ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R874 (Pa1-4) และ R396 (Pa5-8) ถั่วพุ่ม 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R486 (Pu1-4) อัญชัญ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R23 (A1-4) และ R37 (A5-8) ถั่วพู 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R630 (W1-4) ถั่วไม่ทราบชนิด (unknown) 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R812 (U1-4) และ คราม 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R702 (K1-3) และ R394 (K4-6) และ M คือ standard marker: 100BP Ladder DNA marker, Axygen

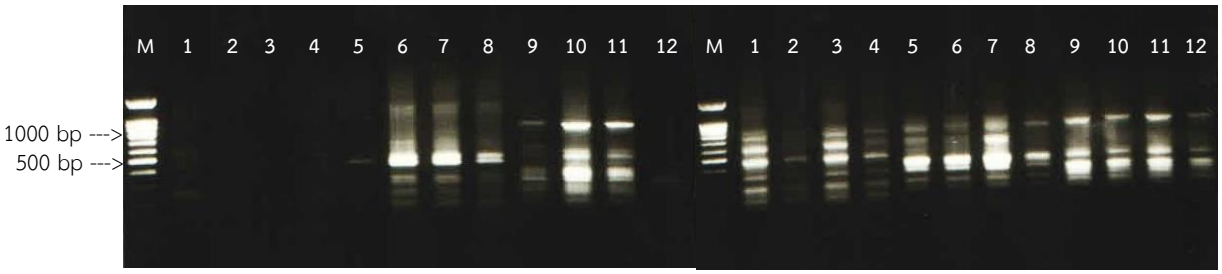


(ก) (ข)

ภาพ 2-2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น จำนวน 2 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ (ก) ถั่วพุ่ม (R1269) และ (ข) ถั่วมะแฮะ (R1336) ที่ได้จาก ISSR primer $(AG)_7$ AAC : (1-4) แ ล ะ ISSR primer $(AG)_7$AAG : (5-8) และ $(AG)_8$C : (9-12)

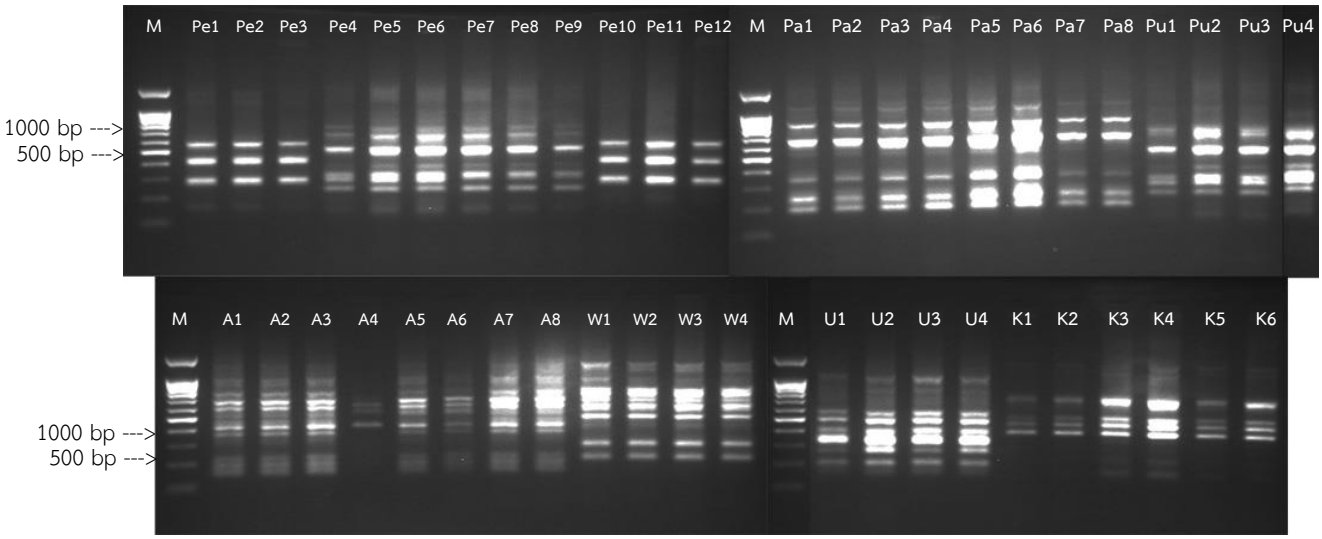


ภาพ 3-1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 13 หมายเลขพันธุ์ ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(AG)_7$AAG ได้แก่ ถั่วปี 4 หมายเลขพันธุ์ คือ R650 (Pe1-3), R940 (Pe4-6), R476 (Pe7-9) และ R651 (Pe10-12) ถั่วแปบ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R874 (Pa1-4) และ R396 (Pa5-8) ถั่วพุ่ม 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R486 (Pu1-4) อัญชัญ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R23 (A1-4) และ R37 (A5-8) ถั่วพู 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R630 (W1-4) ถั่วไม่ทราบชนิด (unknown) 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R812 (U1-4) และ คราม 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R702 (K1-3) และ R394 (K4-6) และ M คือ standard marker: 100BP Ladder DNA marker, Axygen



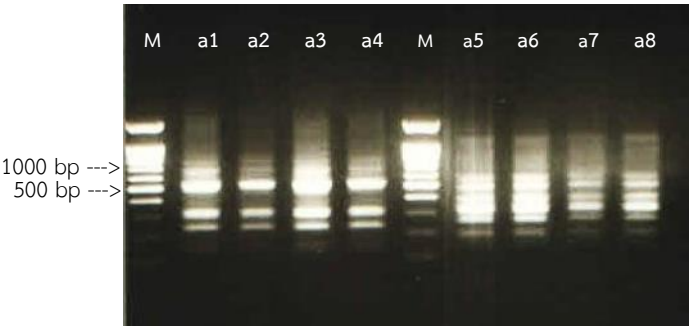
(ก) (ข)

ภาพ 3-2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น จำนวน 2 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ (ก) ถั่วพุ่ม (R1269) และ (ข) ถั่วมะแฮะ (R1336) ที่ได้จาก ISSR primer $(AG)_7AAC$: (1-4) และ ISSR primer $(AG)_7AAG$: (5-8) และ $(AG)_8C$: (9-12)



ภาพ 4-1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 13 หมายเลขพันธุ์ ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(AC)_8C$ ได้แก่ ถั่วปี 4 หมายเลขพันธุ์ คือ R650 (Pe1-3), R940 (Pe4-6), R476 (Pe7-9) และ R651 (Pe10-12) ถั่วแปบ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R874 (Pa1-4) และ R396 (Pa5-8) ถั่วพุ่ม 1

หมายเลขพันธุ์ คือ R486 (Pu1-4) อัญชัญ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R23 (A1-4) และ R37 (A5-8) ถั่วพู 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R630 (W1-4) ถั่วไม่ทราบชนิด (unknown) 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R812 (U1-4) และ คราม 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R702 (K1-3) และ R394 (K4-6) และ M คือ standard marker: 100BP Ladder DNA marker, Axygen



ภาพ 4-2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น จำนวน 2 หมายเลขพันธุ์ ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(AC)_8C$ ได้แก่ ถั่วพุ่ม (R1269) : a5-a8 และ ถั่วมะแฮะ (R1336) : a1-a4

2. พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น ที่อยู่ในวงศ์ LAMIACEAE จำนวน **8** หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ แมงลัก 5 หมายเลขพันธุ์ งาขี้ม้อน 1 หมายเลขพันธุ์ กะเพรา 1 หมายเลขพันธุ์ และโหระพา 1 หมายเลขพันธุ์ พบว่า มี ISSR primer 3 ชนิด ที่สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและตรวจนับจำนวนแถบได้ (ตารางที่ 4) ได้แก่ $(CAC)_3GC$, $(CA)_6AC$ และ $(AG)_7AA$ โดยมีรายละเอียดดังนี้

แมงลัก (*Ocimum africanum* Lour.) จำนวน 5 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จำนวนแถบได้มากที่สุดคือ $(AG)_7AA$ สามารถสังเคราะห์ได้ 10 แถบ มีขนาด 1000-200 คู่เบส แต่ไพรเมอร์ที่พบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างแมงลักทั้ง 5 หมายเลขพันธุ์ ได้สูงที่สุดคือ $(CA)_6AC$ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ 7 แถบ โดยมีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอร้อยละ 71.4 (ภาพที่ 5, 6)

สำหรับงาขี้ม้อน กะเพรา และโหระพา เนื่องจากมีตัวอย่างละ 1 หมายเลขพันธุ์ จึงไม่มีการเปรียบเทียบกันระหว่างหมายเลขพันธุ์ของพืชชนิดเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพาะเมล็ดซึ่งแต่ละเมล็ดแทน 1 ตัวอย่างของแต่ละหมายเลขพันธุ์ และ 1 หมายเลขพันธุ์ มี 3 หรือ 4 ตัวอย่าง ซึ่งหมายถึงดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ด 3 หรือ 4 เมล็ด ถึงแม้ว่าจะเป็นพืชชนิด/พันธุ์เดียวกันก็ตาม ในโครโมโซมนั้นจะมีดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphism) อันเนื่องมาจากการแบ่งตัวในระดับโครโมโซมและดีเอ็นเอระหว่างการสืบพันธุ์นั่นเอง ทำให้อาจเกิดความแตกต่างกันได้ในพืชหมายเลขพันธุ์เดียวกันได้ (ประดิษฐ์, 2543; นิตย์ศรี, 2551) ดังจะเห็นได้จากจำนวนแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สูงสุดในงาขี้ม้อน จำนวน 6 แถบ ซึ่งสังเคราะห์ได้จาก ไพรเมอร์ $(CAC)_3GC$ และ $(AG)_7AA$ และในโหระพา จำนวน 9 แถบ ซึ่งสังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์ $(CA)_6AC$ นั้น ไม่สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ ในขณะที่ไพรเมอร์ $(AG)_7AA$ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอในกะเพราะได้สูงสุด 7 แถบ ขนาด 2000-200 คู่เบส และสามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ร้อยละ 14.3

ตารางที่ 4 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่สามารถสังเคราะห์ได้ชัดเจนและตรวจนับจำนวนแถบได้ในพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น วงศ์ LAMIACEAE

	ISSR primer sequence	Rang of amplicons (bp)	Total no. of bands	No. of monomorphic bands	No. of polymorphic bands	Percent of polymorphism (%)
แมงลัก	$(CAC)_3GC$	1000-500	8	5	3	37.5
Ocimum africanum **Lour.**	$(CA)_6AC$	700-200	7	2	5	71.4
	$(AG)_7AA$	1000-200	10	5	5	50.0
งาขี้ม้อน	$(CAC)_3GC$	1500-300	6	6	0	0
Perilla frutescens **(Linn.) Britton**	$(CA)_6AC$	600-400	2	1	1	50.0
	$(AG)_7AA$	2000-200	6	6	0	0
กะเพรา	$(CAC)_3GC$	1000-300	5	5	0	0

	ISSR primer sequence	Rang of amplicons (bp)	Total no. of bands	No. of monomorphic bands	No. of polymorphic bands	Percent of polymorphism (%)
Ocimum tenuiflorum **L.**	$(CA)_6AC$	1000-400	6	6	0	0
	$(AG)_7AA$	2000-200	7	6	1	14.3
โหระพา	$(CAC)_3GC$	1500-500	7	4	3	42.9
Ocimum basilicum **L**	$(CA)_6AC$	1500-200	9	9	0	0
	$(AG)_7AA$	600-200	7	4	3	42.9

3. พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น ที่อยู่ในวงศ์ UMBELLIFERAE จำนวน **7** หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ ผักชีลาว 5 หมายเลขพันธุ์ หอมแย้หรือผักชีไร่ 1 หมายเลขพันธุ์ และผักชีหอม 1 หมายเลขพันธุ์ พบว่า มี ISSR primer 8 ชนิด ที่สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและตรวจนับจำนวนแถบได้ (ตารางที่ 5) ได้แก่ $(CAC)_3GC$, $(CA)_6AC$, $(GAG)_3GC$, $(CA)_6GT$, $(AG)_7AAG$, $(AG)_8G$, $(GA)_8C$ และ $(CTC)_6$ มีรายละเอียดดังนี้

ผักชีลาว (*Anethum graveolens* L.) จำนวน 5 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จำนวนแถบได้มากที่สุดคือ $(CAC)_3GC$ สามารถสังเคราะห์ได้ 14 แถบ มีขนาด 2000-100 คู่เบส และเป็นไพรเมอร์ที่พบความแตกต่างระหว่างผักชีลาวทั้ง 5 หมายเลขพันธุ์ ได้สูงที่สุด โดยมีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอร้อยละ 64.3 (ตารางที่ 5, ภาพที่ 5)

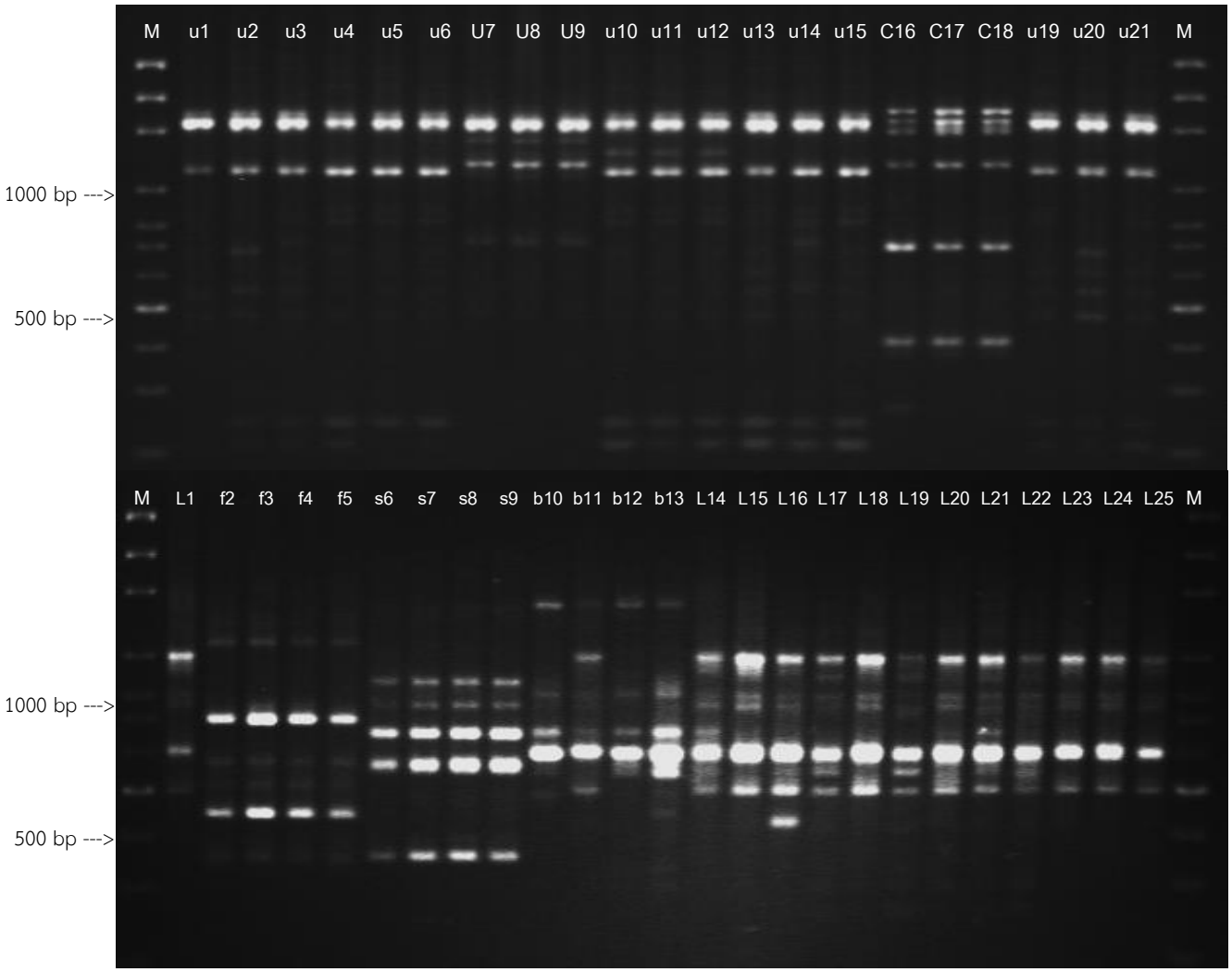
สำหรับหอมแย้/ผักชีไร่ และ ผักชีหอม เนื่องจากมีตัวอย่างละ 1 หมายเลขพันธุ์ จึงไม่มีการเปรียบเทียบกันระหว่างหมายเลขพันธุ์ของพืชชนิดเดียวกัน แต่ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจากเมล็ดซึ่งแต่ละเมล็ดโดย 1 หมายเลขพันธุ์ มี 3 หรือ 4 ตัวอย่าง ซึ่งหมายถึงดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ด 3 หรือ 4 เมล็ด ถึงแม้ว่าจะเป็นพืชชนิด/พันธุ์เดียวกันก็ตาม ในโครโมโซมนั้นจะมีดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphism) อันเนื่องมาจากการแบ่งตัวในระดับโครโมโซมและดีเอ็นเอระหว่างการสืบพันธุ์นั่นเอง ทำให้อาจเกิดความแตกต่างกันได้ในพืชหมายเลขพันธุ์เดียวกัน (ประดิษฐ์, 2543; นิตย์ศรี, 2551) ดังนั้น ถึงแม้ว่าไพรเมอร์ทั้ง 8 ชนิด จะสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอซึ่งสามารถตรวจนับได้ชัดเจน แต่ไม่สามารถแสดงความแตกต่างได้ในหอมแย้/ผักชีไร่ ส่วนในผักชีหอม พบว่า ไพรเมอร์ $(GAG)_3GC$ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้สูงที่สุด จำนวน 12 แถบ ขนาด 2000-200 คู่เบส และสามารถแสดงความแตกต่างได้ร้อยละ 8.3 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่สามารถสังเคราะห์ได้ชัดเจนและตรวจนับจำนวนแถบได้ในพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น วงศ์ UMBELLIFERAE

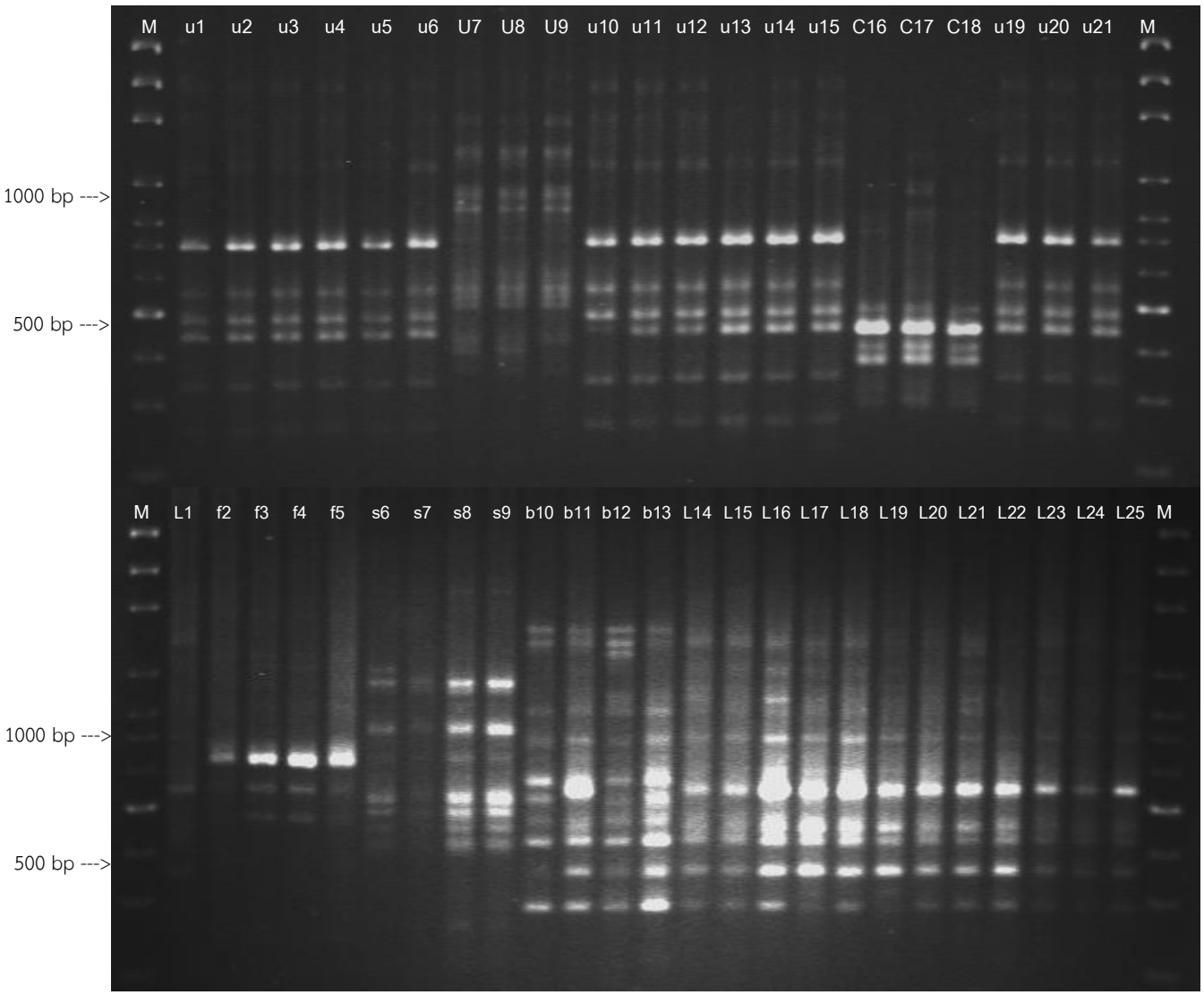
	ISSR primer sequence	Rang of amplicons (bp)	Total no. of bands	No. of monomorphic bands	No. of polymorphic bands	Percent of polymorphism (%)
ผักชีลาว	$(CAC)_3GC$	2000-100	14	5	9	64.3
Anethum graveolens L.	$(GAG)_3GC$	2000-300	11	11	0	0
	$(CA)_6AC$	2000-200	8	8	0	0
	$(CA)_6GT$	2000-600	4	4	0	0
	$(CA)_9A$	800-200	6	5	1	16.7
	$(AG)_8G$	2000-200	7	7	0	0
	$(GA)_8C$	3000-800	7	5	2	28.6
	$(CTC)_6$	2000-400	5	4	1	20.0
หอมแย้/ผักชีไร่	$(CAC)_3GC$	2000-100	7	7	0	0
Coriandrum sp.	$(GAG)_3GC$	2000-300	9	9	0	0
	$(CA)_6AC$	1500-400	9	9	0	0
	$(CA)_6GT$	1000-400	4	4	0	0
	$(CA)_9A$	1000-200	6	6	0	0
	$(AG)_8G$	1500-500	4	4	0	0
	$(GA)_8C$	3000-600	6	6	0	0
	$(CTC)_6$	1000-500	4	4	0	0
ผักชีหอม	$(CAC)_3GC$	2000-300	7	7	0	0
Coriandrum sp.	$(GAG)_3GC$	2000-200	12	11	1	8.3
	$(CA)_6AC$	500-200	5	5	0	0
	$(CA)_6GT$	500-100	6	6	0	0
	$(CA)_9A$	600-200	3	2	1	33.3
	$(AG)_8G$	700-300	4	4	0	0
	$(GA)_8C$	1500-700	7	5	2	28.6
	$(CTC)_6$	1000-200	6	5	1	16.7

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น

วงศ์ LAMIACEAE จำนวน **8** หมายเลขพันธุ์ และ วงศ์ Lamiaceae จำนวน **7** หมายเลขพันธุ์



ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 15 หมายเลขพันธุ์ ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(CAC)_3GC$ ได้แก่ ผักชีลาว 5 หมายเลขพันธุ์ คือ R470 (u1-3), R484 (u4-6), R960 (u10-12), R993 (u13-15) และ R1258 (u19-21) หอมแย้หรือผักชีไร่ 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R1011 (U7-9) ผักชีหอม 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R1035 (C16-18) แมงลัก 5 หมายเลขพันธุ์ คือ R632 (L1), R915 (L14-16), R919 (L17-19), R1115 (L20-22) และR1245 (L23-25) งาขี้ม้อน 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R652 (f2-5) กะเพรา 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R869 (s6-9) และโหระพา 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R871 (b10-13) และ M คือ standard marker: 100BP Ladder DNA marker, Axygen



ภาพ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 15 หมายเลขพันธุ์ ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(CA)_6AC$ ได้แก่ ผักชีลาว 5 หมายเลขพันธุ์ คือ R470 (u1-3), R484 (u4-6), R960 (u10-12), R993 (u13-15) และ R1258 (u19-21) หอมแย้หรือผักชีไร่ 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R1011 (U7-9) ผักชีหอม 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R1035 (C16-18) แมงลัก 5 หมายเลขพันธุ์ คือ R632 (L1), R915 (L14-16), R919 (L17-19), R1115 (L20-22) และR1245 (L23-25) งาขี้ม้อน 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R652 (f2-5) กะเพรา 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R869 (s6-9) และโหระพา 1 หมายเลขพันธุ์ คือ R871 (b10-13) และ M คือ standard marker: 100BP Ladder DNA marker, Axygen

4. พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น ที่อยู่ในวงศ์ SOLANACEAE จำนวน **20** หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ มะแว้งต้น 2 หมายเลขพันธุ์ มะเขือลาย 2 หมายเลขพันธุ์ มะเขือขื่น 4 หมายเลขพันธุ์ มะเขือคางกบ 2 หมายเลขพันธุ์ มะเขือเปราะ 2 หมายเลขพันธุ์ มะอึก 3 หมายเลขพันธุ์ มะเขือยักษ์ 1 หมายเลขพันธุ์ มะเขืออุ๊กจานเดียว 1 หมายเลขพันธุ์ มะเขือเจ้าพระยา 1 หมายเลขพันธุ์ มะเขือใหญ่ 1 หมายเลขพันธุ์ และมะเขืออุ๊กป๊าว 1 หมายเลขพันธุ์ พบว่า มี ISSR primer 9 ชนิด ที่สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและตรวจนับจำนวนแถบได้ (ตารางที่ 6) ได้แก่ $(CAC)_3GC$, $(CA)_6AC$, $(CA)_8GT$, $(AG)_7AA$, $(AG)_8T$, $(AG)_8C$, $(AG)_8G$, $(ATG)_6$ และ $A(CA)_8T$ มีรายละเอียดดังนี้

มะแว้งต้น (*Solanum anguivi* Lam.) จำนวน 2 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้จำนวนสูงที่สุด คือ ไพรเมอร์ $(ATG)_6$ จำนวน 18 แถบ ขนาด 1500-300 คู่เบส และแสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้สูงที่สุดร้อยละ 83.3 (ตารางที่ 6, ภาพที่ 12)

มะเขือขื่น (*Solanum capsicoides* All.) จำนวน 4 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้สูงที่สุดคือไพรเมอร์ $(AG)_8G$ จำนวน 19 แถบ แต่แสดงความแตกต่างได้เพียงร้อยละ 31.6 อย่างไรก็ตาม ไพรเมอร์ $(AG)_8G$ นี้ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เป็น unique band ได้ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 11) สำหรับไพรเมอร์ที่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอในมะเขือขื่นได้และแสดงความแตกต่างได้สูงที่สุดคือไพรเมอร์ $(AG)_7AA$ ตรวจนับได้จำนวน 10 แถบ ขนาด 3000-300 คู่เบส แสดงความแตกต่างได้ร้อยละ 90 (ตารางที่ 6, ภาพที่ 9)

มะเขือลาย (*Solanum* sp.) จำนวน 2 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ $(AG)_8G$ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้จำนวนสูงที่สุดคือ 14 แถบ ขนาด 2000-200 คู่เบส แต่ไม่สามารถแสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 11)ไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้สูงที่สุด คือไพรเมอร์ $A(CA)_8T$ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 9 แถบ ขนาด 1500-200 คู่เบส แสดงความแตกต่างได้ร้อยละ 66.7 (ตารางที่ 6, ภาพที่ 13)

มะเขือคางกบ (*Solanum capsicoides* All.) จำนวน 2 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ $(AG)_8G$ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้จำนวนสูงที่สุดคือ 16 แถบ ขนาด 2500-200 คู่เบส แต่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้เพียงร้อยละ 50 และสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เป็น unique band ได้ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 11) นอกจากนี้ ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอและแสดงความแตกต่างได้สูงคือ ไพรเมอร์ $(CAC)_3GC$ และ $(ATG)_6$ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ 6 และ 11 แถบ ตามลำดับ สามารถแสดงความแตกต่างได้ร้อยละ 83.3 และ 81.89 ตามลำดับ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 1 และ 12)

มะเขือเปราะ (*Solanum capsicoides* All.) จำนวน 2 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ เมอร์ $(AG)_8G$ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้จำนวนสูงที่สุดคือ 13 แถบ ขนาด 2500-200 คู่เบส และสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เป็น unique band ได้ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 11) แต่ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอแสดงความแตกต่างได้สูงสุดคือไพรเมอร์ $(CAC)_3GC$ สามารถแสดงความแตกต่างได้ทั้งหมด (ตารางที่ 6)

มะอึก (*Solanum stramoniifolium* Jacq.) จำนวน 3 หมายเลขพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ $(ATG)_6$ สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้สูงสุดคือ 12 แถบ ขนาด 2000-400 คู่เบส และสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เป็น unique band ได้ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 12) อย่างไรก็ตาม ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอและแสดงความแตกต่างได้มากที่สุดร้อยละ 87.5 คือไพรเมอร์ $(CAC)_3GC$ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 7)

สำหรับมะเขือยักษ์ มะเขือจานเดียว มะเขือเจ้าพระยา มะเขือใหญ่ และมะเขืออุ๊กป๊าว ตัวอย่างละ 1 หมายเลขพันธุ์ จึงไม่มีการเปรียบเทียบกันระหว่างหมายเลขพันธุ์ของพืชชนิดเดียวกัน แต่ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจากเมล็ดโดย 1 หมายเลขพันธุ์ มี 3 หรือ 4 ตัวอย่าง ซึ่งหมายถึงดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ด 3 หรือ 4 เมล็ด ถึงแม้ว่าจะเป็นพืชชนิด/พันธุ์เดียวกันก็ตาม ในโครโมโซมนั้นจะมีดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphism) อันเนื่องมาจากการแบ่งตัวในระดับโครโมโซมและดีเอ็นเอระหว่างการสืบพันธุ์ ทำให้อาจเกิดความแตกต่างกันได้ในพืชหมายเลขพันธุ์เดียวกัน (ประดิษฐ์, 2543; นิตย์ศรี, 2551)

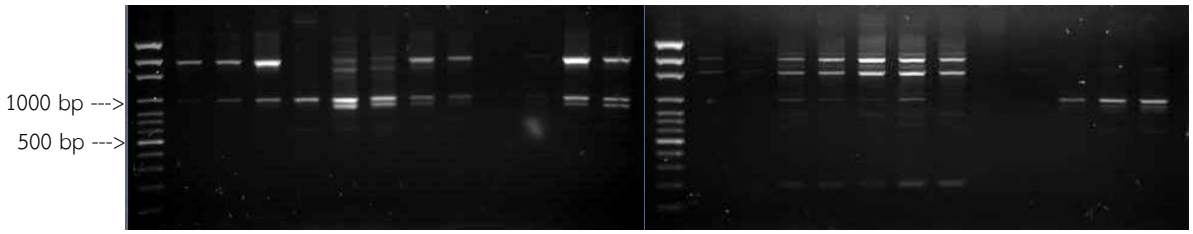
ตารางที่ 6 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่สามารถสังเคราะห์ได้ชัดเจนและตรวจนับจำนวนแถบได้ในพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น วงศ์ SOLANACEAE

	ISSR primer sequence	Rang of amplicons (bp)	Total no. of bands	No. of monomorphic bands	No. of polymorphic bands	Percent of polymorphism (%)
มะแว้งต้น	$(CA)_6AC$	1500-200	5	5	0	0
Solanum anguivi Lam.	$(CA)_6GT$	3000-200	10	5	5	50.0
	$(AG)_7AA$	3000-300	9	9	0	0
	$(AG)_8T$	900-200	4	2	2	50.0
	$(AG)_8G$	1000-200	4	2	2	50.0
	$(ATG)_6$	1500-300	18	3	15	83.3
	$A(CA)_8T$	1500-200	11	10	1	9.1
มะเขือขื่น	$(CA)_6AC$	2000-400	9	3	6	66.7
Solanum capsicoides All.	$(CA)_6GT$	2000-200	5	1	4	80.0
	$(AG)_7AA$	3000-300	10	1	9	90.0
	$(AG)_8T$	900-200	5*	1	3	60.0
	$(AG)_8G$	2500-200	19*	10	6	31.6
	$(ATG)_6$	2000-300	13	5	8	61.5
	$A(CA)_8T$	1500-200	10	4	6	60.0
มะเขือลาย	$(CA)_6AC$	1500-700	3	3	0	0
Solanum sp.	$(CA)_6GT$	1500-200	4*	1	1	25.0

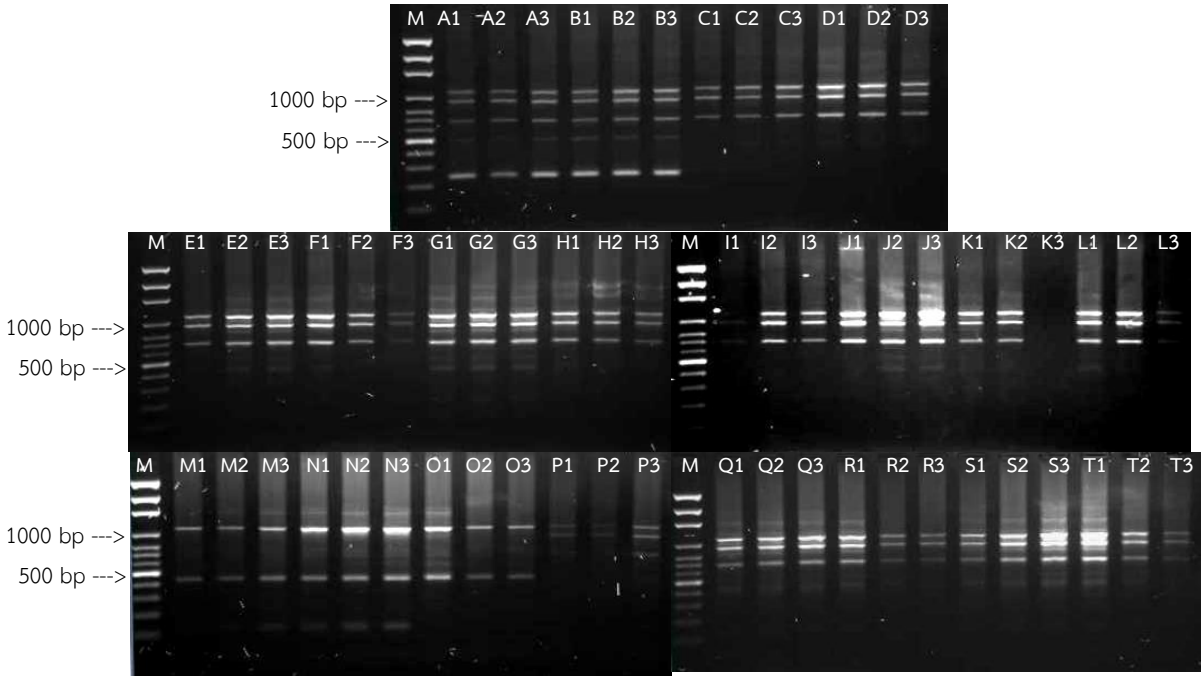
	ISSR primer sequence	Rang of amplicons (bp)	Total no. of bands	No. of monomorphic bands	No. of polymorphic bands	Percent of polymorphism (%)
	$(AG)_7AA$	2000-300	7	5	2	28.6
	$(AG)_8T$	500-200	2	1	1	-
	$(AG)_8G$	2000-200	14	14	0	0
	$(ATG)_6$	1500-300	11*	9	1	9.1
	$A(CA)_8T$	1500-200	9	3	6	66.7
มะเขือคางกบ	$(CAC)_3GC$	3000-600	6	1	5	83.3
Solanum capsicoides All.	$(CA)_6AC$	1000-700	3	3	0	0
	$(AG)_7AA$	1000-300	4	1	3	75.0
	$(AG)_8G$	2500-200	16*	4	8	50.0
	$(ATG)_6$	1500-300	11*	1	9	81.8
มะเขือเปราะ	$(CAC)_3GC$	3000-600	5	0	5	100.0
Solanum capsicoides All.	$(CA)_6AC$	1000-700	3	3	0	0
	$(AG)_7AA$	1000-300	4	2	2	50.0
	$(AG)_8G$	2000-200	13*	5	5	50.0
	$(ATG)_6$	1200-300	7	3	4	57.1
มะอึก	$(CAC)_3GC$	3000-200	8	1	7	87.5
Solanum	$(CA)_6AC$	2000-100	6	2	4	66.7
stramoniifolium Jacq.	$(CA)_6GT$	2000-500	4	1	3	75.0
	$(AG)_7AA$	1000-400	4	4	0	0
	$(AG)_8T$	2000-200	6	1	5	83.3
	$(AG)_8C$	1500-400	8	5	3	37.5
	$(AG)_8G$	1500-200	6	1	5	83.3
	$(ATG)_6$	2000-400	12*	3	8	66.7
	$A(CA)_8T$	1500-200	11	9	2	18.2
มะเขือยักษ์	$(CAC)_3GC$	2000-200	4	2	2	50.0
Solanum sp.	$(CA)_6AC$	1500-100	2	2	0	0
	$(AG)_7AA$	1000-300	6	6	0	0
	$(AG)_8T$	600-200	4	4	0	0
	$(AG)_8C$	2500-100	6*	4	1	16.7
	$(AG)_8G$	1200-500	5*	4	0	0

	ISSR primer sequence	Rang of amplicons (bp)	Total no. of bands	No. of monomorphic bands	No. of polymorphic bands	Percent of polymorphism (%)
	$(ATG)_6$	2000-400	10	8	2	20.0
	$A(CA)_8T$	1500-200	11	11	0	0
มะเขือจานเดียว	$(CA)_6AC$	1500-700	7	7	0	0
Solanum sp.	$(CA)_6GT$	1500-200	2	2	0	0
	$(AG)_7AA$	2000-300	5	5	0	0
	$(ATG)_6$	2500-400	12	12	0	0
	$A(CA)_8T$	1500-200	11	11	0	0
มะเขือเจ้าพระยา	$(CA)_6AC$	1500-700	7*	4	0	0
Solanum capsicoides All.	$(AG)_7AA$	2000-300	5	2	3	60.0
	$(AG)_8T$	500-200	2*	1	0	0
	$(ATG)_6$	2500-400	12*	10	1	8.3
	$A(CA)_8T$	1500-200	9	6	3	33.3
มะเขือใหญ่	$(CA)_6AC$	1500-700	7	6	1	14.3
Solanum sp.	$(AG)_7AA$	2000-300	5*	3	1	20.0
	$(AG)_8T$	500-200	2	2	0	0
	$(ATG)_6$	2500-400	12	11	1	8.3
	$A(CA)_8T$	1500-200	10	8	2	20.0
มะเขืออุ๊กป๊าว	$(CA)_6AC$	1500-700	7*	3	1	14.3
Solanum sp.	$(AG)_7AA$	2000-300	5	5	0	0
	$(AG)_8T$	500-200	2	2	0	0
	$(ATG)_6$	2500-400	12*	9	2	16.7
	$A(CA)_8T$	1500-200	10	10	0	0

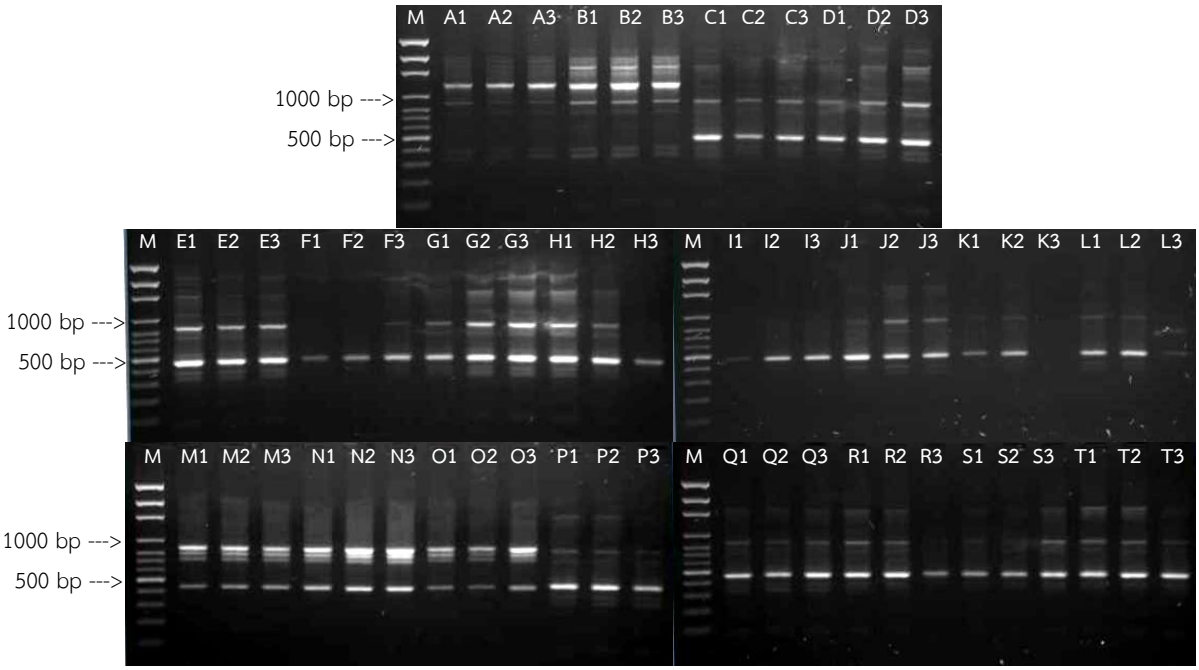
* ปรากฏ unique band



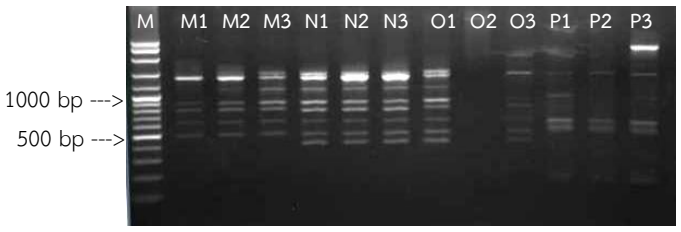
ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 8 หมายเลขพันธุ์ ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(CAC)_3GC$ ได้แก่ มะเขือคางกบ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R1288 (I1-I3) และ R1279 (J4-J6) มะเขือเปราะ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R1048 (K7-K9) และ R1180 (L10-L12) มะอึก 3 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1200 (M1-M3), R1037 (N4-N6) และ R1594 (O7-O9) มะเขือยักษ์ 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R459 (P10-P12) และ M คือ standard marker: 100BP Ladder DNA marker, Axygen



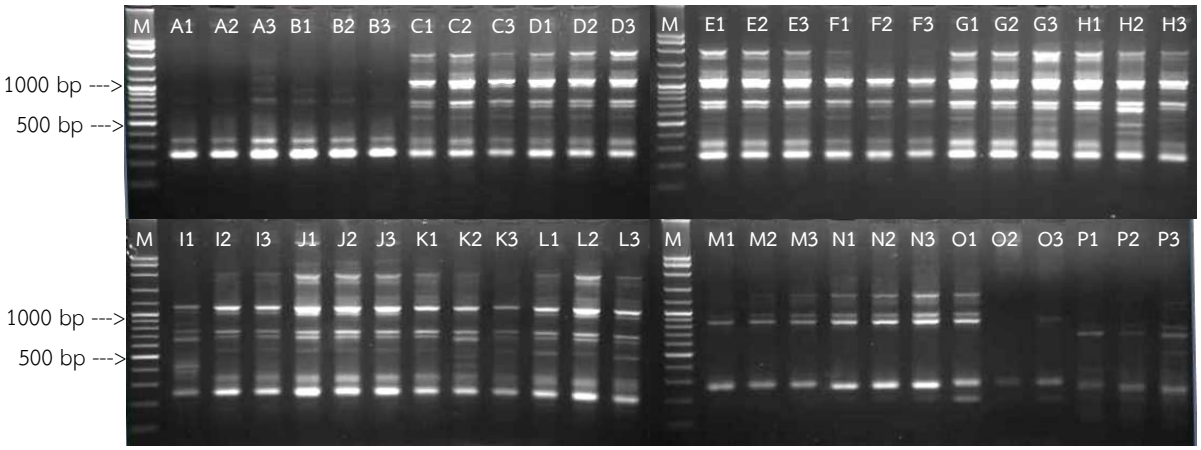
ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 20 หมายเลขพันธุ์ ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(CA)_6AC$ ได้แก่ มะแว้งต้น 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R388 (A1-A3) และ R1205 (B1-B3) มะเขือลาย 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R918 (C1-C3) และ R1402 (D1-D3) มะเขือขื่น 4 หมายเลขพันธุ์ คือ R386 (E1-E3), R1458 (F1-F3), R1097 (G1-G3) และ R1295 (H1-H3) มะเขือคางกบ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R1288 (I1-I3) และ R1279 (J1-J3) มะเขือเปราะ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R1048 (K1-K3) และ R1180 (L1-L3) มะอึก 3 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1200 (M1-M3), R1037 (N1-N3) และ R1594 (O1-O3) มะเขือยักษ์ 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R459 (P1-P3) มะเขือจานเดียว 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1351 (Q1-Q3) มะเขือเจ้าพระยา 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1436 (R1-R3) มะเขือใหญ่ 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1063 (S1-S3) และ มะเขืออุ๊กป๊าว ได้แก่ R1540 (T1-T3) และ M คือ standard marker: 100BP Ladder DNA marker, Axygen



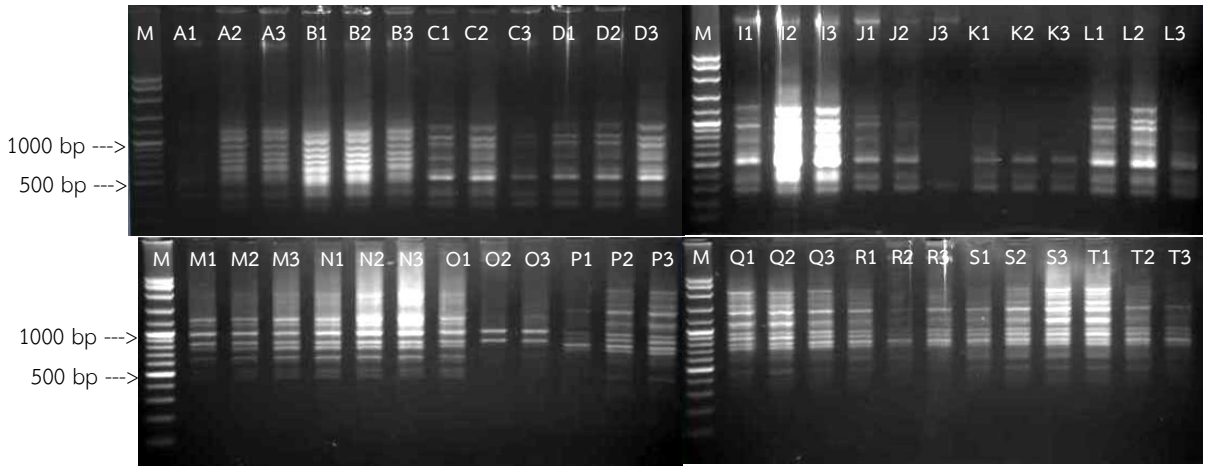
ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 20 หมายเลขพันธุ์ ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(AG)_7AA$ ได้แก่ มะแว้งต้น 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R388 (A1-A3) และ R1205 (B1-B3) มะเขือลาย 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R918 (C1-C3) และ R1402 (D1-D3) มะเขือขื่น 4 หมายเลขพันธุ์ คือ R386 (E1-E3), R1458 (F1-F3), R1097 (G1-G3) และ R1295 (H1-H3) มะเขือคางกบ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R1288 (I1-I3) และ R1279 (J1-J3) มะเขือเปราะ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R1048 (K1-K3) และ R1180 (L1-L3) มะอึก 3 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1200 (M1-M3), R1037 (N1-N3) และ R1594 (O1-O3) มะเขือยักษ์ 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R459 (P1-P3) มะเขือจานเดียว 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1351 (Q1-Q3) มะเขือเจ้าพระยา 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1436 (R1-R3) มะเขือใหญ่ 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1063 (S1-S3) และ มะเขืออุ๊กป๊าว ได้แก่ R1540 (T1-T3) และ M คือ standard marker: 100BP Ladder DNA marker, Axygen



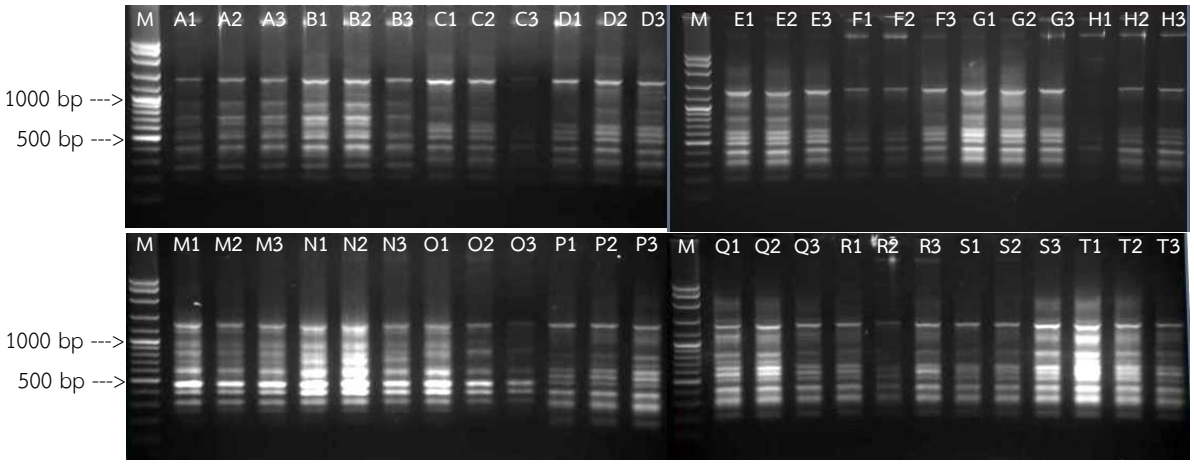
ภาพที่ 10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 5 หมายเลขพันธุ์ ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(AG)_8C$ ได้แก่ มะอึก 3 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1200 (M1-M3), R1037 (N1-N3) และ R1594 (O1-O3) มะเขือยักษ์ 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R459 (P1-P3) และ M คือ standard marker: VC 100bp Plus DNA Ladder, Vivantis



<u>ภาพที่ 11</u> ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 16 หมายเลขพันธุ์ ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(AG)_8G$ ได้แก่ มะแว้งต้น 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R388 (A1-A3) และ R1205 (B1-B3) มะเขือลาย 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R918 (C1-C3) และ R1402 (D1-D3) มะเขือขื่น 4 หมายเลขพันธุ์ คือ R386 (E1-E3), R1458 (F1-F3), R1097 (G1-G3) และ R1295 (H1-H3) มะเขือคางกบ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R1288 (I1-I3) และ R1279 (J1-J3) มะเขือเปราะ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R1048 (K1-K3) และ R1180 (L1-L3) มะอึก 3 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1200 (M1-M3), R1037 (N1-N3) และ R1594 (O1-O3) และ มะเขือยักษ์ 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R459 (P1-P3) และ M คือ standard marker: VC 100bp Plus DNA Ladder, Vivantis



<u>ภาพที่ 12</u> ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 20 หมายเลขพันธุ์ ที่สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $(ATG)_6$ ได้แก่ มะแว้งต้น 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R388 (A1-A3) และ R1205 (B1-B3) มะเขือลาย 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R918 (C1-C3) และ R1402 (D1-D3) มะเขือคางกบ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R1288 (I1-I3) และ R1279 (J1-J3) มะเขือเปราะ 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R1048 (K1-K3) และ R1180 (L1-L3) มะอึก 3 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1200 (M1-M3), R1037 (N1-N3) และ R1594 (O1-O3) มะเขือยักษ์ 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R459 (P1-P3) มะเขือจานเดียว 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1351 (Q1-Q3) มะเขือเจ้าพระยา 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1436 (R1-R3) มะเขือใหญ่ 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1063 (S1-S3) และ มะเขืออุ๊กป๊าว ได้แก่ R1540 (T1-T3) และ M คือ standard marker: VC 100bp Plus DNA Ladder, Vivantis



ภาพที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นจำนวน 16 หมายเลขพันธุ์ สังเคราะห์ได้จาก ISSR primer $A(CA)_8T$ ได้แก่ มะแว้งต้น 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R388 (A1-A3) และ R1205 (B1-B3) มะเขือลาย 2 หมายเลขพันธุ์ คือ R918 (C1-C3) และ R1402 (D1-D3) มะเขือขื่น 4 หมายเลขพันธุ์ คือ R386 (E1-E3), R1458 (F1-F3), R1097 (G1-G3) และ R1295 (H1-H3) มะอึก 3 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1200 (M1-M3), R1037 (N1-N3) และ R1594 (O1-O3) มะเขือยักษ์ 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R459 (P1-P3) มะเขือจานเดียว 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1351 (Q1-Q3) มะเขือเจ้าพระยา 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1436 (R1-R3) มะเขือใหญ่ 1 หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ R1063 (S1-S3) และมะเขืออุ๊กป๊าว ได้แก่ R1540 (T1-T3) และ M คือ standard marker: VC 100bp Plus DNA Ladder, Vivantis

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น จำนวน 50 หมายเลขพันธุ์ 4 วงศ์ (Family) คือ LEGUMINOSAE LAMIACEAE UMBELLIFERAE และ SOLANACEAE จากธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (Gene Bank) สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ. ปทุมธานี ประเทศไทย โดยใช้เทคนิค ISSR และใช้ ISSR primer จำนวน 20 ชนิด พบว่า

1. พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น ที่อยู่ในวงศ์ LEGUMINOSAE จำนวน **15** หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ ถั่วปี 4 หมายเลขพันธุ์ ถั่วแปบ 2 หมายเลขพันธุ์ อัญชัญ 2 หมายเลขพันธุ์ คราม 2 หมายเลขพันธุ์ ถั่วพู 1 หมายเลขพันธุ์ ถั่วพุ่ม 2 หมายเลขพันธุ์ ถั่วมะแฮะ 1 หมายเลขพันธุ์ และ ถั่วไม่ทราบชนิด (unknown) 1 หมายเลขพันธุ์ สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและตรวจนับจำนวนแถบได้จาก ISSR primer 6 ชนิด ได้แก่ $(CA)_6GT$, $(GA)_6CC$, $(AG)_7AAC$, $(AG)_7AAG$, $(AC)_8C$ และ $(ATG)_6$ สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้สูงที่สุดในถั่วปี คิดเป็นร้อยละ 100

2. พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น ที่อยู่ในวงศ์ LAMIACEAE จำนวน **8** หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ แมงลัก 5 หมายเลขพันธุ์ งาขี้ม้อน 1 หมายเลขพันธุ์ กะเพรา 1 หมายเลขพันธุ์ และโหระพา 1 หมายเลขพันธุ์ สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและตรวจนับจำนวนแถบได้จาก ISSR primer 3 ชนิด ได้แก่ $(CAC)_3GC$, $(CA)_6AC$ และ $(AG)_7AA$ สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้สูงที่สุดในแมงลัก คิดเป็นร้อยละ 71.4

3. พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น ที่อยู่ในวงศ์ UMBELLIFERAE จำนวน **7** หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ ผักชีลาว 5 หมายเลขพันธุ์ หอมแย้หรือผักชีไร่ 1 หมายเลขพันธุ์ และผักชีหอม 1 หมายเลขพันธุ์ สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและตรวจนับจำนวนแถบได้ ISSR primer 8 ชนิด ได้แก่ $(CAC)_3GC$, $(CA)_6AC$, $(GAG)_3GC$, $(CA)_6GT$, $(AG)_7AAG$, $(AG)_8G$, $(GA)_8C$ และ $(CTC)_6$ สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้สูงที่สุดในผักชีลาว คิดเป็นร้อยละ 64.3

4. พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น ที่อยู่ในวงศ์ SOLANACEAE จำนวน **20** หมายเลขพันธุ์ ได้แก่ มะแว้งต้น 2 หมายเลขพันธุ์ มะเขือลาย 2 หมายเลขพันธุ์ มะเขือขื่น 4 หมายเลขพันธุ์ มะเขือคางกบ 2 หมายเลขพันธุ์ มะเขือเปราะ 2 หมายเลขพันธุ์ มะอึก 3 หมายเลขพันธุ์ มะเขือยักษ์ 1 หมายเลขพันธุ์ มะเขืออุ๊กจานเดียว 1 หมายเลขพันธุ์ มะเขือเจ้าพระยา 1 หมายเลขพันธุ์ มะเขือใหญ่ 1 หมายเลขพันธุ์ และมะเขืออุ๊กป๊าว 1 หมายเลขพันธุ์ สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและตรวจนับจำนวนแถบได้ จาก ISSR primer 9 ชนิด ได้แก่ $(CAC)_3GC$, $(CA)_6AC$, $(CA)_8GT$, $(AG)_7AA$, $(AG)_8T$, $(AG)_8C$, $(AG)_8G$, $(ATG)_6$ และ $A(CA)_8T$ สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้สูงที่สุดในมะเขือขื่น คิดเป็นร้อยละ 90

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองไปเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อสนับสนุนการจัดทำฐานข้อมูลพืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นที่นำมาศึกษา ให้กับกลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

2. สามารถนำวิธีการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้ ไปปรับใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของพืชชนิดอื่น ๆ ต่อไป

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ผู้ทำวิจัย ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์พืชทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Gel documentation) ในการบันทึกภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการทดลองครั้งนี้

12. เอกสารอ้างอิง

จรัสศรี นวลศรี. 2549. การศึกษาพันธุกรรมพืชผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองภาคใต้ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล. http://natres.psu.ac.th/project/molakul.htm (15/10/11)

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2551. พันธุศาสตร์พืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 432 หน้า

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 398 หน้า

ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์. 2547. ก้าวไกลไปกับเทคโนโลยีชีวภาพ. จุลสารสวนพฤกษศาสตร์โรงเรียน 9(4): 5.

สุรพล แสนสุข. 2554. พืชถิ่นเดียวและพืชหายากของวงศ์ขิง-ข่าในประเทศไทย. วารสารวิจัย มข. 16(3): 306-330.

Bornet, B. and M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant molecular biology reporter 19: 209-215.

Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T., Mokkamul, P., Sattayasai, N., and J. Sattayasai. 2008. Wo new species of *Curcuma* (Zingiberaceae) used as cobra-bite antidotes. Journal of Systematics and Evolution 46 (1): 80-88.

Sukrong, S., Phadungcharoen, T., and N. Ruangrungsi. 2005. DNA fingerprinting of medicinally used Derris species by RAPD molecular marker. *Thai Journal* of Pharmaceutical Sciences 29(3-4): 155-163.

Syamkumar, S. and B. Sasikumar. 2007. Molecular marker based genetic diversity analysis of *Curcuma* species from India. Scientia Horticulturae 112 (2): 235-241

Takano, A 2003. Clonal structure in Globba leucantha var. bicolor populations inferred from inter-simple sequence repeats (ISSR). p. 139-144. *In* Proceedings of the 3rd Symposium on the Family Zingiberaceae, Applied Taxonomic Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand,