

## ภาคผนวก

### การเตรียมสารละลาย

#### 1. 1M Tris-HCl

ละลาย Tris base 121 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH โดยใช้กรด HCl เข้มข้นจนกระทั่งได้ pH ที่ต้องการแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

#### 2. 0.5M EDTA

ชั่ง Disodium ethylenediaminetetraacetic acid  $2H_2O$  136.1 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนอย่างแรง เติมเกล็ด NaOH ลงไปจนได้ pH เท่ากับ 8.0 ผง EDTA จะละลายหมดพอดี ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

#### 3. 10% SDS

ละลาย Sodium dodecyl sulfate 10 กรัม ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว อาจต้องอุ่นน้ำเล็กน้อยเพื่อให้ SDS ละลายดีขึ้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 4. Ethidium bromide (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่ง Ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer เก็บสารละลายไว้ในขวดสีเข้มหรือห่อด้วย foil ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 5. 5M NaCl

ละลายสาร NaCl 29.2 กรัม ในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

#### 6. DNA Loading Buffer

0.25% bromophenol blue

0.25% xylene cyanol FF

40% (w/v) sucrose

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ตามที่ต้องการ เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 7. Phenol

Phenol	100	มิลลิลิตร
8 - Hydroxy quinoleine sulfate	400	มิลลิลิตร
0.1M และ 1M Tris-HCl pH 8.0	200	มิลลิลิตร
$\beta$ -mercaptoethanol	200	ไมโครลิตร

นำ phenol มาหลอมละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แล้วเติม 8- Hydroxy quinoleine sulfate และ 1M Tris-HCl pH 8.0 กวนอย่างแรงด้วย magnetic stirrer นาน 5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วดูดเอา aqueous phase ชั้นบนออก จากน้ำเติม 1M Tris-HCl pH 8.0 เพื่อทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จนกระทั่ง pH ของ phenol มากกว่า 7.8 จึงเติม  $\beta$ -mercaptoethanol และ 0.1M Tris-HCl pH 8.0 เพื่อปิดผิวสารละลาย และเก็บสารละลายไว้ในขวดสีเข้มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 8. TE buffer

10mM Tris-HCl pH 8.0

0.5mM EDTA pH 8.0

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

## 9. 5x TBE buffer (Tris borate/EDTA buffer)

Tris base 54 กรัม

Boric acid 57.5 กรัม

0.5M EDTA (pH8.0) 20 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิห้อง

10. Lambda DNA/*Pst* I marker

17.34  $\mu$ g Lambda DNA (บริษัท Gibthai)

1x *Pst* I Buffer (บริษัท Gibthai)

10 Unit *Pst* I (บริษัท Gibthai)

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 80 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 – 5 ชั่วโมง เก็บสารละลายไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ตาราง 1 ไพรมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรมอร์	ลำดับเบส 5' → 3'			
OPB15	CCT	CCT	TCT	C
OPG15	ACT	GGG	ACT	C
OPG18	GGC	TCA	TGT	G
OPG20	TCT	CCC	TCA	G
OPA07	GAA	ACG	GGT	G
OPA08	GTG	ACG	TAG	G
OPB20	CTT	CTC	GGA	C
OPA11	CAA	TCG	CCG	T
OPA20	GTT	GCG	ATC	C
OPAQ06	ACG	GAT	CCC	C
OPAQ12	CAG	CTC	CTG	T
OPAB04	GGC	ACG	CGT	T
OPAX17	TGG	GCT	CTG	G
OPG13	CTC	TCC	GCC	A
OPG14	GGA	TGA	GAC	C
OPV08	GGA	CGG	CGT	T

ตาราง 2 การปรากฏแถบและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของกระดิว 27 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้เฟอเมอร์ OPA20 ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบดีเอ็นเอ = 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ = 0

จำนวน ยุง(ในชุด Op.)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Cm	KJ	KK	CHUP	FG	BS	BC	S	TTS	PTR	PT	BK	BL	H	TH	KB	NK	MK	KL	C8	C9
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
2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
4	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
5	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
6	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	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
8	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
9	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
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
11	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
13	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
14	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
15	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
16	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
17	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
18	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
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
20	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
21	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
25	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
26	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
27	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
29	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	0	1

ตาราง 2 (ต่อ) การปรากฏแถบและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอแต่ละตำแหน่งจากลาพิมพีดีเอ็นเอ ของกระเจียว 27 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA20 ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบดีเอ็นเอ = 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ = 0

จำนวน ชนิดไม้(Sp.)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Cm	KJ	KK	CMUP	TG	BS	BC	S	TTS	PTR	PT	BK	BL	H	TH	KB	NK	MK	KI	CB	C9
30	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
31	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
32	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
34	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
37	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
39	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
40	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
41	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1

ตาราง 3 การปรากฏแถบและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของกระเจียว 27 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD

ที่ใช้พรอมอร์ OPAX17 ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบดีเอ็นเอ = 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ = 0

ลำดับที่	ขนาดโมลกุล (bp)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Cm	Kf	Kk	CMUP	TG	BS	BC	S	TIS	PFR	PT	BK	BL	H	TH	KB	NK	MK	KL	C8	C9
1	540	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	555	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	585	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	
4	720	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	770	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
6	805	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	
7	960	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
8	990	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	
9	1093	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	
10	1110	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	
11	1159	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
12	1200	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	
13	1290	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14	1380	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	
15	1440	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	
16	1650	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	
17	1700	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	
18	1830	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	
19	1880	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	
20	1986	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	
21	2070	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	









ตาราง 7 การปรากฏแถบและไม่ปรากฏแถบสีเอ็นเอแต่ละตำแหน่งจากถายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของกระเจียว 27 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD

ที่ใช้พรเมอร์ OPAB04 ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบดีเอ็นเอ = 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ = 0

ตำแหน่ง	ขนาดโมเลกุล (bp)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Cm	KJ	KK	GMUP	IG	BS	BC	S	TTS	FTR	FT	BK	BL	H	TH	KB	NK	MIK	KL	CS	C9
1	330	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2	385	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
3	405	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	525	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
5	570	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
6	750	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
7	805	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
8	810	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
9	1020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
10	1020	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
11	110	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
12	1230	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
13	1620	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
14	1700	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
15	2280	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16	3090	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0



ตาราง 9 การปรากฏแถบและไม่ปรากฏแถบสีเขียวแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของกระดิว 27 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้พรอมอร์ OPG14 ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบดีเอ็นเอ = 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ = 0

ลำดับ จำนวน ไมโคร (bp.)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Cm	KJ	KK	CMUP	TG	BS	BC	S	TTS	PTR	PT	BK	BL	H	TH	KB	NK	MK	KL	CS	C9
1	270	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	380	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
3	405	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	448	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
5	468	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
6	660	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
7	690	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
8	720	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
9	735	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	990	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
11	960	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
12	1050	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
13	1080	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
14	1095	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
15	1500	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
16	1159	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
17	1185	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
18	1460	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
19	1480	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1620	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	1740	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
22	1860	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล นางสาวจรัสศรี แก่นเมือง  
วัน เดือน ปี เกิด 20 พฤศจิกายน 2516  
ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาชั้นประถมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนบ้านแม่ต้านราษฎร์บำรุง  
อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก  
สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนท่าสองยางวิทยาคม  
อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก  
สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนผดุงปัญญา  
จังหวัดตาก  
สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน  
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2540

ประสบการณ์ในการทำงาน

- งานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- งานด้านอนุชีวโมเลกุล

ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2540 จนถึงปัจจุบัน

ที่อยู่ 123 หมู่ 1 ตำบลแม่ต้าน อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก 63150  
โทร. (055) 589154