Thai Journal of Genetics 2008, 1(2) : 122 – 127

การจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพีและสการ์

Identification of sugar apple cultivars Nua and Nang using AFLP and SCAR markers

นฤมล ธนานันต์[1] และ ธีระชัย ธนานันต์[2]*

Narumol Thanananta[1] and Theerachai Thanananta[2]*

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 13180

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

[1]Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage, Khlong Luang, Pathum Thani 13180, Thailand.

[2]Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Campus, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand.

**Corresponding authors: thana@tu.ac.th*

บทคัดย่อ

การตรวจสอบน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่าไพรเมอร์ *Eco*RI-*Mse*I ที่ใช้ทั้งหมด 64 คู่ สามารถให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยพบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ และพันธุ์หนังรวมทั้งสิ้น 8 แถบ ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายเอเอฟแอลพี ในการจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังออกจากกันได้ นอกจากนั้นยังได้พัฒนาเครื่องหมายสการ์ จากเครื่องหมายเอเอฟแอลพี 4 ชนิด ซึ่งพบเครื่องหมายสการ์ที่จำเพาะกับน้อยหน่าพันธุ์เนื้อเพียงอย่างเดียว

ABSTRACT

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique was used to identify sugar apple (*Annona squamosa* L.) cultivars Nua and Nang. The total of 64 *Eco*RI-*Mse*I primer-pair combinations were screened and all of them could produce DNA fingerprinting. Eight AFLP markers were clearly polymorphic among the 2 cultivars which were capable to distinguish the sugar apple varieties between Nua and Nang. Four polymorphic AFLP fragments were subsequently cloned and sequenced for sequence characterized amplified

region (SCAR) primer design. The primers were tested with individual DNA samples and the result showed the polymorphisms that were identified from the SCAR markers with specific to only sugar apple variety Nua.

คำสำคัญ: น้อยหน่า, *Annona squamosa* L., เอเอฟแอลพี, สการ์
Keywords: Sugar apple, *Annona squamosa* L., AFLP, SCAR

บทนำ

น้อยหน่า (*Annona squamosa* L.) เป็นไม้ผลเมืองร้อนขนาดกลาง ลำต้นสูงประมาณ 3-6 เมตร มีแหล่งกำเนิดบริเวณแถบร้อนและแห้งแล้งที่สุดของทวีปอเมริกากลาง และที่ราบสูงของประเทศเปรูและอิคัวดอร์ (Morton, 1987; Phillip and Campbell, 1994) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินแทบทุกชนิดที่ไม่มีน้ำขัง จึงปลูกแพร่หลายในเขตร้อนและเขตอบอุ่นทั่วโลก ในอดีตนักเดินเรือชาวโปรตุเกสและอังกฤษเป็นผู้นำไปปลูกในประเทศต่างๆ ที่เดินเรือไปถึง จากหลักฐานพบว่ามีการนำน้อยหน่าพันธุ์เนื้อหรือฝ้ายเข้ามาปลูกครั้งแรกในประเทศไทย ที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยาและลพบุรี ในพุทธศตวรรษที่ 21-22 และในปี พ.ศ. 2475 มีการนำน้อยหน่าพันธุ์หนังจากประเทศเวียดนาม เข้ามาปลูกครั้งแรกที่จังหวัดอุบลราชธานี (เกศิณี, 2530) ปัจจุบันมีแหล่งเพาะปลูกน้อยหน่าเพื่อการค้าที่สำคัญ ได้แก่ นครราชสีมา อุบลราชธานี สระบุรี ลพบุรี นครปฐม ราชบุรี เป็นต้น

น้อยหน่าเป็นผลไม้ที่มีรสชาติดี หวาน กลิ่นหอม และให้พลังงานสูง จึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั่วไป โดยรับประทานในรูปผลสุกหรือทำเป็นของหวาน อาหารว่าง ไอศกรีม และผสมเครื่องดื่ม นอกจากนี้ส่วนต่างๆ ของน้อยหน่า เช่น ใบ ราก เมล็ด และผลดิบ ยังมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคและยาฆ่าแมลง ได้แก่ ยาแก้อักเสบ ยาถ่ายพยาธิ ยาฆ่าเหา เป็นต้น (พันธิตร์, 2548)

น้อยหน่าเป็นพืชที่ปลูกและขยายพันธุ์ได้ง่าย เพราะมีเมล็ดมาก ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี ไม่ค่อยมีปัญหาเกี่ยวกับโรคและแมลงศัตรูพืช จึงพบปลูกกระจายแทบทุกจังหวัดของประเทศไทย แม้ว่าน้อยหน่าจะมีดอกสมบูรณ์เพศ แต่เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียภายในดอกเดียวกันจะไม่สามารถผสมพันธุ์กันเนื่องจากเจริญเติบโตไม่พร้อมกัน ดังนั้นจึงมีการผสมพันธุ์ข้ามดอกเสมอ และอาจมีการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์เนื้อกับพันธุ์หนังได้ถ้าปลูกไว้ใกล้กัน ซึ่งทำให้เกิดน้อยหน่าลูกผสมมากมาย (เกศิณี, 2530) ปัจจุบันเริ่มมีผู้สนใจการปรับปรุงพันธุ์น้อยหน่ามากขึ้น เนื่องจากน้อยหน่ามีราคาสูงเมื่อเทียบกับผลไม้อื่น และกำลังจะกลายเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง เพราะมีมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี นอกจากนี้ยังมีลู่ทางในการขยายตลาดออกไปได้อีกมาก ซึ่งถ้ามีการปรับปรุงพันธุ์หรือผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีขึ้น และเป็นที่ต้องการของตลาด ก็จะได้เปรียบในการแข่งขันกับประเทศผู้ผลิตอื่น เช่น เม็กซิโก บราซิล คิวบา ฟิลิปปินส์ อินเดีย จีน โพลีนีเซีย สหรัฐอเมริกา เป็นต้น โดยน้อยหน่าลูกผสมที่ปรับปรุงพันธุ์หรือผสมพันธุ์มาได้ จำเป็นต้องมีการจดทะเบียนพันธุ์พืชเพื่อป้องกันการแอบอ้างหรือขโมย

ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า สามารถจำแนกสิ่งมีชีวิตได้แม่นยำและจำเพาะสูง รวมทั้งมีการประยุกต์ใช้กับพืชหลายชนิด (Powell *et al*., 1996) ในพืชสกุลน้อยหน่าก็มีการประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเช่นกัน โดยมีรายงานการวิจัยการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลซ์ (microsatellites) หรือเอสเอสอาร์ (SSRs, simple sequence repeats) ใน *Annona cherimola* Mill. (Escribano *et al*., 2004) และ *Annona senegalensis*

Pers. (Kwapata *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในน้อยหน่า ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงประยุกต์เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของน้อยหน่า และพัฒนาเครื่องหมายสการ์ (SCAR, sequence characterized amplified region) ที่สามารถจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอน้อยหน่า

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ 10 ต้น และพันธุ์หนัง 10 ต้น ที่รวบรวมจากแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญของประเทศไทย 6 จังหวัด คือ อุบลราชธานี นครราชสีมา สระบุรี ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา และลพบุรี ด้วยวิธีประยุกต์จาก Agrawal *et al.* (1992) แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al.*, 1989)

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยหน่าด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

รวมดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ 10 ต้น เป็นตัวอย่างเดียวกัน และรวมดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์หนัง 10 ต้น เป็นตัวอย่างเดียวกัน แล้วนำไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

(1) การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับอะแดพเตอร์ (adapter) โดยตัดดีเอ็นเอ 250 นาโนกรัม ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I ชนิดละ 2.5 ยูนิต ในบัฟเฟอร์ (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate และ 50 mM potassium acetate) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อเข้ากับ *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter (ตารางที่ 1) ความเข้มข้นละ 250 และ 2,500 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (1 mM ATP, 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT และ 50 ng/ml BSA) แล้วเจือจางให้เป็น 20 เท่า ด้วยบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)

(2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ขั้นตอน คือ preselective amplification และ selective amplification นำชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับอะแดพเตอร์และเจือจางมา 2.5 ไมโครลิตร แล้วเพิ่มปริมาณด้วย preselective primer 2 ชนิด คือ E-A และ M-C (ตารางที่ 1) ชนิดละ 200 นาโนโมลาร์ ในบัฟเฟอร์พีซีอาร์ 1 เท่า (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 1.5 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 160 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.5 ยูนิต แล้วทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของอะแดพเตอร์และไพรเมอร์

อะแดพเตอร์หรือไพรเมอร์	ลำดับเบส
*Eco*RI adapter	5′-CTCGTAGACTGCGTACC-3′
	3′-CATCTGACGCATGGTTAA-5′
*Mse*I adapter	5′-GACGATGAGTCCTGAG-3′
	3′-TACTCAGGACTCAT-5′
E-A primer	5′-GACTGCGTACCAATTCA-3′
M-C primer	5′-GATGAGTCCTGAGTAAC-3′

วินาที, 52 °C เป็นเวลา 1 นาที และ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 20 รอบ หลังจากนั้นจึงเจือจาง preselective amplification ด้วยบัฟเฟอร์ TE ให้เป็น 20 เท่า

นำ preselective amplification ที่เจือจางมา 5 ไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณด้วย selective primer ซึ่งประกอบด้วย E-ANN 8 ชนิด (E-AAC, E-AAG, E-ACA, E-ACC, E-ACG, E-ACT, E-AGC, E-AGG) และ M-CNN 8 ชนิด (M-CAA, M-CAC, M-CAG, M-CAT, M-CTA, M-CTC, M-CTG, M-CTT) โดยใช้ครั้งละ 2 ชนิด คือ E-ANN และ M-CNN อย่างละ 1 ชนิด ชนิดละ 250 นาโนโมลาร์ ในบัฟเฟอร์พีซีอาร์ 1 เท่า ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ และมีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.5 ยูนิต ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้ selective primer ทั้งหมด 64 คู่ ทำปฏิกิริยา touch down PCR ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 65 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 12 รอบ แต่ละรอบจะลดอุณหภูมิ annealing จาก 65 °C ลงรอบละ 0.7 °C จนถึง 56 °C หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 56 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 23 รอบ

(3) ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะคริลาไมด์ 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

การพัฒนาเครื่องหมายสการ์

ตัดแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ น้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนัง มาเชื่อมต่อกับ pGEM®-T Easy Vector และโคลนใน *E. coli* JM109 แล้วนำไปหาลำดับดีเอ็นเอและออกแบบไพรเมอร์ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว จากนั้นจึงนำไพรเมอร์ที่ได้ไปตรวจสอบกับดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ 10 ต้น และพันธุ์หนัง 10 ต้น ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอน้อยหน่า 100 นาโนกรัม ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด ชนิดละ 250 นาโนโมลาร์ ในบัฟเฟอร์พีซีอาร์ 1 เท่า ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต ปฏิกิริยาพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอน คือ (1) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที (2) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 56 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และ (3) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที แล้วนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.0 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยหน่าที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพีซึ่งใช้ดีเอ็นเอรวม โดยตรวจหาเครื่องหมายเอเอฟแอลพี ที่สามารถใช้จำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนัง แล้วตรวจสอบซ้ำกับดีเอ็นเอน้อยหน่าแต่ละต้น หลังจากนั้นจึงพัฒนาเครื่องหมายสการ์ และนำมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ 10 ต้น และพันธุ์หนัง 10 ต้น

ผลการทดลองและวิจารณ์

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนัง ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์ 64 คู่ พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 64 คู่ สามารถให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอ 8 แถบ จากไพรเมอร์ 8 คู่ ขนาดประมาณ 140-550 คู่เบส ที่ให้ความแตกต่างในลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนัง โดยจำเพาะกับน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ 4 แถบ และพันธุ์หนัง 4 แถบ (ตารางที่ 2) และเมื่อตรวจสอบซ้ำกับดีเอ็นเอน้อยหน่าแต่ละต้น (ดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ 10 ต้น และพันธุ์หนัง 10 ต้น) ก็ให้ผลเช่นเดิม

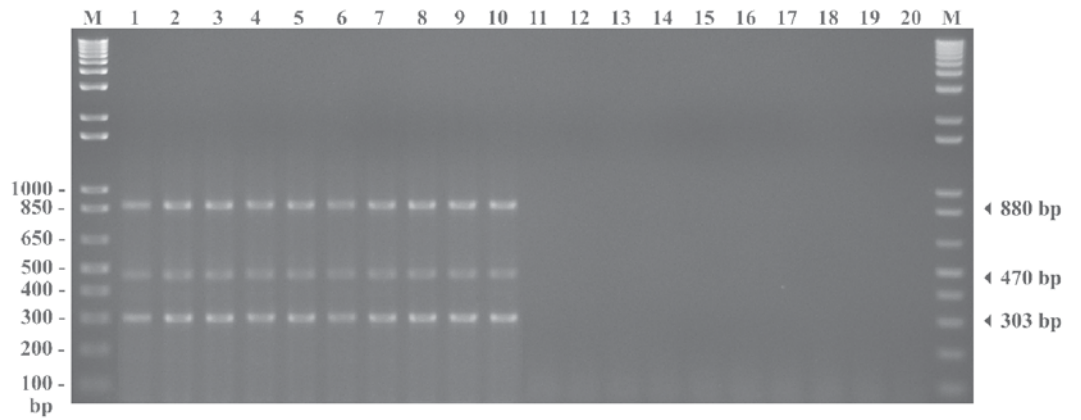
เมื่อตัดแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนัง ซึ่งมีขนาด 450-550 คู่เบส นำมาโคลน

ตารางที่ 2 แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับน้อยหน่าซึ่งพบในลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี

คู่ไพรเมอร์	ขนาดแถบดีเอ็นเอ (คู่เบส)	พันธุ์น้อยน่าที่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอ
E-ACA + M-CTC	150	น้อยหน่าพันธุ์หนัง
E-ACA + M-CTT	140	น้อยหน่าพันธุ์เนื้อ
E-ACC + M-CAA	550	น้อยหน่าพันธุ์เนื้อ
E-ACC + M-CAG	450	น้อยหน่าพันธุ์เนื้อ
E-ACT + M-CTA	175	น้อยหน่าพันธุ์เนื้อ
E-ACT + M-CTC	450	น้อยหน่าพันธุ์หนัง
E-ACT + M-CTG	525	น้อยหน่าพันธุ์หนัง
E-AGG + M-CTA	140	น้อยหน่าพันธุ์หนัง

และหาลำดับดีเอ็นเอ แล้วออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบกับดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ 10 ต้น และพันธุ์หนัง 10 ต้น พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ACC + M-CAG และจำเพาะกับน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5′ CAACCTGCTCAAGTTATGAGG 3′ และ 5′ AGCCCTCAGCTTGTCCTCC 3′ นั้น ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 303 คู่เบส ที่จำเพาะกับน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ (ภาพที่ 1) และเมื่อตรวจสอบซ้ำจำนวน 5 รอบ ก็ให้ผลเช่นเดิม อย่างไรก็ตามไพรเมอร์คู่นี้ยังให้แถบดีเอ็นเอขนาด 470 และ 880 คู่เบส ที่จำเพาะกับน้อยหน่าพันธุ์เนื้อโดยไม่ได้คาดหวังมาก่อน

จากการทดลองแสดงว่าสามารถใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี จำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังได้ เช่นเดียวกับบัวหลวง (นฤมล และ ธีระชัย, 2550) ไผ่ (Loh *et al*., 2000) กล้วย (Wong *et al*., 2001) มะม่วง (Kashkush *et al*., 2001) หรือพืชนิดอื่นๆ และสามารถใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี และเครื่องหมายสการ์นี้ในการระบุพันธุ์น้อยหน่า ซึ่งมีรูปร่างลักษณะภายนอก เช่น ใบ ลำต้น และดอกเหมือนกัน โดยไม่ต้องรอให้ออกผลได้เช่นเดียวกับเครื่องหมายอาร์เอพีดี (ธีระชัย, 2550)



ภาพที่ 1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ E-ACC + M-CAG [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen^{TM} Life Techologies, USA); 1-10 คือดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ; 11-20 คือดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์หนัง]

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนัง ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์ 64 คู่ พบว่ามีไพรเมอร์ 8 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน 8 แถบ และได้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีเพียง 8 ชนิด ที่สามารถจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังออกจากกันได้ แสดงว่าน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังมีพันธุกรรมใกล้ชิดกันมาก นอกจากนั้นยังได้พัฒนาเครื่องหมายสการ์ จากเครื่องหมายเอเอฟแอลพี 4 ชนิด ซึ่งพบเครื่องหมายสการ์ที่จำเพาะกับน้อยหน่าพันธุ์เนื้อเพียงอย่างเดียว

เอกสารอ้างอิง

เกศิณี ระมิงค์วงศ์. 2530. *ไม้ผลเมืองร้อน*. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ธีระชัย ธนานันต์. 2550. การจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี. *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 15: 9-15.

นฤมล ธนานันต์ และ ธีระชัย ธนานันต์. 2550. การจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี. *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 15: 66-72.

พันธิตร์ มะลิสุวรรณ. 2548. คู่มือการเพิ่มผลผลิต: การปลูกน้อยหน่าปลอดสารพิษและวิธีเพิ่มผลผลิตอีกเท่าตัว. บริษัท สำนักพิมพ์ยูทิไลซ์ จำกัด, กรุงเทพฯ.

Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves. *Biotech Biodiv Lett* 2: 19-24.

Escribano, P., Viruel, M.A. and Hormaza, J.I. 2004. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill. Annonaceae). *Mol Ecol Notes* 4: 746-748.

Kashkush, K., Jinggui, F., Tomer, E., Hillel, J. and Lavi, U. 2001. Culture identification and genetic map of mango (*Mangifera indica*). *Euphytica* 122: 129-136.

Kwapata, K., Mwase, W.F., Bokosi, J.M., Kwapata, M.B. and Munyenyembe, P. 2007. Genetic diversity of *Annona senegalensis* Pers. populations as revealed by simple sequence repeats (SSRs). *Afr J Biotechnol* 6: 1239-1247.

Loh, J.P., Kiew, R., Set, O., Gan, L.H. and Gan, Y.Y. 2000. A study of genetic variation and relationships within the bamboo subtribe Bambusinae using amplified fragment length polymorphism. *Ann Bot* 85: 607-612.

Morton, J.F. 1987. Sugar apple: *Annona squamosa*. *In:* J.F. Morton (ed.) *Fruits of Warm Climates*. Creative Resource Systems, Inc., Winterville, NC. p. 505.

Phillip, R.L. and Campbell, C.W. 1994. *Fact Sheet HS-38: The Sugar Apple*. University of Florida, Florida.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSRs markers for germplasm analysis. *Mol Breed* 2: 225-238.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Wong, C., Kiew, R., Loh, J.P., Gan, L.H., Set, O., Lee, S.K., Lum, S. and Gan, Y.Y. 2001. Genetic diversity of the wild banana *Musa acuminata* colla in Malaysia as evidenced by AFLP. *Ann Bot* 88: 1017-1025.