การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกผักกาดด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

Genetic Relationship Analysis and Identification of *Brassica* spp. Using HAT-RAPD Technique

จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, เปรมณัช ขุนปักษี และธีระชัย ธนานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Jaturong Sumrith, Premmanuch Kunpuksri and Theerachai Thanananta

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Narumol Thanananta*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

บทคัดย่อ

ผักกาดเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่นิยมใช้ประกอบอาหาร สามารถเพาะปลูกได้แทบทุกฤดูกาล งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของผักกาด 8 ชนิด ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 54 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 16 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc พบว่าสามารถจำแนกพันธุ์ผักกาดได้ โดยมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.75

คำสำคัญ : ผักกาด; การจำแนกพันธุ์; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; แฮตอาร์เอพีดี

Abstract

Brassica species are dicot and commonly used for cooking. It can be grown three crops per year. In this research, high annealing temperature - random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to study the genetic diversity among 8 *Brasicca* cultivars. Seventy-two random

***Corresponding author:** narumolpla@yahoo.com* *DOI: 10.14456/tjst.2014.24*

primers were screened and 54 primers could be used for DNA amplification. Sixteen primers which gave clear amplified products were selected and used to analyze all cultivars. The result showed significant differences among 8 cultivars by using specific fragments for each cultivar. A dendrogram was constructed based on polymorphic bands using the NTSYS-pc program, which can be classified with similarity coefficients ranging 0.38-0.75.

Keywords: *Brassica*; identification; genetic relationship; HAT-RAPD

1. คำนำ

กะหล่ำปลีและผักกาด (*Brassica* spp.) จัดเป็นพืชในวงศ์ผักกาด (Brassicaceae) ซึ่งพืชในวงศ์นี้ ได้แก่ กะหล่ำปลี บร็อคโคลี คะน้า หัวไชเท้า หูปลาช่อน ผักกาดเขียวปลี และหัวผักกาดยักษ์ (Wang *et al.*, 2012) โดยพืชผักเหล่านี้มีสารพฤกษเคมี (phytochemical) ที่มีคุณประโยชน์ ได้แก่ ซัลโฟราเฟน (sulforaphane) ไอโซไทโอไซยาเนท (isothiocyanate) อินโดล (indole) อินโดลทรีคาร์บินัล (indole-3-carbinal) ไดไทอัลไทโอน (dithiol-thione) กลูโคไซโนเลท (glucosinolate) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Cartea *et al.*, 2011)

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger-printing) นั้นนอกจากจะใช้สำหรับตรวจสอบพันธุ์พืชแล้ว ยังสามารถสามารถใช้ตรวจสอบพันธุ์พืชที่เป็นทั้งพันธุ์แท้ (wild type) หรือพืชที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรม (GMO, genetically modified organism) นอกจากนี้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังนำไปใช้ในการพิสูจน์หลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งมีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางและเป็นที่ยอมรับในสากล

เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - random amplified polymorphic DNA) สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์สุ่ม (random primer) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ ที่ไม่จำเพาะเจาะจง หลังจากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในเจลอะกาโรส (agarose gel) (สุรินทร์, 2552) โดยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีต่างจากเทคนิคอาร์เอพีดีที่ค่าอุณหภูมิในขั้นตอนการจับกันระหว่างดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ (annealing temperature) โดยเทคนิคแฮตอาร์พีดีใช้อุณหภูมิในขั้นตอนการจับกันระหว่างดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ 46-62 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี และให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนกว่า (high resolution) ตรวจสอบซ้ำได้ (reproducibility) และให้ความหลากรูป (polymorphism) ของแถบดีเอ็นเอสูงกว่าเทคนิคอาร์พีดี (Anuntalabhochai *et al.*, 2000) จากงานวิจัยที่เคยรายงานไว้พบว่าเทคนิคแฮต-อาร์เอพีดีสามารถใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและศึกษาโครงสร้างประชากรเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต

งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอและตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เพื่อใช้ระบุชนิดและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของผักกาด

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างผักกาด

ผักกาดที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ ผักกาดกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* Jusl.) ผักกาดขาว (*Brassica pekinensis* Rupr.) กะหล่ำปลี (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)

คะน้า (*Brassica alboglabra* L.H. Bailey) กะหล่ำปลีแดง (*Brassica oleracea* var. capitata f. rubra DC.) ผักกาดหางหงส์ (*Brassica campestris* var. pekinensis Lour., Olson) กะหล่ำดอก (*Brassica oleracea* L. var. botrytis L. Cruciferae) บร็อคโคลี (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบผักกาดด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) โดยบดใบผักกาดในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด แล้วนำผงใบ 3-4 กรัม บ่มในบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer; 4 % cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 0.6 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M NaCl, 20 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium metabisufite] 10 มิลลิลิตร ซึ่งมี 2-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร และ polyvinyl-pyrrolidone (PVP) 0.3 กรัม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงแยกสารละลายใสส่วนบนมาเติม linear polyacrylamide 140 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (washing buffer; 10 mM sodium acetate pH 5.2 และ 70 % ethanol) ปล่อยให้แห้งและละลายตะกอนในบัฟเฟอร์อาร์เอ็นเอส (RNase buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNase A (10 mg/ml) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาสกัดด้วย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นจึงย้ายสารละลายใสส่วนบนมาเติม linear polyacrylamide 70 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร และไอโซโพรพานอลให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (TE buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al*., 1989)

2.3 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

มี 2 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอผักกาด 8 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างเดียวกัน และ (2) การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยคัดเลือกไพรเมอร์ 16 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอผักกาดแต่ละตัวอย่าง

โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 2.5 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP)

ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์แบบสุ่ม 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ life technology, Brazil) 1 ยูนิต (unit) โดยไพรเมอร์แบบสุ่มที่ใช้ 72 ชนิด มีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ คือไพรเมอร์ 6 ชุด (A2, B2, C2, D2, E2 และ F2) จาก Wako Company (Japan)

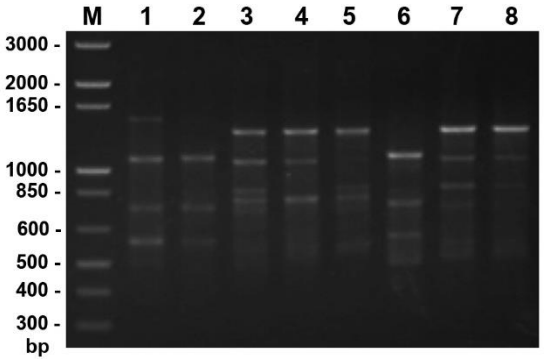
ปฏิกิริยาพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 46 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น (นฤมล, 2555)

2.4 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอผักกาดที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี และเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 ในเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของผักกาดด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 54 ชนิด หรือคิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ หลังจากนั้นได้คัดเลือก 16 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของผักกาดทั้ง 8 ชนิด ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300-2,000 คู่เบส โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมีรูปแบบจำเพาะต่อผักกาดแต่ละพันธุ์ ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ C28 แสดงไว้ในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม C28 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-8 คือ ผักกาดกวางตุ้ง ผักกาดขาว กะหล่ำปลี คะน้า กะหล่ำปลีแดง ผักกาดหางหงส์ กะหล่ำดอก และบร็อคโคลี ตามลำดับ]

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีทั้งหมดด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) และแสดงผลในรูปแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) พบว่าผักกาดที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จำนวน 8 พันธุ์ มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.75 เฉลี่ย 0.60 (รูปที่ 2) เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.64 พบว่าแบ่งผักกาดเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ ผักกาดกวางตุ้ง ผักกาดขาว และผักกาดหางหงส์ กลุ่ม 2

ได้แก่ กะหล่ำปลี คะน้า และกะหล่ำปลีแดง และกลุ่ม 3 ได้แก่ กะหล่ำดอก และบร็อคโคลี โดยผักกาดกวางตุ้งกับผักกาดขาวมีความเหมือนกันมากที่สุด (รูปที่ 3)

	ผักกาดกวางตุ้ง	ผักกาดขาว	กะหล่ำปลี	คะน้า	กะหล่ำปลีแดง	ผักกาดหางหงส์	กะหล่ำดอก	บร็อคโคลี
ผักกาดกวางตุ้ง	1.00							
ผักกาดขาว	0.75	1.00						
กะหล่ำปลี	0.41	0.42	1.00					
คะน้า	0.45	0.51	0.70	1.00				
กะหล่ำปลีแดง	0.45	0.41	0.70	0.63	1.00			
ผักกาดหางหงส์	0.71	0.61	0.45	0.49	0.53	1.00		
กะหล่ำดอก	0.41	0.38	0.62	0.61	0.56	0.51	1.00	
บร็อคโคลี	0.43	0.39	0.67	0.62	0.62	0.53	0.70	1.00

รูปที่ 2 ค่าดัชนีความเหมือนของผักกาดทั้ง 8 ชนิด ที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีสามารถจำแนกพันธุ์พืชที่มีความใกล้เคียงกันมาก (Zhang *et al*., 2001) ผลจากการวิจัยครั้งนี้จึงแสดงถึงศักยภาพของเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีในการจำแนกตัวอย่างผักกาดที่นำมาศึกษา ซึ่งสามารถจัดกลุ่มผักกาดได้สอดคล้องกับลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) เช่น ผักกาดกวางตุ้งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับผักกาดขาว และผักกาดหางหงส์ โดยการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตจากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีนั้นเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือสำหรับการจำแนกพันธุ์มากกว่าการจำแนกด้วยสัณฐานภายนอกเพียงอย่างเดียว (Palai *et al*., 2007)

4. สรุป

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของผักกาด 8 ชนิด ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 16 ไพรเมอร์ พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างได้มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีในการตรวจสอบพันธุ์ผักกาด นอกจากนี้ยังทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างผักกาดที่นำมาศึกษาเมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีทั้งหมดด้วยโปรแกรม NTSYS-pc

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสุรีย์พร พุ่มเอี่ยม คุณธนาวุฒิ รติอาภากุล และคุณณฐวรรณ พรหมน้อย ที่มีส่วนทำให้การวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 269 น.

Anuntalabhochai, S., Chandet, R., Chiangda, J. and Apavatjrut, P., 2000, Genetic diversity within Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis, Acta Hort. 575: 253-259.

Cartea, E.M., Francisco, M., Soengas, P. and Velasco, P., 2011, Phenolic compounds in *Brassica* vegetables, Molecules 16: 251-280.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle, 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of

fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.

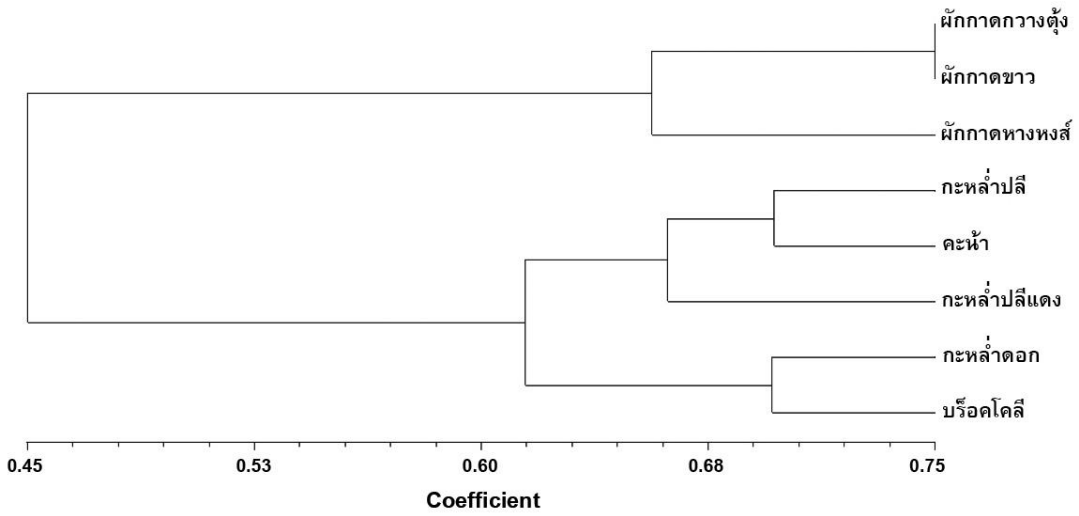
Palai, S.K. and Rout, G.R., 2007. Identification and genetic variation among eight varieties of ginger by using random amplified polymorphic DNA markers. Plant Biotechnol. 24: 417-420.

Rohlf, F.J., 2002, NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.

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

Wang, J., Yang, X., Xu, H., Chi, X., Zhang, M. and Hou, X., 2012, Identification and Characterization of microRNAs and their target genes in *Brassica olerecea*, Gene 505: 300-308.

Zhang, K.Y.B., Leung, H.W., Yeung, H.W. and Wong, R.N.S., 2001, Differentiation of *Lycium barbarum* from its related *Lycium* species using random amplified polymorphic DNA, Planta Medica 67: 379-381.



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของผักกาดทั้ง 8 ชนิด ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี