บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การรวบรวมเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส จากตัวอย่างพืชที่เก็บจากแปลงศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และแปลงศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

1.1 การเก็บตัวอย่างพืชตระกูลกะหล่ำ และการแยกเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส

การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างของผักตระกูลกะหล่ำ 5 ชนิด จากพื้นที่ 2 แหล่งคือ แปลงศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร และแปลงศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย โดยเลือกเก็บต้นที่สมบูรณ์ ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงหรือแสดงอาการของโรค ตัวอย่างพืช 5 ชนิด ได้แก่

- ผักกาดฮ่องเต้ (Pai-tsai: *Brassica chinensis* var. *chinensis* Mansf.)
- ผักคะน้า (Chinese kale: *Brassica alboglabra* Bailey)
- กะหล่ำดอก (cauliflower: *Brassica oleracea* L.var.*botrytis* L.)
- ผักกวางตุ้ง (chinese mustard: *Brassica camprestris* L. ssp. *chinensis*)
- ผักกาดเขียวปลี (indian mustard: *Brassica Juncea* (L.), Czern.)

การแยกเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีสจากส่วนต่างๆ ของพืช (Shimizu *et al*., 2000)

Formatted: Bullets and Numbering

1. นำตัวอย่างพืช ใบ ก้าน ลำต้น และรากมาล้างน้ำให้สะอาด โดยล้างน้ำไหลผ่าน (running water) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผึ่งลมให้แห้ง
2. ตัดใบ ก้าน ลำต้น และราก เป็นชิ้นเล็กๆ สี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 1×1 เซนติเมตร
3. นำชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 % เป็นเวลา 2 นาที แล้วแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 % เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในสารละลาย heritage เข้มข้น 0.6 % นาน 5 นาที
4. ซับชิ้นพืชให้แห้งด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อ นำมาวางบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งลมให้แห้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

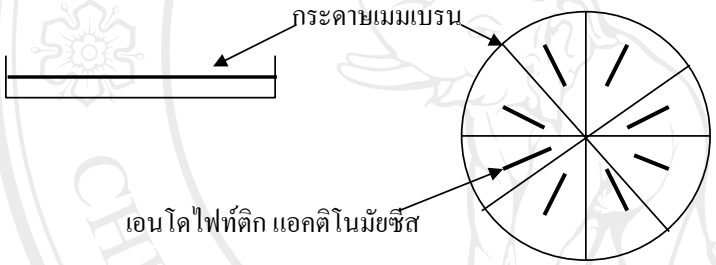
5. วางชิ้นพืชบนอาหาร inhibitory mold agar (IMA-2) ที่ผสมสารแอนติไบโอติก คือ amphotericin B, riphampin viccillin solution และ heritage
6. บ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 1 – 3 สัปดาห์

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และการเก็บเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส (Shimizu *et al*., 2000)

Formatted: Bullets and Numbering

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเอ็นโดไฟท์ที่คาดว่าจะเป็นเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ที่เจริญขึ้นบนชิ้นพืช มาขีดลงบนแผ่นกรองเซลลูโลส (cellulose membrane filter) ขนาดรูเท่ากับ 0.22 µm. ที่วางบนอาหาร IMA-2 (ภาพที่ 1) นำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 3 - 5 วัน จากนั้นนำแผ่นกรองเซลลูโลสออก หากเชื้อจุลินทรีย์นั้นเป็นเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส จะพบว่าเชื้อนั้นสามารถเจริญผ่านแผ่นกรองไปยังผิวอาหารได้ แล้วจึงเก็บเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ที่ได้ไว้เป็น stock culture ในหลอดอาหาร IMA-2 บ่มที่ อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 ºC

Formatted: Bullets and Numbering



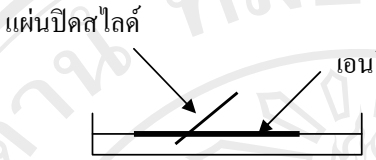
ภาพที่ 1 การขีด (streak) เชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ลงบนอาหาร IMA – 2 ที่ผิวหน้าของอาหารบนแผ่นกรองเซลลูโลส (cellulose membrane filter)

1.2 การจำแนกชนิดของเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส (ดัดแปลงจากวิธีของ Williams *et al*., 1989)

นำเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ที่แยกได้แต่ละไอโซเลท (isolate) มาเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 โดยวิธี streak plate แล้วปักแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในจานอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่มีโคโลนีของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส เจริญอยู่หนาแน่น โดยให้ทำมุมประมาณ 45 องศากับผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ภาพที่ 2) แล้วนำแผ่นปิดสไลด์ที่มีเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีสที่เจริญขึ้นติดอยู่บนแผ่นสไลด์มาย้อมสีแบบ simple stain โดยหยดด้วยสารละลาย crystal violet 0.1% เพื่อตรวจดูลักษณะของ mycelium,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

conidium, sporangium, โครงสร้างอื่นๆ และการเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ตามเอกสารของ Miyadoh *et al.* (1997) และ Stanley *et al.* (1989) เพื่อจำแนกสกุลของเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีสเบื้องต้น และตั้งชื่อไอโซเลท ของเชื้อที่ไม่ซ้ำกันตามชื่อของพืชอาศัย



ภาพที่ 2 การทำ slide culture เพื่อตรวจดูลักษณะเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส

2. การคัดเลือกเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และ เชื้อรา *Cercospora* sp.

2.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และ เชื้อรา *Cercospora* sp.

เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ได้แก่

1. เชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดวงแหวน
2. เชื้อรา *Cercospora* sp. สาเหตุโรคใบจุดตากบ

เก็บตัวอย่างโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อราทั้ง 2 ชนิดในผักตระกูลกะหล่ำ โดยนำตัวอย่างที่ได้มาล้างนำให้สะอาด แล้วตัดชิ้นส่วนที่เป็นโรคให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 3×4 mm. นำไปวางบนอาหาร PDA บ่มให้เชื้อเจริญในอุณหภูมิ 25 ºC หลังจากนั้นประมาณ 2 – 3 วัน ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์จากอาหาร PDA โดยวิธีการ hyphal tip isolate โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 mm. ตัดชิ้นวุ้นบริเวณส่วนปลายของเส้นใยเชื้อรา จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่ได้มาวางบนอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 ºC จนเชื้อราสร้างโคโลนีขึ้นเต็มจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงนำเชื้อราที่ได้ทั้ง 2 ชนิดทำการเก็บเป็น stock ไว้ทำการทดสอบต่อไป

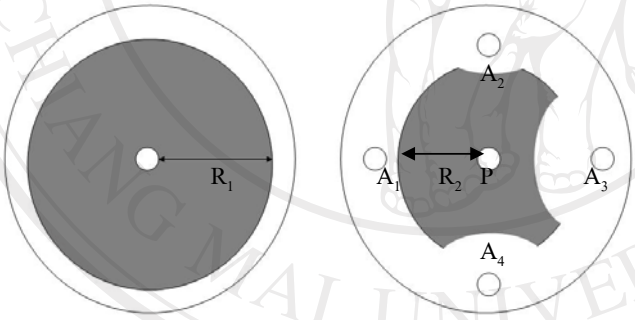
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีสในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และ เชื้อรา *Cercospora* sp.

ทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคตระกูลกะหล่ำโดยวิธี dual culture ตามวิธีการของ Crawford *et. al.* (1993) และ El-Tarabily *et al.* (1997)

เลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ที่ไม่ซ้ำกันบนอาหาร IMA-2 จำนวน 4 ไอโซเลทต่อจานนาน 3 วัน ก่อนเพื่อให้เชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส เจริญเป็นโคโลนีที่สมบูรณ์และสร้างสารปฏิชีวนะ จากนั้นนำเชื้อสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดมาวางตรงกลางจานอาหารให้ห่างจากเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส แต่ละไอโซเลท 2 เซนติเมตร (ภาพที่ 3)

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทดลอง 4 ซ้ำ สำหรับเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส แต่ละชนิด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 ºC เมื่อเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม เจริญจนเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงบันทึกผลโดยวัดขนาดบริเวณการยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้นระหว่างโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค และเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ที่เป็นปฏิปักษ์ รวมทั้งวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบ จากนั้นจึงนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent Inhibition of Radial Growth; PIRG)



ชุดควบคุม ชุดทดสอบ

ภาพที่ 3 ลักษณะการวัดผลในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (เชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส) ต่อเชื้อราสาเหตุโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 โดยวิธี dual culture

A: Actinomycetes, P: Pathogenic fungi, R: Radial growth of Pathogenic fungi

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ (PIRG) (เกษม, 2532)

$$PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

3. ปัจจัยของอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีสต่อไอโซเลทที่คัดเลือกได้ ไอโซเลท PAI-D1, CAU1, IN-MUS1 และKAL8

3.1 ปัจจัยของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส

นำเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีสที่ได้คัดเลือกเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กันได้แก่ 10, 20, 25, 30 และ 40 ºC เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สังเกตและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส

3.2 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส (Shimizu *et al*., 2000)

นำเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ที่ได้คัดเลือกเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ กัน ตั้งแต่ pH 4 ถึง pH 9 โดยใช้ 0.1 N HCl, 0.1 N NaOH เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 3 - 5 วัน สังเกตการณ์เจริญของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส เปรียบเทียบระหว่างอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่างๆ

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ไอโซเลท CAU1, KAL8 และPAI-D1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

เลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส บนอาหาร IMA-2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเต็มที่ และสร้างสปอร์ที่สมบูรณ์ นำเชื้อส่งไปที่ศูนย์วิจัยและบริการจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอน สวท-มช คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่างมี ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. ตัดชิ้นวุ้นตัวอย่าง (cutting) ที่มีเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส เจริญอยู่ขนาดประมาณ 5 x 5 mm. จำนวน 3 - 4 ชิ้น ต่อเชื้อตัวอย่าง
2. คงสภาพเนื้อเยื่อ (fixing) โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ของตัวอย่าง โดยแช่ใน glutaraldyhyde 2.5 % ใน 0.1 M phosphate buffer
3. ล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.2
4. รักษาสภาพ (fixing) อีกครั้ง โดยการแช่ในสารละลาย osmium tetroxide 1 % ใน 0.1 M phosphate buffer
5. ล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.2
6. ไล่น้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยการแทนที่น้ำด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามลำดับจาก 30 50 70 80 90 95 และ 100 % 2-3 ครั้งตามลำดับโดยใช้เวลาแช่ในแต่ละความเข้มข้น 5 - 10 นาที
7. ทำให้แห้ง (drying) ด้วยการรมตัวอย่างด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
8. การฉาบทอง (coating) โดยนำไปเคลือบด้วยอนุภาคทองหนา 30 นาโนเมตร
9. นำตัวอย่างไปศึกษา SEM

นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาส่องดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL รุ่น JSM-5910LV) พร้อมทั้งบันทึกภาพลักษณะของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส คือ ลักษณะสปอร์และรูปแบบของการสร้างสปอร์

5. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

การเพาะเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ในอาหารเหลว

นำเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ทั้งหมดที่แยกได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project Medium 1 (ISP1) (Shirling and Gottlieb, 1966) 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker ที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส

ดูดเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ที่เลี้ยงในอาหารเหลวลงหลอด microtube 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 1400 g เป็นเวลา 3 นาที ล้างและปั่นด้วย TE (10:1) และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

sucrose (10%) แล้วทำการหมุนเหวี่ยงที่ 1400 g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นตะกอนถูกละลายด้วย 0.5 มิลลิลิตร ของ lysis buffer (25 mmol l^{-1} Tris, 25 mmol l^{-1} EDTA, 10 mg ml^{-1} lysozyme, 50 µg ml^{-1} RNase) นำไปบ่มที่ 30 ºC และเขย่าเป็นเวลานาน 2-3 ชั่วโมง จากนั้นเติม SDS (10%) บ่มที่อุณหภูมิ 65 ºC เป็นเวลา 20 นาที ต่อมาเติมด้วย Potassium acetate (5 mol) ผสมให้เข้ากัน วางลงบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการหมุนเหวี่ยงที่ 1400 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาส่วน supernatant ย้ายลงหลอดใหม่ แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย isopropanol และ ethanol

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน PCR

นำ PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยจะประกอบด้วย 2 mM $MgCl_2$, 2 U *Taq* polymerase, 150 µM ของ deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), 0.5 µM ของแต่ละ primer และ 2 µl template DNA โดยใช้ primer F1 (5'-AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3' ; I= inosine) และ primer R5 (5'-ACGGITACCTTGTTACGACTT-3') ทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ โดย denaturation ที่อุณหภูมิ 96 ºC เป็นเวลา 2 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 ºC เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 ºC เป็นเวลา 2 นาที

การตัดผลผลิต DNA จากปฏิกิริยา PCR ด้วยเอนไซม์

เมื่อได้ PCR product นำผลผลิต DNA ที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ3 ชนิดคือ *Eco*RV, *Kpn*I และ *Pst*I ปริมาณของสารที่ใช้ คือ ผลผลิตของ PCR 10 ไมโครลิตร buffer 2 ไมโครลิตร BSA 10X 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ไมโครลิตร และน้ำ 5 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 ºC นาน 20 นาที แล้วจึงนำไปวิเคราะห์บน agarose gel ต่อไป

การวิเคราะห์แบบแผนลายพิมพ์ DNA บน agarose gel

- การเตรียมแผ่น agarose gel

การเตรียมถาดใส่ gel และการประกอบหวีลงในถาด gel ในการเท gel ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นถอดหวีออกจากถาดเมื่อ gel แข็งตัว นำ gel ใส่ลงในกล่อง eletrophoresis

- การทำ agarose gel eletrophoresis

ใช้ DNA ที่ต้องการตรวจสอบผสมกับ loading buffer นำ DNA ที่ผสมแล้วค่อยๆ หยอดลงไปในหลุม แล้วปิดฝากล่อง electrophoresis เปิดสวิทซ์ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งในทิศทางจากขั้วลบไปยัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้วบวก สังเกตจากสีทั้งสองที่ผสมใน loading buffer เคลื่อนที่ห่างกันเป็นระยะทาง 2.5 เซนติเมตร จึงทำการปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำเจลที่ได้ไปตรวจดูแถบ DNA ด้วยเครื่อง gel document

การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบน RFLP gel บนตาราง matrix โดยแต่ละแถบดีเอ็นเอ (band) จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งๆนั้น จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ Numerical Taxonomy System (NTSYS version 2.0) (Rohlf, 1993) โดยเปลี่ยนเป็น similarity matrix ด้วยโปรแกรม SIMQUAL (similarity for qualitative data) โดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient จากนั้นนำมาจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี unweighted pair group by arithmetic mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม SAHN (sequential, agglomerative, hierachical and nested clustering method) และวิเคราะห์ bootstrap (1,000 ซ้ำ) ด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved