

R2561B052

# รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยน้ำว้า  
ในจังหวัดพิษณุโลก โดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล

Assessment of genetic diversity among 'Kluai Namwa'  
(ABB group) cultivars grown in Phitsanulok province using  
molecular markers

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยนเรศวร งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ

พ.ศ. 2561 สัญญาเลขที่ R2561B052

คณะวิจัย

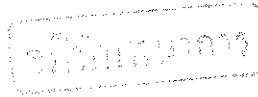
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กวี สุจิตฺติ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คำรพ รัตนสุต

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริรัตน์ แสนยงค์

ดร. ฐนิตา บุญสร้างสม

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร



สำนักหอสมุด

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่สนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้ (รหัสโครงการ R2561B052) และขอขอบคุณคุณกัลยาณี สุวิทวัส และคุณนิพิจ พนิจผล ที่ให้คำแนะนำองค์ความรู้เกี่ยวกับการจำแนกสายพันธุ์กล้วยโดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตลอดจนขอขอบคุณศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดพิษณุโลก ที่อนุเคราะห์สายพันธุ์กล้วยที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ กรมความร่วมมือระหว่างประเทศ (Thailand International Cooperation Agency; TICA) ที่ทุนสนับสนุนนิตระดับปริญญาโท Mr. Richard Opi Balli Zozimo สำหรับร่วมทำวิทยานิพนธ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

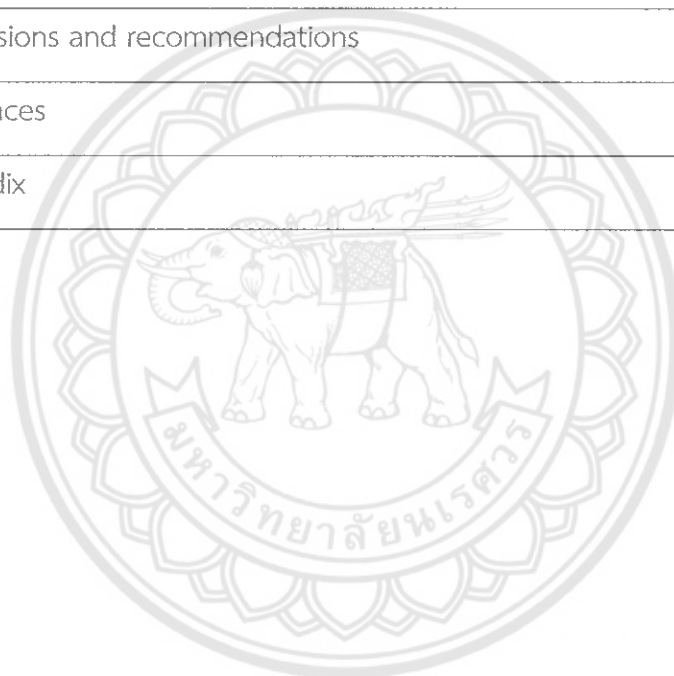
สุดท้ายขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินการวิจัยทำให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผศ.ดร. กวี สุจิตติ  
หัวหน้าโครงการวิจัย

สำนักงาน มหาวิทยาลัยนเรศวร		
รับทราบ		
เลขที่รับ	จ	04
เลขที่บันทึก	จ	04
495		
.ท ๖๖		
๓๖๖๖		
๖๖๖		

## สารบัญ

chapter	content	page
	acknowledgement	i
	Abstract	ii
1	Introduction	1
2	literature review	5
3	Materials and methods	10
4	Results and discussion	19
5	Conclusions and recommendations	27
6	References	30
	Appendix	36



## Abstract

This study was conducted to assess the genetic diversity and relationship of 19 Thai Musa accessions of four (ABB, AAA, AA, and BB) genomes based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) markers. The results revealed that thirteen RAPD and eight SRAP markers generated a total of 129 alleles (calculated from 1005 amplified fragments), with sizes ranging from 100 to 2100 bp long. Moreover, both markers provided high polymorphism with average PIC value of 0.75, which indicated a high level of genetic diversity among studied Musa accessions. The UPGMA approach based grouping showed two distinct clusters, which were cluster-I comprised of ABB, AA, and BB genomes and cluster-II consisted of only the AAA genome. Additionally, its analysis demonstrated high genetic relationship within the ABB genome, compared to other (AAA, AA, and BB) genomes. This study also confirmed that both RAPD and SRAP markers were proficient tools for rapidly accessing the genetic diversity within ABB genome and among other genomes. Furthermore, both markers also proved useful for the further development of specific molecular markers such as sequence characterized amplified region (SCAR) markers and marker-assisted selection (MAS) tool.

## บทที่ 1

### คำนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

กล้วย (*Musa* spp.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่อยู่ในวงศ์ Musaceae มีถิ่นกำเนิดจากแถบ Southeast Asia และ western Pacific (de Langhe et al., 2009) นิยมปลูกทั่วไปในพื้นที่เขตร้อน และกึ่งร้อน กล้วยจัดเป็นไม้ผลมีความทางเศรษฐกิจในด้านการบริโภคผลสดและการแปรรูป (Boonruangrod et al., 2009) เช่น กล้วยตาก (dried banana) เนื่องจากประกอบด้วยคุณค่าทางโภชนาการสูง เช่น มีปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสและโพแทสเซียมสูง มีคุณภาพและลักษณะปรากฏที่ดี คือ มีสีน้ำตาลอมเหลือง รสหวาน และมีเนื้อนุ่ม (สถาบันอาหาร, 2556) กล้วยสามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ *Musa acuminata* (A-genome,  $2n = 2x = 22$ ), *Musa balbisiana* (B-genome,  $2n = 2x = 22$ ), *Musa schizocarpa* (S-genome,  $2n = 2x = 22$ ) และ *Australimusa* species (T-genome,  $2n = 2x = 20$ ) กล้วยที่ปลูกเพื่อบริโภคและเพื่อการค้าส่วนใหญ่กล้วยที่ไม่มีเมล็ด (seedless) เนื่องจากรังไข่สามารถพัฒนาเป็นผลได้โดยไม่มีการผสมพันธุ์ (parthenocarpic fruit) โดยกล้วยเหล่านี้เกิดจากการผสมข้ามตามธรรมชาติ (หรือมนุษย์) ระหว่างกล้วยป่าในกลุ่ม *M. acuminata* และ *M. balbisiana* species ร่วมกับการคัดเลือกโดยมนุษย์ (McKey et al., 2010; Perrier et al., 2011) กล้วยที่รับประทานได้ กลุ่ม allopolyploid triploids (AAA; AAB; หรือ ABB;  $2n = 3x = 33$ ) (Perrier et al., 2011) แบ่งได้เป็นหลายชนิด เช่น กล้วยชนิด AAB-genome (plantains คือ กล้วยสุกมีเนื้อเนื้อกระด้าง ไม่มีรสหวาน ต้องทำให้สุกโดยใช้ความร้อนก่อน จึงจะทำให้กล้วยมีรสชาติหวานขึ้น เช่น กล้วยหักมุก) และกล้วยชนิด AAA-genome (dessert banana เช่น Cavendish) ชนิด AAB (plantains) และ ชนิด ABB-genome (cooking bananas) เป็นกล้วยที่มีผลสุกมีเนื้ออ่อนรสหวาน รับประทานสดได้โดยไม่ต้องผ่านความร้อน (เบญจมาศ, 2551)

กล้วยน้ำว้า อยู่ใน ABB-genome (cooking bananas) เป็นกล้วยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอย่างมากในประเทศไทย ปัจจุบันสามารถปลูกได้ทั่วประเทศ โดยเฉพาะจังหวัดพิษณุโลกถือว่าเป็นแหล่งปลูกกล้วยน้ำว้าที่ใหญ่ที่สุดในประเทศ ผลผลิตส่วนใหญ่ถูกนำมาแปรรูปเป็นกล้วยตาก โดยวิสาหกิจชุมชน วิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม จนเป็นสินค้าระดับ OTOP ประจำท้องถิ่นที่สร้างชื่อเสียง สร้างรายได้ ให้กับจังหวัดพิษณุโลกเป็นอย่างมาก และมีศักยภาพสูงทางการตลาดทั้งในและต่างประเทศ (พินิจ บุญเยี่ยม และคณะ

2557) อย่างไรก็ตามกล้วยน้ำว้ามีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อน (พิษณุโลก) กล้วยน้ำว้าค่อม กล้วยน้ำว้าดำ กล้วยน้ำว้าตะนาวศรี กล้วยน้ำว้าเหลืองอุบล กล้วยน้ำว้าเงิน และกล้วยน้ำว้าปากช่อง เป็นต้น (เบญจมาศ, 2551) โดยกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อนมีความเหมาะสมมากที่สุดสำหรับแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์กล้วยตาก เนื่องจากมีขนาดเหมาะสม รสชาติหวาน กลิ่นหอม และสีสวย เนื่องจากความต้องการของตลาดกล้วยตาก พิษณุโลกเพิ่มขึ้นอย่างมากและรวดเร็ว ส่งผลให้โรงงานผลิตกล้วยตากประสบปัญหาที่สำคัญคือ ผลกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อนมีไม่เพียงพอสำหรับกระบวนการผลิต ทำให้โรงงานผลิตกล้วยตากต้องรับกล้วยจากหลายแหล่ง เพาะปลูก (ที่อาจมีกล้วยหลายสายพันธุ์) เข้าสู่กระบวนการผลิต ซึ่งยากต่อการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานการผลิตกล้วยตาก ตลอดจนโรงงานยังไม่มีวิธีสำหรับการจำแนกและระบุสายพันธุ์กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อนออกจากกล้วยสายพันธุ์อื่น

ในอดีตนั้นการจำแนกสายพันธุ์กล้วยโดยการตรวจสอบองค์ประกอบทางพันธุกรรมในจีโนม A และ/หรือ B อาจทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีการพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำนวน 15 standard morphological descriptors (Simmonds et al., 1955; Atom et al., 2015), หรือ จากรูปร่างหรือรูปทรงสีผลของกล้วยเป็นต้น (Mohammed et al., 2013), วิธีการตรวจสอบจำนวนชุดของโครโมโซมพื้นฐาน (ploidy) และวิธีนับจำนวนโครโมโซม chromosome counting (Shepherd, 1999), วิธีการการประเมินจากขนาดและความหนาแน่นของปากใบ (stomata size and density) หรือวัดขนาดของละอองเรณู (pollen grain sizes) (Tenkouano et al., 1998) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวข้างต้นยังขาดความถูกต้องแม่นยำ เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่กำหนดลักษณะทางพันธุกรรม ตลอดจนการตรวจสอบใช้เวลานาน และทำได้ยากสำหรับการตรวจสอบในตัวอย่างจำนวนมาก และไม่สามารถตรวจสอบสายพันธุ์กล้วยที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อย (de Jesus et al., 2013) ต่อมาจึงมีการใช้เทคนิค Flow cytometry ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงสำหรับตรวจสอบระดับ ploidy ของกล้วยที่มีชนิดและจำนวนของชุดของจีโนมแตกต่างกัน โดยการวัดปริมาณของดีเอ็นเอในจีโนม (Pillay et al., 2006; de Jesus et al., 2013) และตั้งแต่ปี 2009-2016 มีการใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ สะดวกและรวดเร็ว โดยสามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า ซึ่งเครื่องหมายชีวโมเลกุลที่ประสบความสำเร็จสำหรับจำแนกสายพันธุ์กล้วย ได้แก่ (1) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker (Kiran et al., 2015; Shelke et al., 2015; Resmi et al., 2015) (2) simple sequence repeats (SSR) marker (de Jesus et al., 2013; Mahanti et al., 2015) (3) sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers

(Zhao et al., 2009; Dong et al., 2010) (4) internal transcribed spacers (ITS) marker (Liu et al., 2010; Hapsari et al., 2015) (5) satellite DNA marker (Cizkova et al., 2013) และ (6) 5'ETS- single nucleotide polymorphism (SNP) (Boonruangrod et al., 2009)

ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการระบุสายพันธุ์ของกล้วยน้ำว้า โดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุลที่เหมาะสม ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งอาจเป็นประโยชน์อย่างมากกับเกษตรกรผู้ปลูกกล้วย โรงงานผลิตกล้วยตาก ตลอดจนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กล้วยน้ำว้าและกล้วยสายพันธุ์ใกล้เคียง และระบุสายพันธุ์กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อน (พิษณุโลก) โดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล ชนิด RAPD-, และ SRAP-markers (ปีที่ 1)

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1) รวบรวมสายพันธุ์กล้วยน้ำว้าและสายพันธุ์ใกล้เคียงที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก แล้วปลูกที่แปลงศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร (พันธุ์พืชเพาะเลี้ยง) ต.จวังาม อ.เมือง จ.พิษณุโลก
- 2) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยน้ำว้าและสายพันธุ์ใกล้เคียง
- 3) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กล้วยน้ำว้า โดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล ชนิด RAPD-, และ SRAP-markers

## 1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

กล้วยน้ำว้าเป็นพันธุ์กล้วยที่รับประทานได้ เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างกล้วยป่าชนิด AA-genome และ BB-genome ทำให้กล้วยมีความผันแปรทางพันธุกรรม ความสามารถในการปรับตัวให้ขึ้นได้ในทุกพื้นที่ของประเทศไทย สำหรับกลุ่มกล้วยน้ำว้า (ABB genome) ก็มีความหลากหลายทางพันธุกรรม กล่าวคือมีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อน กล้วยน้ำว้าค่อม กล้วยน้ำว้าดำ กล้วยน้ำว้าตะนาวศรี กล้วยน้ำว้าเหลียงอุบล และกล้วยน้ำว้าเงิน เป็นต้น โดยความผันแปรนั้นอาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ซึ่งอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ หรือผสมพันธุ์ภายในชนิดเดียวกัน หรือผสมข้ามชนิด และเกิดจากการคัดเลือกโดยมนุษย์ ทำให้เกิดกล้วย

น้ำว่าหลายหลายสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามกลุ่มน้ำว่าบางสายพันธุ์มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ใกล้เคียงกันมาก ทำให้การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการระบุสายพันธุ์ ด้วยสมมติฐานที่ว่าลำดับเบสในส่วนที่ไม่ใช่ยีนสำหรับกำหนดรหัสพันธุกรรมในกลุ่มกลุ่มน้ำว่าอาจมีความแตกต่างกัน เนื่องจากการคัดเลือก การผสมพันธุ์ และการกลายพันธุ์ ดังนั้นในการศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรม และการจำแนกสายพันธุ์กลุ่มน้ำว่าสามารถทำได้โดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล RAPD-, SSR-, และ SRAP-markers อาจช่วยบ่งชี้ถึงความแตกต่างของลำดับเบสในดีเอ็นเอในกลุ่มกลุ่มน้ำว่าดังกล่าว และอาจทำให้สามารถระบุสายพันธุ์กลุ่มน้ำว่ามะลิอ่องแท้ที่ปลูกในเขตภาคเหนือตอนล่าง และนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการรับรองพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต





## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วย

กล้วย (*Musa* spp.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่อยู่ในวงศ์ Musaceae มีถิ่นกำเนิดจากแถบ Southeast Asia และ the western Pacific (de Langhe et al., 2009) นิยมปลูกทั่วไปในพื้นที่เขตร้อน และกึ่งร้อน โดยจัดเป็นไม้ผลมีความทางเศรษฐกิจด้านการบริโภคผลสดและการแปรรูป (Boonruangrod et al., 2009) กล้วยเป็นไม้ดอกล้มลุกขนาดใหญ่ โดยมีลำต้น หรือลำต้นเทียม พัฒนาจากส่วนของเหง้าและเจริญเติบโตเหนือพื้นดิน ลำต้นประกอบด้วย ก้านใบ (petiole) และแผ่นใบ (lamina) ฐานก้านใบแผ่ออกเป็นกาบ กาบที่รวมตัวกันอย่างหนาแน่นทำให้เกิดลำต้นเทียม มีหน้าที่ชูก้านใบ พยุงให้พืชตั้งตรงดูลำต้นไม้ ในระยะแรกของเจริญของกาบจะจรดกันคล้ายท่อ เมื่อมีใบเจริญขึ้นใหม่ที่ใจกลางลำต้นเทียม ขอบกาบที่จรดกันนั้นก็จะแยกออกจากกัน (Simmonds et al., 1995) ความสูงของกล้วยมีความผันแปรมากขึ้นอยู่กับพันธุ์ปลูกและสภาพแวดล้อม เช่น กลุ่มกล้วยหอมแคระ (Dwarf Cavendish) มีความสูงประมาณ 3-5 เมตร และ กลุ่มกล้วยหอมทอง (Gros Michel) สูงประมาณ 7 เมตร ขนาดของใบแรก อาจยาวได้ถึง 2.7 เมตร และกว้าง 60 เซนติเมตร แผ่นใบมีขนาดใหญ่ ปลายใบมน รูปใบขอบขนาน โคนใบมน มีสีเขียว ใบฉีกขาดได้ง่ายจากลม ทำให้บางครั้งมองดูคล้ายใบเฟิร์น รากเป็นระบบรากฝอย แผ่ไปทางด้านกว้างมากกว่าทางแนวดิ่งลึก (เบญจมาศ ศิลาชัย, 2551; กัลยาณี สุวิทวัส และคณะ, 2557)

#### 2.2 จินโนมของกล้วย

กล้วยสามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ *Musa acuminata* (A-genome,  $2n = 2x = 22$ ), *Musa balbisiana* (B-genome,  $2n = 2x = 22$ ), *Musa schizocarpa* (S-genome,  $2n = 2x = 22$ ) และ *Australimusa* species (T-genome,  $2n = 2x = 20$ ) ซึ่งกล้วยที่ปลูกเพื่อบริโภคและปลูกเป็นการค้า ส่วนใหญ่กล้วยที่ไม่มีเมล็ด (seedless) เนื่องจากรังไข่สามารถพัฒนาเป็นผลได้โดยไม่มีการผสมพันธุ์ (parthenocarpic fruit) โดยกล้วยเหล่านี้เกิดจากการผสมข้ามตามธรรมชาติ (หรือโดยมนุษย์) ระหว่างกล้วยป่าในกลุ่ม *M. acuminata* และ *M. balbisiana* species ร่วมกับการคัดเลือกโดยมนุษย์ (McKey et al., 2010) ทำให้เกิดความหลากหลายในชนิดและจำนวนชุดจีโนม โดยสามารถจำแนกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ AA,

AAA, AB, AAB, ABB และ AB BB (Simmonds et al., 1955) กล้วยที่รับประทานได้ (edible cultivars) ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม allopolyploid triploids (AAA; AAB; หรือ ABB;  $2n = 3x = 33$ ) (Perrier et al., 2011) เช่น กล้วยกลุ่ม AAB (plantains คือ กล้วยสุก ที่เนื้อเนื้อกระด้าง ไม่มีรสหวาน จึงต้องทำให้สุกโดยใช้ความร้อน ก่อน ก็จะทำให้กล้วยมีรสชาติหวานขึ้น เช่น กล้วยหักมุก) และกล้วยกลุ่ม AAA (dessert banana เช่น Cavendish) กลุ่ม AAB (plantains) และ กลุ่ม ABB (cooking bananas) ซึ่งเป็นกล้วยที่มีผลสุก เนื้ออ่อนรสหวาน รับประทานสดได้โดยไม่ต้องผ่านความร้อน (เบญจมาศ, 2551)

### 2.3 การจำแนกสายพันธุ์กล้วย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การจัดจำแนกสายพันธุ์กล้วยโดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characterization) ร่วมกับการวิเคราะห์สถิติเพื่อประเมินความหลายหลายระหว่างสายพันธุ์ (Bhargava et al. 2007) โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญมีจำนวน 38 ลักษณะ ได้แก่ Leaf habit, Pseudostem height (m), Pseudostem aspect, Predominant underlying colour of pseudostem, Blotches at petiole base, Blotches colour, , Petiole canal leaf III, Petiole margins, Petiole margin colour, Leaf blade length (cm), Colour of leaf upper surface, Colour of leaf lower surface, Shape of leaf blade base, Colour of mid-rib dorsal surface, Colour of mid-rib ventral surface, Peduncle length (cm), Peduncle colour, Peduncle hairiness, Bunch position , Bunch shape, Bunch appearance, Rachis position, Male bud shape, Bract apex shape, Bract imbrications, Colour of bract external face, Male bract shape, Wax on the bract, Presence of grooves on the bract, Compound tepal basic colour, Free tepal colour, Free tepal shape, Free tepal appearance, Free tepal apex development, Free tepal apex shape, Pollen sac colour, Dominant colour of male flower, Fruit position, และ Fruit length (cm) (Simmonds et al., 1995; Atom et al., 2015; Singh et al., 2015)

ตัวอย่างเช่น ลักษณะของช่อดอกกล้วย พบว่ามีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์กล้วย ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ลักษณะของช่อดอกกล้วยสายพันธุ์ต่างๆ ที่ปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์เมือง Yucatan ประเทศ Mexico. A; *Musa coccinea*, B: *M. velutina*, C: *M. laterita*, D: *M. beccarii*, E: *M. textiles*, F: *M. acuminata*, G: *M. balbisiana*, H: dessert banana (AAA), I: plantain (AAB), J: tetraploid hybrid (AAAB) and K: cooking banana (ABB) with two inflorescences. (Valdez-Ojeda et al., 2014)

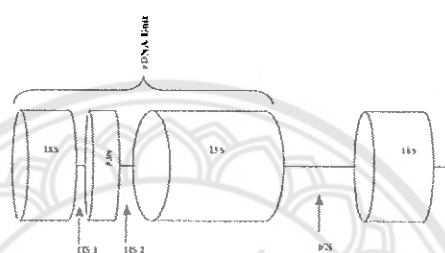
#### 2.4 การจำแนกสายพันธุ์กล้วย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดจำแนกชนิดของกล้วย มีด้วยกันหลายเทคนิคที่ใช้ร่วมกับ Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าถูกต้องแม่นยำ แม่นอนและรวดเร็วโดยสามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ ได้แก่

1) เทคนิค internal transcribed spacer (ITS)-PCR internal transcribed spacers (ITS) marker ซึ่งเป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่ขึ้นระหว่าง rDNA (รูปที่ 2.2) เช่น ออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 จากนั้นทำการตัดชิ้นส่วน PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *RsaI* พบว่า พันธุกรรมของกล้วย A genome (*Musa acuminata*; AA), B genome (*M. balbisiana*; BB) และกล้วยน้ำว้า (ABB

genome) โดยให้ restriction-enzyme-PCR product ขนาด 530bp สำหรับ A genome หรือ 350 และ 180bp สำหรับ B genome (de Jesus et al., 2013)

นอกจากนี้ Hapsari et al (2015) รายงานการใช้เทคนิค ITS สำหรับ PCR-RFLP โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCG TAA CAA GGT AGG CGT TTC TG-3') และ ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGATAT GC-3') ที่สามารถเข้าเกาะกับ 26S rDNA จากนั้นทำการตัดชิ้นส่วน PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *RsaI* ได้ ดีเอ็นเอขนาด 530 และ 120bp สำหรับ A genome หรือ 350 และ 120bp สำหรับ B genome



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทั่วไปของ ribosomal DNA unit ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ 18S, 5.8S and 26S rRNA subunits โดยมีส่วนของ internal transcribed spacers (ITS) ชนิด ITS1 ขึ้นระหว่าง 18S กับ 5.8S DNA และ ITS2 ขึ้นระหว่าง 5.8S กับ 28S DNA และ intergenic spacer (IGS) ขึ้นระหว่าง 28S กับ 18S DNA ในสิ่งมีชีวิต (Nwakanma et al., 2003)

2) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Simple sequence repeat (SSR or microsatellite) marker ชนิด Ma GSS8 (F: GAC AAA GCC GGC AAA AGT และ AG; R: CGG TAG GCA ACT CGT TCA AT) จำแนกสายพันธุ์กล้วยจำนวน 50 genotypes ผลการทดลองพบว่า กล้วย AA genome ให้แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 733 bp, ส่วน BB genome ให้แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 652 bp สำหรับ (Mahanti et al., 2015)

3) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker และ Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) marker เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพมากสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยลูกผสม (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*) ชนิด plantain (AAB subgroups) และ cooking bananas (ABB subgroups) ผลการทดลองพบว่าทั้ง RAPD-maker ชนิด OPA-18 (AGGTGACCGT) และ ISSR-marker ชนิด UBC-834 (AG)<sub>8</sub>YT สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างกล้วยในกลุ่ม AAB- และ ABB-subgroups ได้ โดยให้ RAPD- และ ISSR-PCR product ขนาดประมาณเพียง 750bp หรือ 950 ในกลุ่ม AAB- หรือ ABB-genome ตามลำดับ (Poerba et al., 2010)

นอกจากนี้ Resmi et al (2016) รายงานถึงการใช้เครื่องหมาย RAPD เพื่อจำแนกหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยกลุ่มจีโนม diploid (AA, BB, และ AB) และ triploid (AAA, AAB และ ABB) ในแปลงรวบรวมพันธุกรรมของภาคใต้ ประเทศอินเดีย ผลการทดลองพบว่า ไพรมอร์ชนิด S-13 (TTCCCCCGCT) ให้แถบ RAPD-PCR product ขนาดประมาณ 400bp ในกล้วยจีโนม AA, AB, AAA และ AAB (แต่ไม่ปรากฏในกล้วยจีโนม BB และ ABB genome) และให้แถบ RAPD-PCR product ขนาดประมาณ 320bp และ 1000bp ในกล้วยจีโนม BB และ ABB genome (แต่ไม่ปรากฏในกล้วยจีโนม AA, AB, AAA และ AAB) และ ไพรมอร์ชนิด S-14 (TCCGCTCTGG) ให้แถบ RAPD-PCR product ขนาดประมาณ RAPD-PCR product ขนาดประมาณ 700bp ในกล้วยจีโนม BB และ ABB genome (แต่ไม่ปรากฏในกล้วยจีโนม AA, AB, AAA และ AAB)

4) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด banana repetitive DNA (หรือ DNA satellites) เป็นลำดับเบสที่มีความอนุรักษ์ในแต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยที่อยู่ภายในและระหว่างกลุ่มของจีโนม A and B genomes เช่น set of primers specific for CL18 and CL33 satellites (Cizkova et al., 2013)

5) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) เช่น *copia*-IRAP primers พบว่าให้ the B specific band single band ขนาด 420 bp (AAB and ABB) แต่ไม่พบใน the AA and AAA cultivars (Nair et al., 2005) เมื่อนำ PCR product มาตัดด้วย *AluI* พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 bp ที่หนาแน่น ในกล้วยกลุ่ม ABB genomes มากกว่าในกล้วยกลุ่ม AAB genomes (Pachau et al, 2014)

นอกจากนี้ Shelke et al (2015) รายงานว่า IRAP marker ชนิด เช่น 3LTR สามารถใช้ตรวจสอบ B-genome ในโดยให้แถบดีเอ็นเอขนาด 180 bp ในกล้วยจีโนม BB และลูกผสม ABB เป็นต้น

### บทที่ 3

#### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

This chapter outlines how the study was carried out from DNA isolation, quantification and standardization, RAPD- and SRAP PCR analysis, DNA of interest identification and recovery from the agarose gel, cloning, sequencing, SCAR primer development and SCAR primer fidelity testing. All these research experiments were conducted in the Naresuan University, Centre of Agricultural Biotechnology (CAB) laboratory and the faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, department of Agriculture (Lab-room AG2307). The plant materials were collected from Agriculture Extension and Development Center in Phitsanulok.

#### 3.1 Plant material and Sample preparation

Banana leaf samples were collected from 19 cultivars (Table 3.1) from ex-situ germplasm collection in Agriculture Extension and Development Center, Phitsanulok (Figure 3.1) Fresh banana cigar leaf (200g) were cut, placed in ice box, and transported to the laboratories in Naresuan University and placed in -20°C freezer for further application.

The leaf samples were washed with water, grounded using mortar in liquid Nitrogen (N<sub>2</sub>) and put in 1.5ml microcentrifuge tubes and stored in -80°C.



Figure 3.1 Banana (*Musa spp*) leaves sampling for genomic DNA extraction

Note: All samples were collected from Agriculture Extension and Development Center, Phitsanulok, Thailand.

Only newly emerged, clean and disease-free cigar leaves were selected for sample collection.

Table 3.1 Lists of *Musa* accessions used in this study

No.	English ( local name)	Thai name	Genome	Cultivar	
1	Kluai Nam Wa Tha Yang	กล้วยน้ำว้าท่ายาง	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	Specimens
2	Kluai Nam Wa Kab Khiao	กล้วยน้ำว้ากาบขาว	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	
3	Kluai Nam Wa Mali-Ong	กล้วยน้ำว้ามะลิองค์	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	
4	Kluai Hak Muk Thong	กล้วยหักมุกสีทอง	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	
5	Kluai Hak Muk Nuan	กล้วยหักมุกนวล	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	
6	Kluai Nam Wa Dam	กล้วยน้ำว้าดำ	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	
7	Kluai Nam Wa Ngern	กล้วยน้ำว้าเงิน	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	
8	Kluai Nam Wa Nuan Jan	กล้วยน้ำว้านวลจัน	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	
9	Kluai Nam Wa Khiao	กล้วยน้ำว้าเขียว	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	
10	Kluai Nam Wa U-bon	กล้วยน้ำว้าอุบล	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	
11	Kluai Nam Wa Phrarachthan	กล้วยน้ำว้า พระราชทาน	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	
12	Kluai Nom Mi	กล้วยนมหมี่	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	Outliers
13	Kluai Hin	กล้วยหิน	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	
14	Kluai Nam Wa Pak Chong 50	กล้วยน้ำว้าปากช่อง	ABB	<i>Musa x paradisiaca</i>	
15	Kluai Hom Thong	กล้วยหอมทอง	AAA	<i>Musa x paradisiaca</i>	
16	Kluai Hom Khiao	กล้วยหอมเขียว	AAA	<i>Musa x paradisiaca</i>	
17	Kluai Nam Thai	กล้วยน้ำไท	AA	<i>Musa acuminata</i>	
18	Kluai Tani Dam	กล้วยตานีดำ	BB	<i>Musa balbisiana</i>	
19	Kluai Tani	กล้วยตานี	BB	<i>Musa balbisiana</i>	

Note: *Musa x paradisiaca* indicates hybrid cultivars used for cooking and dessert bananas.



### 3.2 Research instruments

Mortar and pestles, pipette, PCR reaction tubes, water bathe, vortex, micro-centrifuge, microwave, thermal cycler T100, gel documentation system (gel tank, casting tray, UV trans-illuminator and viewing monitor), spectrophotometer (Synergy H1), static incubator and shaking incubator.

### 3.3 Genomic DNA isolation

Genomic DNA was isolated by using the Protocol according to innuPREP PLANT DNA Kit (Analytik Jena AG, Germany). In brief, leaf samples were removed from the freezer and 400µl OPT Lysis buffer was immediately added to it and the mixture was vortexed and incubated at 65°C for 30 minutes (vortexed after every 10 minutes interval). Precipitation Buffer P (100µl) was added and mixed for 5 seconds by vortexing, and incubated at Room Temperature (RT) for 5 minutes. The mixture was centrifuged at 12000rpm for 5 minutes and the supernatant was then added into a Prefilter column, placed on a receiving tube, centrifuged at 12000rpm for 1 minute. The flow-through solution was transferred into a 1.5ml microcentrifuge tube and 4µl of RNase A was added, vortexed, and then incubated at Room Temperature (RT) for 5 minutes, then SBS (DNA Binding) buffer (200µl) was added to the mixture in the microcentrifuge tube, and then vortexed. The solution was added into Spin Filter column, placed on the receiver tube and centrifuged at 12000rpm for 2 minutes and MS (Washing DNA) buffer (650µl) was added into the Spin Filter and centrifuged at 12000 rpm for 1 minute. The flow-through solution was discarded and the process was repeated once again. The filtrate was then discarded and centrifuged at maximum speed for 2 minutes to remove ethanol residues and the Spin Filter was placed to an elution tube (1.5ml microcentrifuge tube) and 30µl of elution buffer was added in the middle of the filter, incubated for 1 minute at room temperature and centrifuged at 8000rpm for 1 minute. The flow-through solution (genomic DNA) was stored in -20°C for further uses.

### 3.4 Genomic DNA qualification and quantification

#### 1) Gel electrophoresis

Agarose (1%) was dissolved in 1 X TAE and heated to clear liquid using microwave, and then cooled to 60°C then 0.5ng/μl Ethidium bromide (EtBr) (Life Science Research, USA) was added into the mixture in a Biohazard hood, then the mixture was poured into a balanced casting tray fitted with combs and left to solidify for 40 minutes. The comb was removed and gel tray was transferred to gel tank, containing 1 X TAE buffer. the gDNA (1μl) was mixed with 4μl 6x loading dye, 1μl RNase-Free water, and the mixture was loaded into the gel and 4μl 1kb DNA ladder RTU (GeneDireX, USA) was loaded in the first lane of the gel as a DNA marker. The gel was run at 100 V for 30 minutes. The DNA bands was visualized under UV transilluminator (Vilber Lourmat, England) and then documented.

#### 2) DNA quantification using microplate reader (Synergy H1)

The gDNA was quantified and qualified by a UV-spectrophotometer at OD<sub>260</sub> and OD<sub>280</sub> nm (Microplate reader, Synergy H1 BioTek, USA) used in accordance to the manufacturer's manual. The microplates (loading plates) were cleaned with 70% ethanol and blanked using the elution buffer applied for the DNA extraction as standard calibration for taking the readings. DNA measuring parameters were set and DNA samples were loaded into the microplate reader plates in duplicates. The double stranded (ds) DNA parameter was selected and the dsDNA was quantified at the absorbance ratio of 260/280nm using the UV spectrophotometry. The standard purity ratio for dsDNA lies between 1.6 – 1.8 (Table 4) according to the Gen5 Sample Protocols, 2006.

### 3) DNA normalization

Each sample of gDNA was diluted to working concentration of 25ng/μl prior to PCR process in appropriate volume of RNase-Free H<sub>2</sub>O, calculated using the concentration formula  $C_1V_1 = C_2V_2$  on excel spread sheet.

### 3.5 Genetic diversity based on RAPD- and SRAP-PCR techniques

Initially sixty three RAPD were applied for amplification of 30 banana cultivars (*Musa* spp.) but due to poor reproducibility of the primers and lack of consistent gene amplification of some cultivars, only 13 RAPD markers and 19 banana cultivars were finally selected for this study. Twenty four SRAP markers combinations were initially applied for this study but eight were finally used for profiling the 19 banana cultivars. The two markers were both applied in the PCR assay to maximize reliability and reproducibility on the profiling process.

#### 1) RAPD – PCR technique

Standard PCR with OnePCR (Pre-mixed Taq,DNA polymerase, Buffer, dNTPs and loading dye) (GeneDireX, USA) was applied to fingerprint 19 Banana cultivars (*Musa* spp.) (Table 3.1) using thermal cycler BIORAD T100™, BIORAD, USA). The PCR amplifications were performed using RAPD universal primers (Table 3.2) with total reaction volume of 25μl. The master mix per reaction was as follows; 11.0μl OnePCR buffer, 11.0μl RNase Free-H<sub>2</sub>O, 1.0μl RAPD primer and 2.0μl template DNA. The PCR protocol was carried out with initial denaturation cycle at 95°C for 5 minutes and then 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 25°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute, the final extension was at 72°C for 5 minutes.

Table 3.2 Thirteen RAPD universal primers, sequences

No.	Primer	Sequences (5'-3')
1	OPA01	CAGGCCCTTC
2	OPA02	TGCCGAGCTG
3	OPA05	AGGGGTCTTG
4	OPD07	TTGGCACGGG
5	OPD08	GTGTGCCCCA
6	OPE01	CCCAAGGTCC
7	OPE16	GGTGACTGTG
8	OPK01	CATTCGAGCC
9	OPK04	CCGCCCCAAC
10	OPK07	AGCGAGCAAG
11	OPK08	GAACACTGGG
12	OPK11	AATGCCCCAG
13	OPK12	TGGCCCTCAC

*Note:* Primers designated for RAPD-PCR were optimized to uniform annealing temperature.

## 2) SRAP – PCR technique

Sequences-related amplified polymorphism (SRAP) primers (Table 3.3) were used to amplify the 19 banana cultivars (Table 1) using Standard QuickTaq master mix (Analytik Jena, AG Germany). The PCR reaction was performed by using eight SRAP primer pairs (Table 3) and 2.0µl template DNA. The PCR condition was set with the initial denaturation at 94°C for 1minute, and 5 cycles at 94°C for 1 minute, 35°C for 1 minute and 72 °C for 1minute and another 35 cycles at 94°C for 1 minute, 50°C for 1 minute, 72°C for 1minute and final extension 72°C for 5 minutes.

Both PCR products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose dissolved in 1 X TAE buffer, stained with EtBr.

Table 3.3 Eight SRAP primer sequences

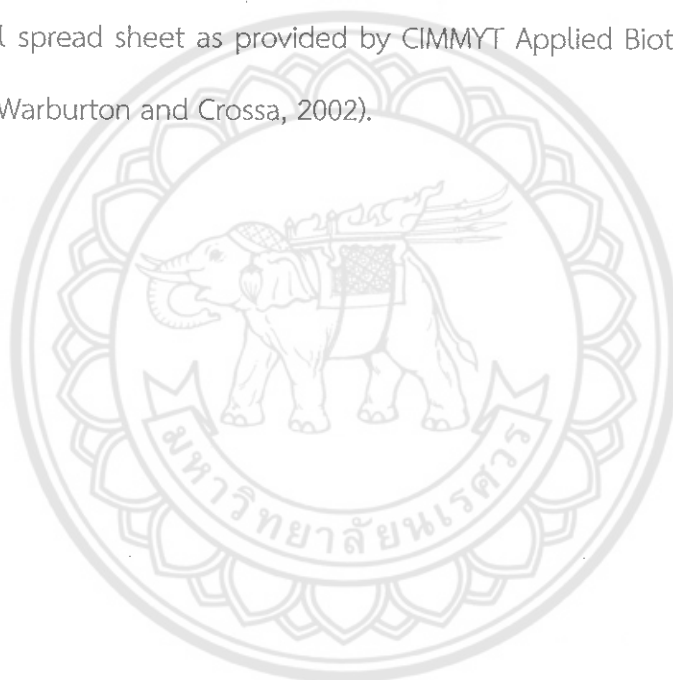
No.	Primer	Sequences (5'-3')
Forward primer		
1	Me 1	TGAGTCCAAACCGGATA
2	Me 2	TGAGTCCAAACCGGAGC
3	Me 3	TGAGTCCAAACCGGAAT
4	Me 4	TGAGTCCAAACCGGACC
Reverse primer		
1	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
2	Em2	GACTGCGTACGAATTGCG
3	Em4	GACTGCGTACGAATTGGA
4	Em5	GACTGCGTACGAATTAAAC
5	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
6	Em8	GACTGCGTACGAATTCTG

*Note:* SRAP markers designated for PCR amplification were combination from previous research.

### 3.6 Data analysis

The PCR-amplicons generated by both RAPD and SRAP markers were considered as independent putative alleles. Distinct and clear bands were selected and scored for presence (1) or absence (0) of DNA fragments. A dendrogram based on hierarchical clusters was analyzed by the UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean) approach using FreeTree and TreeView program version 1.6.6.

The generated data were calculated for Polymorphic Information Content (PIC) value by using the formula,  $PIC = 1 - \sum p_i^2$ . Where  $p_i$  is the frequency of the  $i^{th}$  allele for individual  $p$  applied on excel spread sheet as provided by CIMMYT Applied Biotechnology for genetic diversity research (Warburton and Crossa, 2002).



## บทที่ 4

### ผล และวิจารณ์

Nineteen out of thirty *Musa* accession initially collected were applied for the genomic DNA extraction, quantified on gel electrophoresis and microplate reader (Synergy H1). These gDNA were applied for RAPD and SRAP assay to access the genetic diversity for specimens (14 ABB genome) and outliers (2 AAA, AA, and 2 BB genomic groups. Polymorphic RAPD amplicons designated for SCAR markers were identified, extracted, cloned and sequenced. SCAR primers were synthesized and SCAR primers were screened for authentication and fidelity.

#### 4.1 Genomic DNA qualification

Genomic DNA was quantified for integrity on 1.0% gel in 1 X TAE buffer, stained with EtBr. The gel electrophoresis was set at 100V for 1 hour then visualized on gel documentation system. As shown in Figure 4.1, DNA bands corresponding to the gDNA (more than 10 kb) were highly enriched, sharp, and without a smear. This indicated that the gDNA in the samples were of high quality and purity with no apparent DNA degradation. A band that was smaller than 3000 base pairs was faintly visible and there was no evidence of a band between the well, indicating there was no detectable protein and polysaccharide contamination.



Figure 4.1 Nineteen Musa accession showing DNA integrity

*Note:* the presence of some bright bands indicates high yield gDNA. M is a 1kb DNA ladder RTU (GeneDireX, Inc., USA).

The spectrophotometer (Synergy H1) results also revealed high yield of the DNA, a high concentration of 150.3ng/μl was observed in lane 11 and lowest was 26.2ng/μl at lane 4. The results showed that the  $OD_{260}/OD_{280}$  ratios were within the standard for dsDNA which ranged between 1.6-1.8.nm (Table 4.1). The results indicated that the DNA yield and quality were high and applicable for conventional PCR process as report in Quantitation and Purity of Nucleic Acids (2008) The DNA was normalized to 25ng/μl by adding RNase-Free H<sub>2</sub>O calculated using the formula  $C_1V_1 = C_2V_2$ . The working concentration of 20 - 25ng/μl was deemed suitable for RAPD and SRAP PCR assay (Mukwa et al., 2016; Phothipan et al., 2005).



Table 4.1 Genomic DNA qualification and normalization of *Musa* accessions

No.	DNA purity OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	DNA Conc.(ng/μl)	Initial DNA Vol. (μl)	Vol. of H <sub>2</sub> O (μl)	DNA (WC). (ng/μl)	Final DNA Vol. (μl)
1	1.7	78.0	32.0	68.0	25	100
2	1.8	77.6	35.8	64.2	25	100
3	1.8	80.7	29.2	70.8	25	100
4	1.5	26.2	95.3	4.7	25	100
5	1.7	75.8	36.0	64.0	25	100
6	1.6	32.7	79.5	20.5	25	100
7	1.7	80.2	29.0	71.0	25	100
8	1.8	103	22.5	77.5	25	100
9	1.7	56.7	44.1	55.9	25	100
10	1.8	120.7	22.0	78.0	25	100
11	1.8	150.3	16.6	83.4	25	100
12	1.7	88.3	24.0	76.0	25	100
13	1.8	129.0	20.0	80.0	25	100
14	1.7	76.8	34.0	66.0	25	100
15	1.6	149.0	16.8	83.2	25	100
16	1.8	78.5	36.0	64.0	25	100
17	1.7	80.1	31.0	69.0	25	100
18	1.6	78.2	33.0	67	25	100
19	1.8	80.0	32.5	67.5	25	100

Note: the DNA normalization was done by the standard concentration formula;

WC = working concentration

## 4.2 PCR amplification

Sixty-three RAPD and eight SRAP markers were initially used to screen 19 *Musa* accessions (Table 3.1). Only 13 out of the 63 RAPD (approximately 21%) and 8 SRAP markers generated good quality PCR amplicons, and reproducible DNA-fingerprinting profiles with high consistency. Two randomly representatives of the RAPD markers (OPA07 and OPK01) (Figure 4.2) and two randomly representatives of SRAP markers (Me1-Em6 and Me1-Em8) (Figure 4.3) were the best informative markers with clear and distinct bands. A total of 129 alleles (calculated from total 1005 amplified fragments) were generated by the RAPD and SRAP markers, out of which 79 alleles (532 bands) were generated by RAPD markers and 50 alleles (473 bands) by SRAP markers with average number of bands of 40.92 and 59.13 as generated by RAPD and SRAP, respectively (Table 4.2). Of these markers, OPD07 and OPK08 generated the highest number of alleles (9 alleles), and OPA05 generated the lowest number of alleles (2 alleles). All the alleles generated 100% polymorphic fragments. Moreover, these PCR-amplicons sizes were ranged from 250 to 2100 bp as generated by RAPD markers (Table 4.2) and 100 to 1700 bp generated by SRAP markers (Table 4.2). The RAPD and SRAP-marker amplified with a range from 2 to 9 alleles (an average 6.08 alleles per marker), and from 4 to 7 alleles (an average of 6.25 alleles per marker), respectively. These results indicated that both markers were able to generate an almost similar average number of alleles per marker, which agreed with a report from Simsek et al (2016), who found that the DNA extracted from *Cyclamen* were successfully amplified by using RAPD and SRAP markers, with a similar average number of alleles per marker.

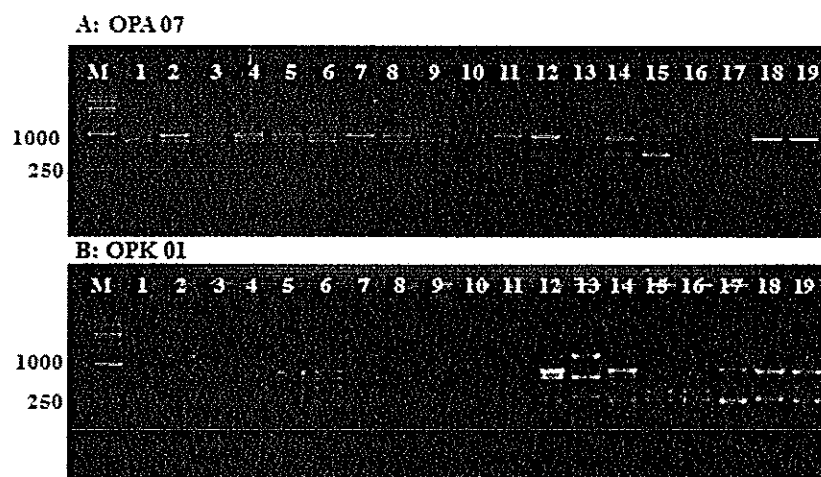


Figure 4.2 RAPD-PCR amplicons profiles of 19 *Musa* accessions using OPA07 (A), OPk01 (B) markers

Note: lane M indicates 1kb DNA RTU Ladder (GeneDireX, USA) and lane 1-19 refers to the lists of *Musa* accessions in Table 3.1.

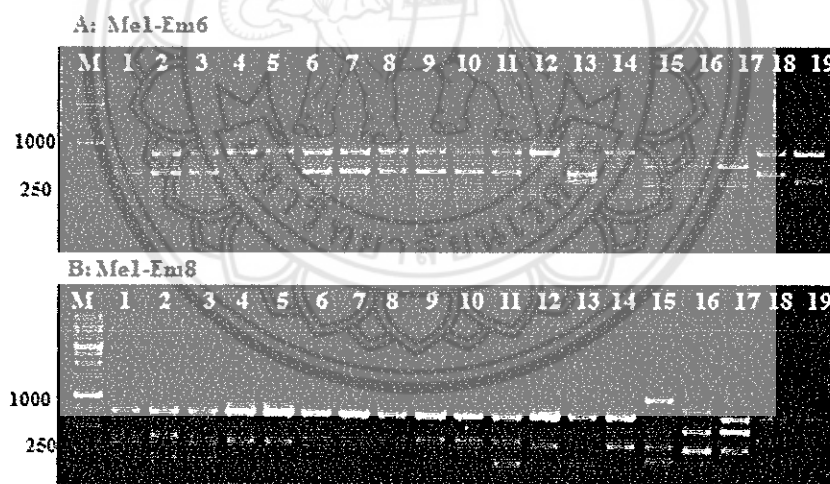
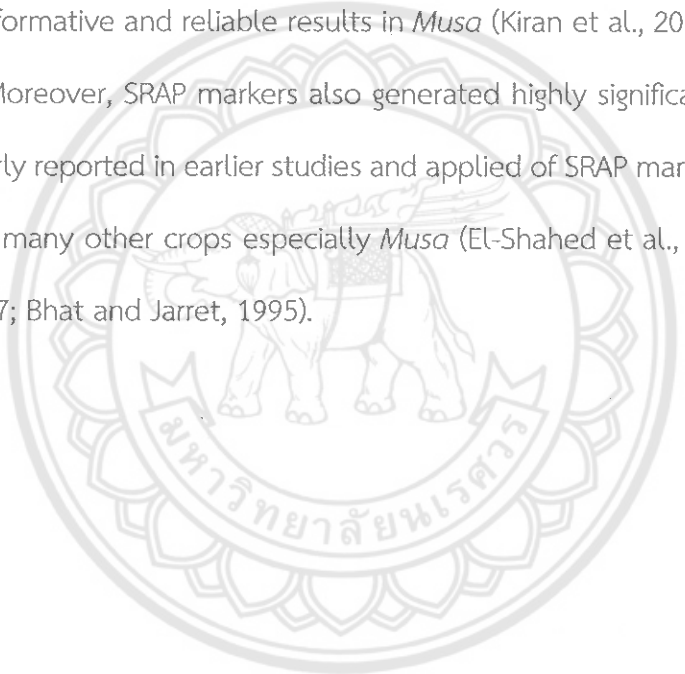


Figure 4.3 SRAP-PCR amplicons profiles of 19 *Musa* accessions using Me1-Em6 (A) and Me1-Em8 (B) markers

Note: Lane M indicates 1kb DNA ladder RTU (GeneDireX, USA), and lane 1-19 refers to the lists of *Musa* accessions in Table 3.1.

### 4.3 Polymorphic Information Content (PIC) assessments

The PIC value was calculated between 19 *Musa* accessions using scored data from both molecular markers. The highest PIC value was 0.87 as observed in the OPK07 marker, while the lowest was 0.44 as observed in the OPA05 marker. Although the RAPD showed the highest and lowest PIC value, in this study, the SRAP markers exhibited moderately high PIC value across the cultivars which ranged from 0.84 as observed in the Me1-Em4 markers to 0.63 as observed in the Me2-Em1 markers. The average PIC value for both molecular markers was 0.75 (Table 4.2). In agreement with many reports, RAPD markers especially had been used extensively with informative and reliable results in *Musa* (Kiran et al., 2015; Peng et al., 2008; Jain et al., 2007). Moreover, SRAP markers also generated highly significant PIC values in this study, which similarly reported in earlier studies and applied of SRAP markers for assessing the genetic diversity in many other crops especially *Musa* (El-Shahed et al., 2017; Li et al., 2013; Esposito et al., 2007; Bhat and Jarret, 1995).



2 OK  
405  
.179  
03256  
2561



Table 4.2 Features of RAPD- and SRAP- PCR amplicons used for assessing genetic diversity of the 19 *Musa* accessions.

15 2554

No.	NM	Sequences (5'-3')	NA	NB	PIC	PPA (%)	AS
1	OPA01	CAGGCCCTTC	4	69	0.79	100	900-2000
2	OPA02	TGCCGAGCTG	7	53	0.80	100	400-1800
3	OPA05	AGGGGTCTTG	2	63	0.87	100	850-1000
4	OPD07	TTGGCACGGG	9	54	0.83	100	500-1400
5	OPD08	GTGTGCCCCA	8	32	0.75	100	350-1400
6	OPE01	CCCAAGGTCC	6	33	0.55	100	600-2000
7	OPE16	GGTGACTGTG	5	54	0.83	100	600-1400
8	OPK01	CATTCGAGCC	5	56	0.82	100	1200-2100
9	OPK04	CCGCCCAAAC	6	29	0.72	100	250-1500
10	OPK07	AGCGAGCAAG	8	20	0.68	100	300-1300
11	OPK08	GAACACTGGG	9	27	0.74	100	300-1200
12	OPK11	AATGCCCCAG	6	30	0.85	100	520-1800
13	OPK12	TGGCCCTCAC	4	12	0.44	100	750-900
Total			79.00	532	-	-	-
Average			6.08	40.92	0.74	-	-
1	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	7	74	0.84	100	250-1400
	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA					
2	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	6	47	0.74	100	250-1000
	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA					
3	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	7	48	0.73	100	150-1000
	Em8	GACTGCGTACGAATTCTG					
4	Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	4	39	0.63	100	250-500
	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT					
5	Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	6	67	0.78	100	200-1000
	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC					
6	Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	7	64	0.78	100	250-1500
	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC					
7	Me1	TGAGTCCAAACCGGAAT	6	52	0.74	100	100-1400
	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT					
8	Me3	TGAGTCCAAACCGGACC	7	80	0.83	100	150-1700
	Em8	GACTGCGTACGAATTCTG					
Total			50.00	473	-	-	-
Average			6.25	59.13	0.76	-	-
Grand total			129.00	1005	-	-	-
Cumulative average			-	-	0.75	-	-

Note: No. = Serial number, NM = Name of marker, NA = Number of alleles, NB = Number of bands, PIC = Polymorphic Information Content, PPA = Percentage of polymorphic allele, AS = Amplicons size (bp)

#### 4.4 Dendrogram analysis

The phylogenetic tree analysis among 19 *Musa* accessions was calculated by the UPGMA approach, resulting into two major clusters (I and II) (Figure 4.4). Cluster I comprised of all ABB, AA, and BB genomes while cluster II comprised of only AAA genotype. Additionally, it demonstrated that there was relatively high genetic relationship within the ABB genotypes, compared to AAA, AA and BB genotypes. In cluster I, the result was able to clearly separate two sub-clusters, cluster I-a and cluster I-b. The cluster I-a contained only *Musa* ABB genome (Kluai Hin, Nam Wa Ngern, Nam Wa Kab Khao, Mali Ong, Nam Wa dam, Nam Wa Nuan Jan, Nam Wa Phrarachthan, Nam Wa Tha Yang, Nam Wa Khiao, Nam Wa U-bon, Pak Chong 50, Hak Muk Thong, Hak Muk Nuan and Nom Mi). The sub-cluster I-b comprised of AA (Kluai Nam Thai) and BB (Kluai Tani & Kluai Tani Dam). Cluster II comprised of AAA (Hom Khiao & Hom Thong) only. Several publications have reported that the RAPD markers had high potential to provide polymorphic and were capable to be applied in characterization of genetic variation of banana cultivars (Peng et al., 2008; Jain et al., 2007; Phothipan, 2005). The SRAP markers have been also reported to generate high polymorphic and could be applied in identification among banana cultivars (Phothipan et al., 2005).

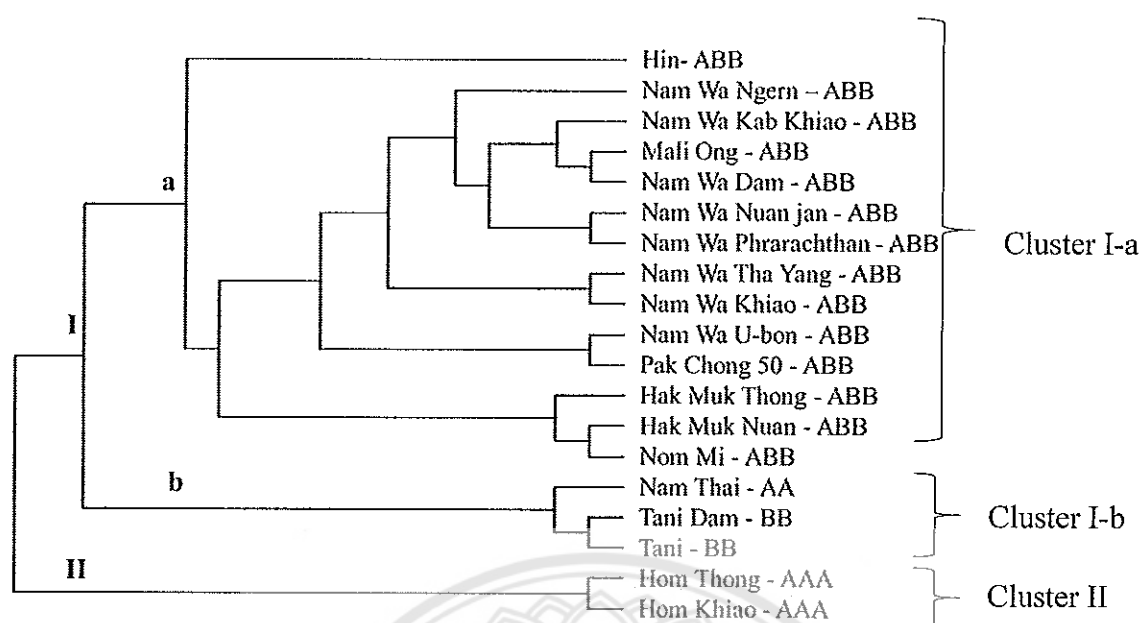


Figure 4.4 Dendrogram depicting genetic diversity among 19 *Musa* accessions based on RAPD- and SRAP-markers, using UPGMA cluster analysis approach from the FreeTree and TreeView software version 1.6.6.

Note: All cultivars names start with Kluai, all specimens clustered in I-a and the outliers in I-b and II (Table 3.1).

These selected RAPD markers (OPA7 and OPK01) and SRAP markers (Me1-Em6 and Me1-Em8) produced maximum number of strong, distinct polymorphic and reproducible fragments (Figure 4.2 and 4.3) and were highly capable to be applied in genetic analysis of other banana cultivars. Furthermore, these studies demonstrated that RAPD and SRAP markers were useful for classifying genetic relationship among the banana cultivars and feasible to be used for further specific molecular markers such as development of sequence-related amplified regions (SCAR) markers and marker assisted selection (MAS) tool as supported by former researches or for more specifying application among banana cultivars. (Bhatt et al., 2017; Balázová et al., 2016; Semsang et al., 2013; Sheidai et al., 2008; Phothipan et al., 2005).

## บทที่ 5

### สรุป และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 Conclusions

This study demonstrated that RAPD and SRAP markers were useful for classifying genetic relationship among the banana cultivars. These two sets of markers distinctively grouped the ABB genome separately from the AA and BB in the same cluster indication of closed genetic ancestry while AAA genome was clustered separately indicating that it was genetically of different parentage. It was also observed that selected RAPD markers (OPK01 and OPD07) (Figure 4.1) and SRAP markers (Me1/Em6 and Me1/Em8) (Figure 4.2) produced a maximum number of bright, distinct polymorphic and reproducible fragments. These markers were feasible to be used for the further specific molecular application such as the development of sequence-characterized amplified regions (SCAR) markers.

Therefore this study concludes that;

- 1) The RAPD and SRAP markers were useful for assessing genetic relationship among the banana cultivars as these two sets of markers were observed to distinctively grouped the ABB genome and the AAA, AA and BB in to separate clusters
- 2) The distinct polymorphic bands generated by RAPD markers can be applied for designing of SCAR primers for authentication of *Musa* accessions.



## 5.2 Recommendations

These selected RAPD markers (OPA07 and OPK01) and SRAP markers (Me1-Em6 and Me1-Em8) produced maximum number of strong, distinct polymorphic and reproducible fragments (Figure 5.1 and 5.2) and were highly capable to be applied in genetic analysis of other banana cultivars. Furthermore, these studies demonstrated that RAPD and SRAP markers were useful for classifying genetic relationship among the banana cultivars and feasible to be used for further specific molecular markers such as development of sequence-related amplified regions (SCAR) markers and marker assisted selection (MAS) tool as supported by former researches or for more specifying application among banana cultivars. (Bhatt et al., 2017; Balázová et al., 2016; Semsang et al., 2013; Sheidai et al., 2008; Phothipan et al., 2005).

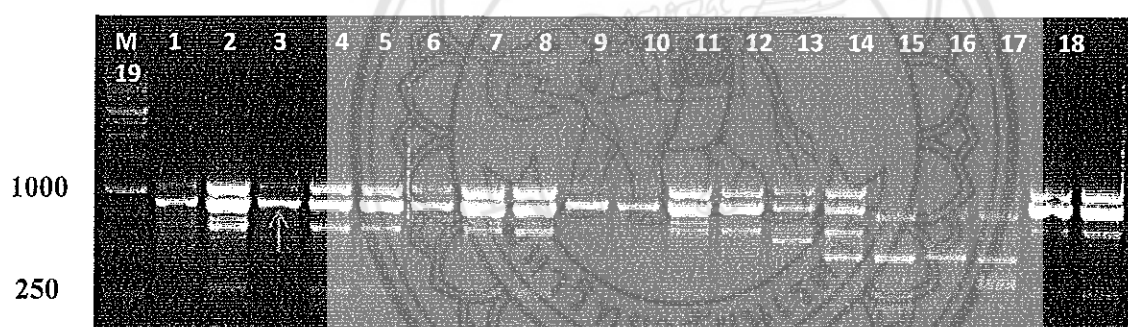


Figure 5.1 PCR amplification pattern showing the OPK07<sub>850</sub> fragment pointed by blue arrow

*Note:* M is the 1kb DNA ladder RTU. Polymorphic fragment indicated with arrow in (Figure 9, lane 3) is aligning with fragments in lane18 and 19 (BB genomes).

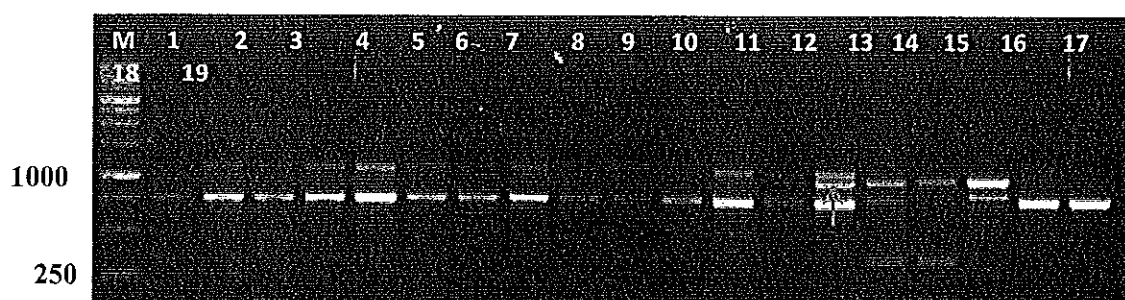


Figure 5.2 PCR amplification patterns showing the OPD08<sub>750</sub> fragment pointed by blue arrow

Note: M is the 1kb DNA ladder RTU. Polymorphic fragment indicated with arrow in (Figure 10, lane 14) is aligning with fragments in lane 15, 16 and 17 (AAA and AA genomes).

Both polymorphic fragments indicated that OPK07 and OPD08 had the ability to amplify polymorphic fragments which carries the fragment of interest in Mali Ong and Pak Chong 50 with ABB genome respectively. The results also indicated that the polymorphic fragments would be cloned and sequenced to design SCAR primer as reported in similar study by Pillay (2017), Yuan et al (2015), and Williams et al (1990).

## บทที่ 6

### References

- Atom AD., Lalrinfela P. and Thangjam R. (2015). Genome classification of banana genetic resources of Manipur using Morphological characters. *Science Vision*, 15(4), 189 – 195.
- Aurorea G., Parfait B. and Fahrasmane L. (2009). Bananas, raw materials for making processed food products. *Elsevier*, 20, 78-91. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.003>.
- Azhar M., and Heslop-Harrison J. (2008). Genomes, diversity and resistance gene analogues in *Musa* species. *Cytogenetic and genome research*, 121(1), 59-66.
- Balázová Z. Vivodík M. and Gálová Z. (2016). Evaluation of molecular diversity of central european maize cultivars. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(2), 93-98. [doi:http://dx.doi.org/10.9755/ejfa.2015.05.204](http://dx.doi.org/10.9755/ejfa.2015.05.204).
- Bhagyawant SS. (2016). RAPD-SCAR Markers: An Interface Tool for Authentication of Traits. *Journal of Biosciences and Medicines*, 04(01), 1-9. doi:10.4236/jbm.2016.41001.
- Bhat KV. and Jarret RL. (1995). Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in Indian *Musa* germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42, 107. <https://doi.org/10.1007/BF02539514>.
- Bhatt J., Kumar S., Patel S. and Solanki R. (2017). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers based genetic diversity analysis of cumin genotypes. *Annals of Agrarian Science*, 15, 434-438. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.09.001>.
- Bioscience (2018). RBC T&A Cloning Vector. [http://www.snapgene.com/resources/plasmid\\_files/ta\\_and\\_gc\\_cloning\\_vectors/RBC\\_T&A\\_Cloning\\_Vector\\_\(linearized\)/](http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/ta_and_gc_cloning_vectors/RBC_T&A_Cloning_Vector_(linearized)/).
- Bugaud C., Chillet M., Beauté MP. and Dubois C. (2006). Physicochemical analysis of mountain bananas from the French West Indies. *Scientia Horticulturae, - Elsevier*, 108(2), 167-172. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.024>.
- Castonguay Y., Cloutier J., Bertrand A., Michaud R. and Laberge S. (2010). SRAP polymorphisms associated with superior freezing tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* spp. sativa). *Theoretical and Applied Genetics*, 120(8), 1611-1619. doi:10.1007/s00122-010-1280-2.
- Cenci AJ., Hueber Y., Zorrilla-Fontanesi J., Van Wesemael J., Swennen R., Roux N., Carpentier S. and Rouard M. (2017). A genomic view of the banana (*Musa* spp.) diversification: the case of triploid ABB genome group. *Poster presented at the Plant and Genome Evolution Conference 2017. Sitges (Spain), October 1-3, 201*.
- Damasco O., Adkins S., Godwin I. and Smith M. (1997). Use of a SCAR-based marker for the early detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas. *Paper presented at the International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species Part 2* 461. <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.461.15>.

- Das M., Bhattacharya S. and Pal A. (2005). Generation and characterization of SCARs by cloning and sequencing of RAPD products: A strategy for species-specific marker development in bamboo. *Annals of Botany*, 95(5), 835-841. doi:10.1093/aob/mci088.
- Dnyaneshwar W., Preeti C., Kalpana J. and Bhushan P. (2006). Development and application of RAPD-SCAR marker for identification of *Phyllanthus emblica* LINN. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 2313-2316. doi:10.1248/bpb.29.231.
- El-Shahed AA., Abdellatif KF., Ibrahim IA., Mohamed AM., Abdelsalam IZ. and Elsehrawy OA. (2017). Efficiency of the new SRAP and TRAP markers to detect the banana somaclonal variants. *Life Science Journal*, 14 (3), 80 – 89.
- Esposito MA., Martin EA., Cravero VP. and Cointry E. (2007). Characterization of pea accessions by SRAP's markers. *Scientia Horticulturae*, 113(4), 329-335. doi:https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.04.006.
- FAO. (2017). Banana market review Preliminary results. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Bananas/Documents/Banana\\_Market\\_Review\\_December\\_2017\\_update.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Bananas/Documents/Banana_Market_Review_December_2017_update.pdf)  
<http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/en/>.
- Fu JJ., Mei ZQ., Tania M., Yang LQ., Cheng JL. and Khan MA. (2015). Development of RAPD-SCAR markers for different *Ganoderma* species authentication by improved RAPD amplification and molecular cloning. *Genetic and Molecular Research*, 2(14), 5667-5676. doi:https://doi: 10.4238/2015.May.25.19.
- Gen5 Sample Protocols and Experiments Guide. (2006) [http://bme.columbia.edu/files/seasdepts/biomedical-engineering/pdf-files/Sample Protocols and Experiments Guide.pdf](http://bme.columbia.edu/files/seasdepts/biomedical-engineering/pdf-files/Sample%20Protocols%20and%20Experiments%20Guide.pdf)
- Geering ADW., Olszewski NE., Dahal G. and Lockhart B. (2001). Analysis of the distribution and structure of integrated Banana streak virus DNA in a range of *Musa* cultivars. *Molecular Plant Pathology*, 2(4), 207 – 213. doi:10.1046/j.1464-6722.2001.00071.x.
- Jain PK, Saini ML, Pathak H. and Gupta VK. (2007). Analysis of genetic variation in different banana (*Musa* species) variety using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *African Journal of Biotechnology*, 6(17), 1987-1989.
- Khan MA., Cheng JL., Mei ZQ., Wei CL. and Fu JJ. (2016). Development of two novel specific SCAR markers by cloning improved RAPD fragments from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Leysser: Fr) Karst. *Genetics and Molecular Research*, 15(3), gmr.15038536. doi: 10.4238/gmr.15038536.
- Kiran U., Khan S., Mirza KJ., Ram M. and Abidin MZ. (2010). SCAR markers: a potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia*, 81(8), 969-976. doi:10.1016/j.fitote.2010.08.002.
- Kiran U., Moahnty S., Roy P., Behera L. and Chand P. (2015). Genetic diversity among banana cultivars from Odisha using RAPD Markers. *Science Research Reporter*, 5(2), 118-124.

- Larkin MA., Blackshields G., Brown NP., Chenna R., McGettigan PA., McWilliam H., Valentin F., Wallace IM., Wilm A., Lopez R., Thompson JD., Gibson TJ. and Higgins DG. (2007). ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404.
- Li LF. and Ge XJ. (2017). Origin and domestication of cultivated banana. *Ecological Genetics and Genomics*, 2, 1-2. doi:10.1016/j.egg.2016.10.001.
- Li G., McVetty PE., and Quiros CF. (2013). SRAP Molecular marker technology in plant science. *Plant Breeding from Laboratories to Fields* (Open access peer-reviewed Edited volume).<http://dx.doi.org/10.5772/54511>.
- Li G. and Quiros CF (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Springer-Verlag*, 103, 455-461.
- Lombard V., Bari CP., Dubreuil P., Blouet F. and Zhanga. D. (1999). Genetic Relationships and Fingerprinting of Rapeseed Cultivars by AFLP: Consequences for Varietal Registration. *Alliance of Crop, Soil, and Environmental Science Societies*, 40(5), 1417-1425. doi:doi:10.2135/cropsci2000.4051417x.
- Mabonga L. (2014). Development of an 'A' genome-specific sequence characterised amplified region (SCAR) marker in *Musa* L. (bananas and plantains). (*Magister Technologiae* ), *Vaal University of Technology Vanderbijlpark*.
- Manzo-Sanchez G., Buenrostro-Nava MT., Guzman-Gonzalez S., Orozco-Santos M., Youssef M. and Medrano RM. (2015). Genetic Diversity in Bananas and Plantains (*Musa spp.*). *Molecular Approaches to Genetic Diversity.. INTECH*, chapter4. <http://dx.doi.org/10.5772/59421>.
- Mobambo KN., Gauh F., Vuylsteke D., Ortiz R., Pasberg-Gauh C. and Swennen R. (1993). Yield loss in plantain from black sigatoka leaf spot and field performance of resistant hybrids. *Field Crops Research*, 35(1), 35-42. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-4290\(93\)90134-9](https://doi.org/10.1016/0378-4290(93)90134-9).
- Mukwa LF., Gillis A., Vanhese V., Romay G., Galzi S., Laboureau N. and Bragard C. (2016). Low genetic diversity of Banana bunchy top virus, with a sub-regional pattern of variation, in Democratic Republic of Congo. *Virus Genes*, 52(6), 900-905. doi:10.1007/s11262-016-1383-1.
- Naikwade P., Gaurav S., Sharayu D. and Kailas J. (2014). Evaluation of antibacterial properties of *Musa paradisiaca* L. Leaves. *Paper presented at the Proceeding of the national conference on conservation of natural resources and biodiversity for sustainable development*, <http://biosciencediscovery.com>.
- Nair AS., Teo CH., Schwarzacher T. and Harrison PH. (2005). Genome classification of banana cultivars from South India using IRAP markers. *Euphytica*, 144(3), 285-290. doi:10.1007/s10681-005-7321-2.

- Ning SP., Xu LB., Lu Y., Huang BZ. and Ge XJ. (2007). Genome composition and genetic diversity of Musa germplasm from China revealed by PCR-RFLP and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 114(4), 281-288. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.07.002>.
- Nsabimana A. and Staden JV. (2007). Assessment of genetic diversity of Highland bananas from the National Banana Germplasm Collection at Rubona, Rwanda using RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 113(3), 293-299. doi:10.1016/j.scienta.2007.04.010.
- Nwauzoma AB., Uma S., Saraswathi M. and Mustaffa M. (2011). Developing markers for Sigatoka leaf spot disease (*Mycosphaerella musicola* Leach) resistance in banana (*Musa* spp.). *African Journal of Biotechnology*, 10(33), 6213-6219.
- Onguso JM., Ndiritu DW. and Mizutani F. (2004). Genetic characterization of cultivated bananas and plantains in Kenya by RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 99 (1), 9-20.
- Opara UL., Jacobson D. and Al-Saady NA. (2010). Analysis of genetic diversity in banana cultivars (*Musa* cvs.) from the South of Oman using AFLP markers and classification by phylogenetic, hierarchical clustering and principal component analyses. *Journal of Zhejiang University Science B*, 11(5), 332-341. doi:10.1631/jzus.B0900310.
- Osipova ES., Lysenko EA., Troitsky AV., Dolgikh YI., Shamina ZB. and Gostimskii SA. (2011). Analysis of SCAR marker nucleotide sequences in maize (*Zea mays* L.) somaclones. *Plant Science*, 180(2), 313-322. doi:10.1016/j.plantsci.2010.10.004.
- Peng L., Ru M., Wang B., Wang Y., Li B., Yu J. and Liang Z. (2014). Genetic diversity assessment of a germplasm collection of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, 84-92. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.01.020>.
- Peng S., Feng N., Guo M., Chen Y. and Guo Q. (2008). Genetic variation of *Carthamus tinctorius* L. and related species revealed by SRAP analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(7), 531-538. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bse.2008.03.010>.
- Phothipan S., Silayoi B., Wanichkul K. and Apisitwanich S. (2005). Genetic relationship among bananas in AA, AAB and BB groups using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence related amplified polymorphism (SRAP) techniques. *Kasetsart Journal*, 39(4), 703-710.
- Pillay LM. (2017). SCAR Marker for the A genome of bananas (*Musa* spp. L.) supports lack of differentiation between the A and B genomes. *Journal of Agricultural Science*, 9(6), 64-73. doi:<https://doi.org/10.5539/jas.v9n6p64>.
- Ploetz RC., Kepler AK., Daniells J. and Nelson SC. (2007). Banana and plantain—an overview with emphasis on Pacific island cultivars. *Species profiles for Pacific Island agroforestry*, 21-32.
- Poerba YS. and Ahmad F. (2010). Genetic variability among 18 cultivars of cooking bananas and plantains by RAPD and ISSR markers. *Biodiversitas*, 11(3), 118-123.

- Premabati T., Hrahsel L., Lalrinfela P. and Thangjam R. (2013). Evaluation of genetic diversity among edible banana varieties found in mizoram, india using randomly amplified polymorphic DNA. *Journal of Plant Breeding and Genetics*, 1(3), 149-155.
- Quantitation and Purity of Nucleic Acids. (2008).  
[www.norgenbiotek.com/index.php?id=techdocs\\_002](http://www.norgenbiotek.com/index.php?id=techdocs_002).
- Ribeiro LO., Paiva LV., Pádua MS., Santos BR., Alves E. and Stein VC. (2012). Morphological and ultrastructural analysis of various types of banana callus, cv. Prata anã. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 34(4), 423-429.
- Robarts DW. and Wolfe AD. (2014). Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) markers: a potential resource for studies in plant molecular biology. *Applications in Plant Sciences*, 2(7). doi: 10.3732/apps.1400017.
- Rotchanapreeda T., Wongniam S., Swangpol SC., Chareonsap PP., Sukkaewmanee N. and Somana J. (2016). Development of SSR markers from *Musa balbisiana*. *Plant Systematics and Evolution*, 302(7), 739-761.
- Ruangstutapha S., Eimert K., Schröder MB., Silayoi B., Denduangboripant J. and Kanchanapoom K. (2007). Molecular phylogeny of banana cultivars from Thailand based on HAT-RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(7), 1565-1572. doi:10.1007/s10722-006-9169-2.
- Santos J., Teixeira M., Cares J., Faleiro F. and Costa D. (2010). Contrastant banana accessions for resistance to the burrowing nematode, based on molecular markers RAPD. *Euphytica*, 172(1), 13-20.
- Semsang N., Chundet R. and Phanchisri B. (2013). Development of a SCAR Marker for discrimination of a Thai jasmine rice. *American Journal of Plant Sciences*, 04(09), 1774-1783. doi:10.4236/ajps.2013.49218.
- Sheidai M., Aminpoor H., Noormohammadi Z. and Farahani F. (2008.). RAPD analysis of somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* L.) cultivar valery. *Acta Biologica Szegediensi*, 52(2), 307-311.
- Simsek O., Curuk P., Aslan F., Bayramoglu M., Izgu T., Da Silva JA., Kacar YA. and Mendi YY. (2016). Molecular characterization of *Cyclamen* species collected from different parts of Turkey by RAPD and SRAP markers. *Biochemical Genetics*, 55, 87-102. [http://dx.doi.org/ 10.1007/s10528-016-9770-9](http://dx.doi.org/10.1007/s10528-016-9770-9).
- Simmonds NW. and Shepherd K. (1954). The taxonomy and origins of the cultivated bananas.: *Banana Research Scheme, Imperial College of Tropical Agriculture, Trinidad, B.W.I.*, 55(359), 302-312 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1955.tb00015.x>.
- Singh WR., Singh SS. and Shrivastava K. (2014). Analysis of banana genome groups of wild and cultivated cultivars of Manipur, India using sScore card method. *Research Advances in Applied Science*, 5, 35-38.

- Swennen R., Vuylsteke D. and Ortiz R. (1995). Phenotypic diversity and patterns of variation in west and central African plantains (*Musa Spp.*, AAB group Musaceae). *Economic Botany*, 49(3), 320-327. doi:10.1007/bf02862352.
- Tinker NA., Fortin MG. and Mather DE, Theoret. (1993). Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Springer-Verlag*, 85(8), 976-984. doi:https://doi.org/10.1007/BF00215037.
- Valmayor RV., Jamaluddin SH., Silayoi B., Kusumo S., Danh LD., Pascua OC. and Espino RRC. (2000). Banana names and synonyms in South East Asia. International Network for the Improvement of Banana and Plantain-ASPNET.
- Votava EJ. (2000). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analyses of genetic diversity in Chile (*Capsicum spp.*). (Doctor of Philosophy A Dissertation submitted to the Graduate School in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy), New Mexico State University Las Cruces, New Mexico, Bell & Howell Information and Learning Company 300 North Zeeb Road P.O. Box 1346 Ann Arbor, MI 48106-1346. (9971253).
- Wang W., Hu Y., Sun D., Staehelin C., Xin D. and Xie J. (2012). Identification and evaluation of two diagnostic markers linked to *Fusarium* wilt resistance (race 4) in banana (*Musa spp.*). *Molecular biology reports*, 39(1), 451-459.
- Warburton M. and Crossa J. (2002). Data analysis in the CIMMYT applied biotechnology center for fingerprinting and genetic diversity studies. CIMMYT (Second edition). doi:http://repository.cimmyt.org/xmlui/handle/10883/3493.
- Wattanachaiyingcharoen D. (2008). Diversity of wild banana (*Musa acuminata* Colla) in the lower North of Thailand. (*Doctor of Philosophy in Biological Sciences*), Mae Fah Luang University, Thailand.
- Wilasini CC., Tangkittipong K. and Raweeewan M. (2011). Opportunity and value development for Thai bananas International Conference on Economics and Business Information IPEDR vol.9 (2011) © (2011) IACSIT Press, Bangkok, Thailand.
- Williams JGK., Kubelik AR., Livak KJ., Rafalski JA. and Tingey SV. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531-6535. doi:10.1093/nar/18.22.6531
- Wong C. (2001). Genetic diversity of the wild banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as evidenced by AFLP. *Annals of Botany*, 88(6), 1017-1025. doi:10.1006/anbo.2001.1542.
- Yuan X., He Y., Huang J., Hu W., Zhou H., Gao Q. and Zhou S. (2015). Development of a SCAR marker for rapid identification of New Kentucky Bluegrass Breeding Lines *Academicpres. AcademicPres*, 43(1), 79-85. doi:10.15835/nbha4319664.



## ภาคผนวก 1

Appendix 1.1 Certificate for publication

Appendix 1.2 Paper of summition (International Journal of Biosciences, volume12, number 4, p 172-180, April 2018)

