วารสารเกษตรนเรศวร
ISSN : 0859-3027
ISSN (Online) : 2730-356X

บทความวิจัย

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไข่โดยใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอพี (SRAP)

วรดา ช้างคำ[1] และ ฐนิตา บุญสร้างสม[1,2*]

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000
[2]สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000
*Corresponding author: thanitab@nu.ac.th
(Received December 30, 2020; Revised February 3, 2021; Accepted March 9, 2021)

บทคัดย่อ

กล้วยเป็นหนึ่งในผลไม้ที่บริโภคกันมากที่สุดในโลก โดยกล้วยไข่กำแพงเพชรและกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างมูลค่าสูงมากให้กับตลาดการส่งออก เนื่องจากมีรสชาติหวานและมีกลิ่นหอมเป็นเอกลักษณ์ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมในกล้วยสามารถเกิดขึ้นได้โดยการเปลี่ยนแปลงตามธรรมชาติหรือการคัดเลือกโดยมนุษย์ อีกทั้งสายพันธุ์กล้วยไข่ที่เพาะปลูกในประเทศไทยมีคะแนนจีโนมเท่ากันแต่แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กล้วยไข่จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไข่ต่างสายพันธุ์และในสายพันธุ์เดียวกันจำนวน 13 ตัวอย่าง ร่วมกับกล้วยหอม จำนวน 2 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอพี จำนวน 10 คู่ พบว่าไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 79 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึมจำนวน 61 แถบ (77.2 เปอร์เซ็นต์) และค่า PIC มีค่าอยู่ระหว่าง 0.16-0.38 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.25 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมีค่าระหว่าง 0.64-1.00 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.83 ในการศึกษานี้สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA และแบ่งกลุ่มกล้วยได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นประโยชน์ในการเก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรม การอนุรักษ์ และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม, กล้วยไข่, เอสอาร์เอพี, เครื่องหมายดีเอ็นเอ

NARESUAN AGRICULTURE JOURNAL
ISSN : 0859-3027
ISSN (Online) : 2730-356X

Research Article

Assessment of Genetic Diversity among 'Kluai Khai' Cultivars based on SRAP Markers

Wolada Changkham[1] and Thanita Boonsrangsom[1,2*]

[1]Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, 65000, Thailand
[2]Center of Excellence in Research for Agricultural Biotechnology, Naresuan University, 65000, Thailand
*Corresponding author: thanitab@nu.ac.th
(Received December 30, 2020; Revised February 3, 2021; Accepted March 9, 2021)

Abstract

Banana is one of the most widely consumed fruits in the world. 'Kluai Khai Kamphaeng Phet' and 'Kluai Khai Kasetsart 2' are two of the most important bananas for export because of their unique sweet and fragrant taste. However, due to genetic diversity in banana can be simply increase by natural variation or artificial selection and some of *Musa* (AA group) 'Kluai Khai' cultivars cultivated in Thailand have the same genome score but show different morphological characters, the genetic diversity among 'Kluai Khai' cultivars need to be classified using molecular markers. The aims of this study were to investigate DNA fingerprinting and assess genetic diversity among and within 13 *Musa* 'Kluai Khai' samples and two of 'Kluai Hom' cultivars using ten SRAP primer combinations. Out of 79 amplified bands, 61 amplified bands were polymorphic (77.2%) with an average 0.25 PIC value with a range from 0.16 to 0.38. An unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) analysis demonstrated that the 15 accessions had a similarity range from 0.64 to 1.00 with a mean of 0.83. In the present study, dendrogram derived from SRAP markers showed that all samples could be classified into two major groups. The information derived from this study could be useful for germplasm collection, conservation and banana breeding in the future.

Keywords: Genetic diversity, Kluai Khai, SRAP, DNA markers

บทนำ

กล้วยไข่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Musa* (AA group) 'Kluai Khai' เป็นไม้ล้มลุกอยู่ในวงศ์ Musaceae จัดเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในระดับท้องถิ่นและในระดับประเทศ สามารถปลูกได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย แต่คุณภาพอาจจะแตกต่างกันตามสภาพภูมิอากาศ ดิน และน้ำ (เบญจมาศ, 2558) กล้วยไข่ที่เกษตรกรนิยมปลูกในเชิงการค้า ได้แก่ กล้วยไข่กำแพงเพชร และกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 เนื่องจากมีรสชาติดี หอมหวาน เนื้อแน่น และมีเอกลักษณ์เฉพาะตัว จึงเป็นที่ต้องการของตลาดส่งออกเป็นอย่างมาก ส่งผลให้พื้นที่การปลูกกล้วยไข่ในปัจจุบันได้ขยายเพิ่มมากขึ้นตามความต้องการของผู้บริโภค โดยตลาดส่งออกกล้วยไข่ที่สำคัญ ได้แก่ จีน ฮ่องกง และเวียดนาม โดยในปี 2558 มีปริมาณการส่งออกกล้วยไข่ผลสดมากถึง 26,081,092 กิโลกรัม หรือคิดเป็นมูลค่ากว่า 284 ล้านบาท (อภิชาติ และ พัชรี, 2560) กล้วยกินได้กำเนิดมาจากกล้วยป่า 2 สปีชีส์ (Species) คือกล้วยป่า (*M. acuminata* Colla) และกล้วยตานี (*M. balbisiana* Colla) สามารถจำแนกกล้วยไข่และกล้วยชนิดต่าง ๆ ออกจากกันได้ด้วยลักษณะทางพันธุกรรมหรือรูปแบบของจีโนม โดยใช้วิธีการให้คะแนนจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกจำนวน 15 ลักษณะ เนื่องจากกล้วยไข่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีการส่งเสริมให้ปลูกเชิงการค้ามากขึ้น ทำให้มีการพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไข่อย่างต่อเนื่อง ทำให้กล้วยไข่มีหลากหลายสายพันธุ์ ความผันแปรทางพันธุกรรมของกล้วยไข่นั้นสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ส่งผลให้กล้วยไข่บางสายพันธุ์มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ใกล้เคียงกันมาก (เบญจมาศ, 2558) ตลอดจนสภาวะแวดล้อมมีอิทธิพลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไข่ การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการระบุสายพันธุ์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไข่สายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งผลการตรวจสอบจะมีความรวดเร็วและแม่นยำโดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายชีวโมเลกุลโดยวิธีพีซีอาร์หลายชนิดเข้ามาช่วยในการจำแนกสายพันธุ์พืช หนึ่งในหลายเครื่องหมายที่ได้รับความนิยม ได้แก่ เครื่องหมายเอสอาร์เอพี (SRAP, Sequence-related amplified polymorphism) ซึ่งถูกคิดค้นและพัฒนาโดย Li and Quiros (2001) โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ open reading frame (ORFs) ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์ส่วนหน้า (forward primer) ที่มีขนาด 17 เบส บริเวณที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์เป็นลำดับเบสที่ไม่มีความจำเพาะเรียกว่าลำดับเบสส่วนเติม (filler sequence) ถัดมาเป็นเบส CCGG (core sequence) เพื่อจำเพาะกับลำดับเบสบริเวณ exon ที่ปลาย 3' มีเบสคัดเลือกอีก 3 เบส (selective base) และไพรเมอร์ส่วนหลัง (reverse primer) ที่มีขนาด 18 เบส ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า filler sequence ที่ปลาย 5' ถัดมาเป็นเบส AATT (core sequence) เพื่อจำเพาะกับลำดับเบสบริเวณ intron ที่ปลาย 3' มีเบสคัดเลือกอีก 3 เบส (selective base) ข้อดีของเครื่องหมายชนิดนี้คือ มีความสามารถในการทำซ้ำ (reproducible) สูง ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน ทำได้ง่ายและรวดเร็ว (สุรินทร์, 2552) จึงมีการนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิด เช่น ถั่วอัลฟาฟ่า (Talebi et al., 2011), ส้มซ่า (*Citrus aurantium*) (Polat et al., 2012), กาแฟ (Mishra et al., 2014) และถั่ว (*Pisum sativum* L.) (Guindon et al., 2016) เป็นต้น ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไข่ต่างสายพันธุ์และในสายพันธุ์เดียวกัน ร่วมกับกล้วยหอมที่ปลูกในเขตพื้นที่จังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดกำแพงเพชร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสอาร์เอพี ข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไข่จะเป็นประโยชน์ต่อการการคุ้มครองพันธุ์ การอนุรักษ์ และพัฒนาสายพันธุ์ของกล้วยไข่ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บรวบรวมและการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนกล้วย

เก็บตัวอย่างกล้วยไข่สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 13 ตัวอย่าง ประกอบด้วยจีโนม 3 แบบ ได้แก่ (1) กล้วยไข่ที่มีจีโนมแบบ AA จำนวน 10 ตัวอย่าง ประกอบด้วยกล้วยไข่กำแพงเพชร จำนวน 4 ตัวอย่าง (โดยเก็บรวบรวมจากแหล่งปลูก 4 แหล่ง คือ ตำบลงิ้วงาม อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก, อำเภอลานกระบือ, อำเภอเมืองกำแพงเพชร และ อำเภอพรานกระต่าย จังหวัดกำแพงเพชร) กล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2, กล้วยไข่ทองเงย, กล้วยไข่จีน, กล้วยไข่โนนสูง, กล้วยไข่วิเชต 35 และกล้วยไข่ทองร่วง (2) กล้วยไข่ที่มีจีโนมแบบ AAA จำนวน 1 ตัวอย่าง คือ กล้วยไข่พระตะบอง และ (3) กล้วยไข่ที่มีจีโนมแบบ AAB จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ กล้วยไข่ชุมแพ และกล้วยไข่ศรีสะเกษ และกล้วยหอมซึ่งใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) จำนวน 2 ตัวอย่าง (กล้วยหอมอีสาน และกล้วยหอมจำปา) (Table 1) เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วย โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป BioFACT^{TM} Genomic DNA Prep Kit for Plant (BIOFACT Co., Ltd., Korea) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างกล้วยด้วยเครื่องหมาย SRAP

นำสารละลายจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ SRAP (Li and Quiros, 2001) โดยเทคนิคพีซีอาร์ในปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม, 2X MyTaq^{TM} HS Mix (Bioline, US) และไพรเมอร์ SRAP (ไพรเมอร์ส่วนหน้าและไพรเมอร์ส่วนหลัง) ความเข้มข้นอย่างละ 20 µM ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ และเปรียบเทียบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์กับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TAE โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ประมาณ 25-30 นาที ย้อมเจลด้วย Safe DNA Dye (Hydragreen^{TM}, USA) จากนั้นนำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

การวิเคราะห์ผลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมาย SRAP

นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ SRAP จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้และบันทึกผลเป็นสัญลักษณ์ "1" เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ "0" เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ คำนวณค่าดัชนีความเหมือนด้วยวิธี Dice coefficients และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป FreeTree ร่วมกับโปรแกรม TreeView (Hampl et al., 2001) วิเคราะห์ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มด้วยค่า bootstrap ซึ่งทำซ้ำจำนวน 1,000 ครั้ง คำนวณหาร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม (percentage of polymorphism) และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อไพรเมอร์ (Average of polymorphic and monomorphic bands) และหาค่า Polymorphic Information Contents (PICs) จากสูตร PICs $= 1 - \sum p_i^2$ เมื่อ เมื่อ Pi คือ ความถี่ของอัลลีล i ในประชากรที่ศึกษา

Table 1 List of *Musa* samples, place of collection and genome group used in this study.

No.	Cultivar Name	Place of collection*	Genome group
1	*Musa* (AAA/AA group) 'Kluai Hom Champa'	PS	AAA/AA
2	*Musa* (AAA/AA group) 'Kluai Hom Eisan'	PS	AAA/AA
3	*Musa* (AAA group) 'Kluai Khai Phra Tabong'	PS	AAA
4	*Musa* (AA group) 'Kluai Khai Thong Ngoei'	PS	AA
5	*Musa* (AA group) 'Kluai Khai Kasetsart 2'	PS	AA
6	*Musa* (AA group) 'Kluai Khai Chin'	PS	AA
7	*Musa* (AAB group) 'Kluai Khai Si Sa Ket'	PS	AAB
8	*Musa* (AA group) 'Kluai Khai Non Sung'	PS	AA
9	*Musa* (AA group) 'Kluai Khai Thong Ruang'	PS	AA
10	*Musa* (AAB group) 'Kluai Khai Chum Phae'	PS	AAB
11	*Musa* (AA group) 'Kluai Khai Kamphaeng Phet' 1	PS	AA
12	*Musa* (AA group) 'Kluai Khai Kamphaeng Phet' 2	KP1	AA
13	*Musa* (AA group) 'Kluai Khai Kamphaeng Phet' 3	KP2	AA
14	*Musa* (AA group) 'Kluai Khai Kamphaeng Phet' 4	KP3	AA
15	*Musa* (AA group) 'Kluai Khai Wi Chet 35'	LP	AA

*Place of collection: PS – Plant Propagation Center No. 6, Mueang Phitsanulok District, Phitsanulok Province, KP1 – Lan Krabue District, Kamphaeng Phet Province, KP2 – Mueang Kamphaeng District, Kamphaeng Phet Province, KP3 - Phran Kratai District, Kamphaeng Phet Province, LP – Wi Chet Nakhon Subdistrict, Chae Hom District, Lampang Province

ผลและวิจารณ์

จากการทดสอบไพรเมอร์ SRAP จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของกล้วยไข่และกล้วยหอมสายพันธุ์ต่าง ๆ รวม 15 ตัวอย่าง พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 10 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอรวม 79 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึมจำนวน 61 แถบ ไพรเมอร์แต่ละคู่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 7.9 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ย 6.1 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ ไพรเมอร์ Me6/Em3 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้มากที่สุด 9 แถบ มีขนาดประมาณ 100-900 คู่เบส และไพรเมอร์ Me4/Em7 และ Me6/Em4 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด จำนวน 7 แถบ มีขนาดประมาณ 150-550 คู่เบส และ 100-500 คู่เบส ตามลำดับ (Table 2 และ Figure 1) จากการคำนวณค่า PIC ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงโอกาสที่จะพบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่สุ่มมา 2 ตัวอย่าง พบว่าค่า PIC มีค่าอยู่ระหว่าง 0.16-0.38 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.25 แสดงว่าไพรเมอร์มีความสามารถในการจำแนกตัวอย่างได้ในระดับต่ำ (PIC<0.25) ถึงปานกลาง (0.25<PIC<0.50) (Soleimani et al., 2012)

Table 2 Characteristics of ten SRAP markers among 15 *Musa* samples.

No.	Primer combination	Allele size range (bp)	Amplified bands			PIC value
			Total bands	Polymorphic bands	Polymorphism (%)	
1	Me1/Em8	100 - 800	8	8	100	0.38
2	Me2/Em1	150 - 600	8	6	75.0	0.30
3	Me4/Em7	150 - 550	7	4	51.1	0.16
4	Me5/Em3	100 - 600	8	7	87.5	0.25
5	Me5/Em8	100 - 900	8	8	100	0.20
6	Me6/Em3	100 - 900	9	8	88.9	0.26
7	Me6/Em4	100 - 500	7	4	57.1	0.22
8	Me6/Em5	100 - 900	8	5	62.5	0.26
9	Me7/Em1	100 - 800	8	7	87.5	0.28
10	Me7/Em2	150 - 900	8	4	50.0	0.18
	Total		79	61	-	2.48
	Mean		7.9	6.1	-	0.25

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างกล้วยไข่และกล้วยหอมสายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.64 ถึง 1.00 (Table 3) และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.83 โดยกล้วยไข่พระตระบอง (จีโนม AAA) และกล้วยไข่ชุมแพ (จีโนม AAB) มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกันน้อยที่สุด (0.64) ขณะที่กล้วยไข่กำแพงเพชร (จีโนม AA) ทั้ง 4 ตัวอย่างมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่าง 0.94-1.00 (เฉลี่ย 0.97) ตัวอย่างที่เหมือนกันมากที่สุด คือ กล้วยไข่กำแพงเพชร 1 และ 2 ที่เก็บรวบรวมจาก อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก และ อำเภอลานกระบือ จังหวัดกำแพงเพชร นอกจากนี้ยังพบว่ากล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 และกล้วยไข่วิเชต 35 ซึ่งกลายพันธุ์มาจากกล้วยไข่กำแพงเพชรมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากกับกล้วยไข่กำแพงเพชรอยู่ในช่วง 0.89-0.92 และ 0.92-0.98 ตามลำดับ

จากนั้นนำค่าที่ได้มาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA (Figure 2) พบว่าสามารถจัดกลุ่มแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในรูปแบบของ phylogenetic tree โดยแบ่งตัวอย่างกล้วยที่ใช้ในการศึกษาออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ I ประกอบด้วยกล้วยไข่ชุมแพ (จีโนม AAB) เพียงตัวอย่างเดียว ส่วนกลุ่มที่ II สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อยคือ กลุ่ม II-A ประกอบด้วยกล้วยไข่จีโนม AA จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ กล้วยไข่กำแพงเพชรทั้ง 4 ตัวอย่าง, กล้วยไข่วิเชต 35, และกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 กลุ่ม II-B ประกอบด้วยกล้วยไข่จีโนม AA-AAB จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ กล้วยไข่จีน, กล้วยไข่ศรีสะเกษ และกล้วยไข่โนนสูง กลุ่มที่ II-C ประกอบด้วยกล้วยไข่จีโนม AA-AAA จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ กล้วยไข่พระตระบอง, กล้วยไข่ทองเงย และกล้วยไข่ทองร่วง และกลุ่ม II-D ประกอบด้วยกล้วยหอมจีโนม AAA/AA จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ กล้วยหอมจำปา และกล้วยหอมอีสาน

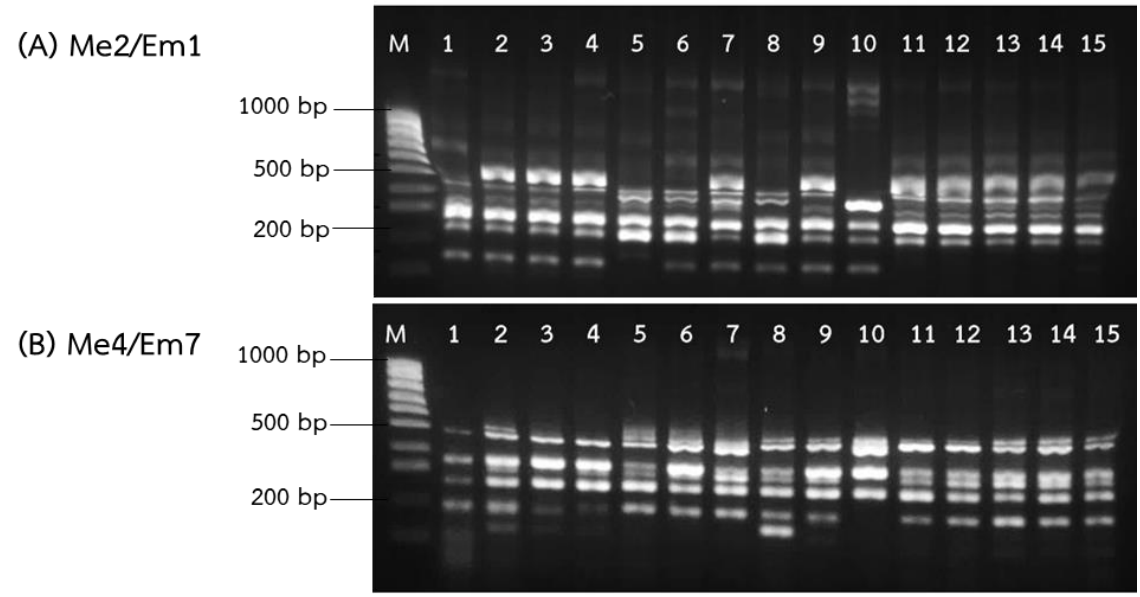


Figure 1 DNA fingerprinting of 15 *Musa* samples generated by SRAP markers: (A) Me2/Em1 and (B) Me4/Em7 primer combinations. Lane M is 100 bp DNA ladder (HyperLadder™ 100 bp, Bioline) and lane 1-15 is *Musa* samples used in this study.

Table 3 Similarity coefficient matrix based on ten SRAP markers.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1.000														
2	0.869	1.000													
3	0.867	0.869	1.000												
4	0.876	0.837	0.899	1.000											
5	0.816	0.822	0.776	0.804	1.000										
6	0.747	0.815	0.788	0.776	0.897	1.000									
7	0.808	0.833	0.788	0.796	0.897	0.889	1.000								
8	0.796	0.784	0.774	0.804	0.891	0.882	0.902	1.000							
9	0.857	0.879	0.898	0.907	0.849	0.860	0.860	0.871	1.000						
10	0.689	0.727	0.644	0.674	0.714	0.727	0.768	0.731	0.735	1.000					
11	0.787	0.776	0.787	0.840	0.887	0.878	0.857	0.870	0.845	0.697	1.000				
12	0.787	0.776	0.787	0.840	0.887	0.878	0.857	0.870	0.845	0.697	1.000	1.000			
13	0.826	0.812	0.782	0.791	0.920	0.851	0.891	0.863	0.820	0.696	0.945	0.945	1.000		
14	0.835	0.800	0.769	0.800	0.909	0.840	0.880	0.872	0.828	0.703	0.956	0.956	0.989	1.000	
15	0.800	0.788	0.756	0.764	0.898	0.828	0.869	0.839	0.796	0.667	0.921	0.921	0.978	0.967	1.000

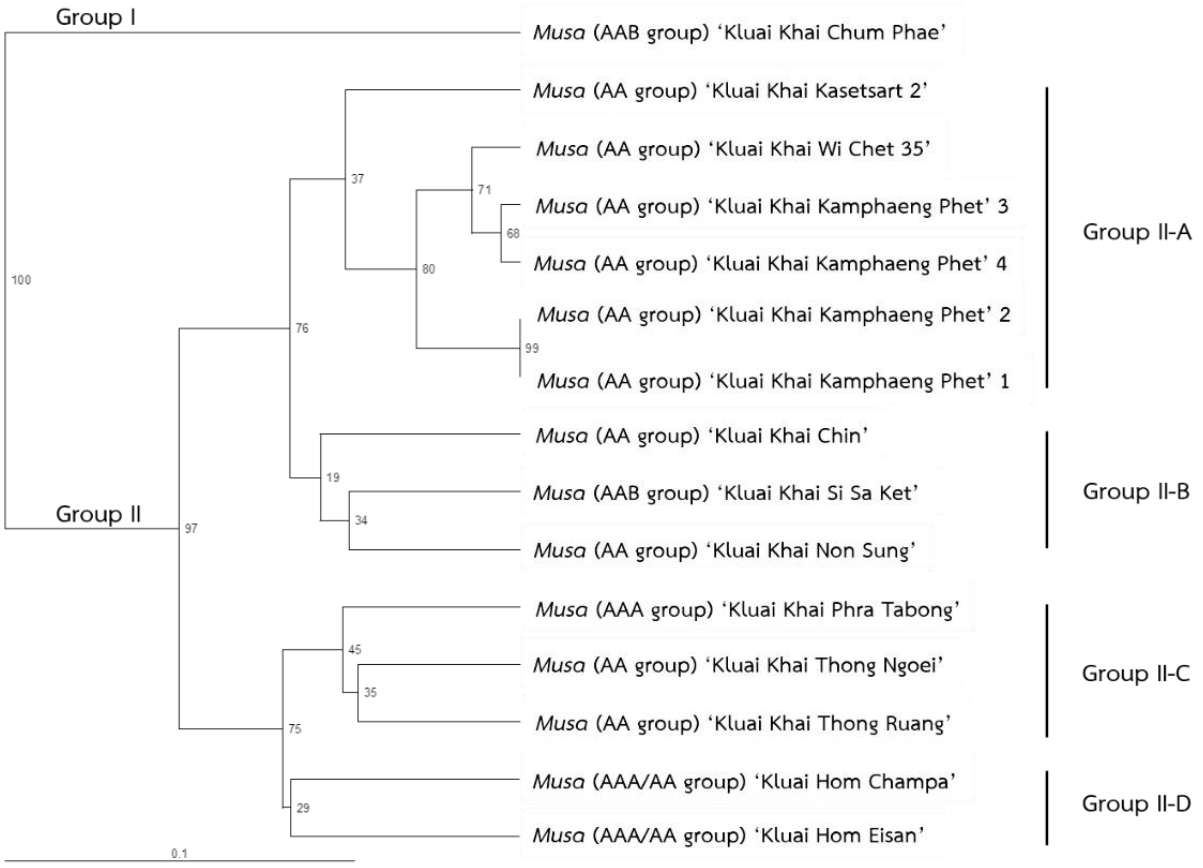


Figure 2 An UPGMA dendrogram of genetic relationships among 15 *Musa* samples based on SRAP data, Numerical values in the nodes represent bootstrap values.

ในการศึกษาครั้งนี้แม้ใช้เครื่องหมายเพียง 10 คู่ไพรเมอร์เท่านั้น แต่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายเอสอาร์เอพีในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกความแตกต่างของกล้วยไข่แต่ละสายพันธุ์ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของจิรพันธ์ (2546) ที่ได้ทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไข่พันธุ์กลาย (ก.บ.1 ก.บ.2 ก.บ.3 ก.บ.4 และ ก.บ.5) และจำแนกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ออกจากกันได้อย่างชัดเจนด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี และ Youssef et al. (2016) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยและระบุเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับจีโนม B โดยใช้ไพรเมอร์เอสอาร์เอพีเพียง 5 เครื่องหมายเท่านั้น เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยทั้ง 15 ตัวอย่าง พบว่ากล้วยไข่ชุมแพมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยพันธุ์อื่น ๆ น้อยที่สุด การจัดกลุ่มกล้วยไข่วิเชต 35 และกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 ให้อยู่กลุ่มเดียวกันกับกลุ่มตัวอย่างกล้วยไข่กำแพงเพชรที่รวบรวมมาจากแหล่งปลูกที่ต่างกันนั้น อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากกล้วยไข่ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีที่มาหรือกลายพันธุ์มาจากพันธุ์ดั้งเดิม (กำแพงเพชร) ทำให้มีความความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง แต่เมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกของกล้วยไข่ในกลุ่มนี้ พบว่ามีลักษณะหลายประการที่แตกต่างกัน โดยกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 เป็นพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 20 เกรย์ ทำให้ผลกล้วยไข่ที่ได้มีลักษณะของผลสั้นลง ผลป้อม ปลายทู่กว่าพันธุ์เดิม (เบญจมาศ, 2558) ส่วนกล้วยไข่วิเชต 35 เป็นกล้วยไข่ที่กลายพันธุ์มาจากพันธุ์กำแพงเพชร เมื่อนำไปขยายพันธุ์ในพื้นที่มีสภาพแวดล้อมไม่เหมือนเดิมทำให้มีลักษณะเครือใหญ่ ปลายผลมน ผลใหญ่ น้ำหนักมาก (อภิชาติ และพัชรี, 2560) กล้วยบาง

ชนิดมีชื่อที่พ้องกันหลายชื่อ เช่น กล้วยไข่พระตะบอง มีชื่อเรียกหลายชื่อ ได้แก่ ไข่บอง เจ๊กบอง (เขมร) ไข่โนนสูง ไข่น้ำ ไข่ควาย ทองเบา หอมแขก กล้วยหอมเบา (เบญจมาศ, 2558) แต่ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่ากล้วยไข่พระตะบองและกล้วยไข่โนนสูงอาจเป็นคนละสายพันธุ์กัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.77 ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากจำนวนชุดของจีโนมที่ต่างกันทำให้ถูกจัดอยู่คนละกลุ่ม โดยกล้วยไข่พระตะบองมีโครโมโซม 3 ชุด (AAA) และกล้วยไข่โนนสูงมีมีโครโมโซมเพียง 2 ชุด (AA) หรืออาจเกิดความสับสนของชื่อพันธุ์ในระหว่างการเตรียมแปลงปลูก ในการศึกษานี้ยังไม่สามารถแยกกล้วยไข่ศรีสะเกษ ที่มีจีโนม AAB ออกจากกล้วยจีโนม AA และ AAA ได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Phothipan et al. (2005) ที่ตรวจสอบความสัมพันธ์ของพันธุ์กล้วยจีโนม AA AAB และ BB โดยเทคนิคเอสอาร์เอพี พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มกล้วยที่ใช้ในการศึกษาได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม BB กับกลุ่ม AA-AAB เท่านั้น แต่ยังไม่สามารถจำแนกกล้วยลูกผสม AA และ AAB ออกจากกันได้ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างกล้วยออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ แต่การแบ่งกลุ่มไม่สอดคล้องกับจีโนมกล้วยเช่นเดียวกัน (กิตติศักดิ์ และคณะ, 2560) อย่างไรก็ตาม มีเครื่องหมายดีเอ็นเอหลายชนิดที่นำมาใช้จำแนกกล้วยไทยและให้ผลการจัดกลุ่มสอดคล้องกับจีโนมกล้วยและลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี (ฐิติพร และคณะ, 2556) อาร์เอพีดี (กัลยาณี และคณะ, 2557) และสก็อต (พรประภา และคณะ, 2560) เป็นต้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นประโยชน์ในการเก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรม การอนุรักษ์ และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยต่อไปในอนาคต

สรุป

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไข่ต่างสายพันธุ์และในสายพันธุ์เดียวกันโดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุลชนิดเอสอาร์เอพีจำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มกล้วยไข่และกล้วยหอมที่ใช้ในการศึกษาออกจากกันได้ จากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 79 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึมจำนวน 61 แถบ (77.2%) ไพรเมอร์แต่ละคู่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 7.9 แถบต่อไพรเมอร์ ค่า PIC มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.25 เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยโปรแกรม FreeTree ร่วมกับโปรแกรม TreeView พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.64 ถึง 1.00 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.83 สามารถแบ่งกล้วยที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกล้วยไข่ชุมแพเพียงตัวอย่างเดียว (จีโนมแบบ AAB) ส่วนกลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อย (แต่ละกลุ่มย่อยมีจีโนมแบบ AA, AA-AAB, AA-AAA และ AA/AAA)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2561 เลขที่โครงการ R2561B067 ตัวอย่างกล้วยที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 6 (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ) ตำบลงิ้วงาม อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี สุวิทวัส, นงลักษณ์ เทียนเสรี, ภาสันต์ ศารทูลทัต, พินิจ กรินทร์ธัญญกิจ และ พิมพ์นิภา เพ็งช่าง. (2557). การจำแนกกล้วยน้ำว้าโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. *แก่นเกษตร, 42*, 186-191.

กิตติศักดิ์ เฉนียง, ชลิตา ชูคันหอม และ ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร. (2560). การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยจากลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์. *การประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 3 ประจำปี พ.ศ. 2560* (น. 687-692). พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.

จิรพันธ์ ศรีทองกุล. (2546). *ลักษณะผลผลิตและลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกล้วยไข่พันธุ์กลาย* (วิทยานิพนธ์ปริญญาโท), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ประเทศไทย.

ฐิติพร โท้มโสภา, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์. (2556). การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวซาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี. *การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 18 ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ สุขุมวิท* (น. 201-205). กรุงเทพมหานคร.

เบญจมาศ ศิลาย้อย. (2558). *กล้วย พิมพ์ครั้งที่ 4*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 512 หน้า.

พรประภา ศิริเทพทวี, ฐิตาพร มณีเนตร, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์. (2560). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยด้วยเครื่องหมายสก็อต. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี,* 6, 271-278.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). *เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 269 หน้า.

อภิชาติ ศรีสอาด และ พัชรี สำโรงเย็น. (2560). *กล้วยไข่ยุคใหม่ทำเงิน 5 ภาค. พิมพ์ครั้งที่ 1*. กรุงเทพฯ: นาคาอินเตอร์มีเดีย. 148 หน้า.

Guindon, M.F., Martin, E., Zayas, A., Cointry, E., & Cravero, V. (2016). Evaluation of SRAP markers for mapping of *Pisum sativum* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology,* 16(3), 182-188.

Hampl, V., Pavlícek, A. & Flegr, J. (2001). Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 51(3), 731-735.

Li, G. & Quiros, C.F. (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*. *Theoretical and Applied Genetics,* 103, 455-461.

Mishra, M., Nishani, S., Gowda, M., Padmajyothi, D., Suresh, N., Sreenath, H., & Raghuramulu, Y. (2014). Genetic diversity among Ethiopian coffee (*Coffea arabica* L.) collections available In Indian gene bank using sequence related amplified polymorphism markers. *Plant Breeding Seed Science,* 70(1), 29-40.

Polat, I., Kacar, Y.A, Yesiloglu, T., Uzun, A., Tuzcu, O., Gulsen, O., Incesu, M., Kafa, G., Turgutoglu, E., & Anil, S. (2012). Molecular characterization of sour orange (*Citrus aurantium*)

accessions and their relatives using SSR and SRAP markers. *Genetics and molecular research*, 11(3), 3267-3276.

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: Natural Science,* 39, 703-710.

Soleimani, M., Talebi, M. & Sayed-Tabatabaei, B. E. (2012). Use of SRAP markers to assess genetic diversity and population structure of wild, cultivated, and ornamental pomegranates (*Punica granatum* L.) in different regions of Iran. *Plant Systematics and Evolution,* 298, 1141-1149.

Talebi, M., Hajiahmadi, Z. & Rahimmalek, M. (2011). Genetic diversity and population structure of four Iranian alfalfa populations revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology,* 14, 173-178.

Youssef, M. & Escobedo-GraciaMedrano, R.M. (2016). Genetic relationship among *Musa balbisiana* accessions and identification of SRAP markers linked to *Musa* B genome. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology,* 7(2), 39-47.