

การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อบ่งชี้จีโนมกล้วย A_1 และ A_2 DNA marker for A_1 and A_2 *Musa* genome identification

จันทร์แรม รุปข้า^{1,2} เบญจมาศ ศิลาโยย³ ศาวิตร ตระกุลน้าเลื่อมใส⁴ และ
สมศักดิ์ อภิสิตวานิช^{1,2,5,6,*}

Chanram Roopkham^{1,2}, Benchamas Silayoi³, Savitr Trakulnaleamsai⁴ and
Somsak Apisitwanich^{1,2,5,6,*}

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

³ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

⁴ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

⁵ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

⁶ ศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹ Center for Argicultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakon Pathom, 73140, Thailand

² Center of Excellence on Agriculture Biotechnology: (AG-BIO/PERDC-CHE), Bangkok 10900, Thailand

³ Department of Horticulture, Faculty of Argiculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

⁴ Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

⁵ Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

⁶ Center for Advanced Studies in Tropical Natural Resources, National Research University, Kasetsart University, Bangkok 10900

* Corresponding author: fscissa@ku.ac.th

บทคัดย่อ

บรรพบุรุษของกล้วยปลุกหลายชนิดที่ขึ้นอยู่ในประเทศไทยเกิดจากกล้วยป่าสองชนิดคือ *Musa acuminata* Colla และ *Musa balbisiana* Colla การจัดชนิดของจีโนมกล้วยแบ่งได้ 4 ชนิด คือจีโนม A, B, S และ T การจำแนกจีโนมกล้วยได้นำวิธีการใหม่และมีประสิทธิภาพอย่าง suppression subtractive hybridization (SSH) มาใช้ในการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอในกล้วยปลุกหรือกล้วยกินได้ จากการศึกษาพบไพรเมอร์ 4 คู่ ได้แก่ SSH14, SSH21, SSH23 และ

SSH255 ที่จำเพาะต่อจีโนม A_1 โดยให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอ 250, 228, 572 และ 376 คู่เบส ตามลำดับ และไพรเมอร์อีก 4 คู่ ได้แก่ SSH20, SSH26, SSH66 และ SSH214 ที่จำเพาะต่อจีโนม A_2 โดยให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอ 540, 473, 393 และ 534 คู่เบส ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ SSH10 ที่ให้แถบดีเอ็นเอในจีโนม A และ B ขนาด 433 และ 700 คู่เบส ตามลำดับ จากผลที่ได้นี้แสดงว่าเทคนิค SSH เป็นเทคนิคที่สามารถใช้บ่งชี้สิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกันได้เป็นอย่างดี

ABSTRACT

Musa acuminata Colla and *Musa balbisiana* Colla are expected to be ancestors of cultivated bananas which are highly variable throughout Thailand. Four genome types of *Musa* are reported as A, B, S and T. A new and highly effective method, suppression subtractive hybridization (SSH), has been introduced to develop markers for edible banana genome identification. Four primer pairs, SSH14, SSH21, SSH23 and SSH255, are specific to A₁ genome with the size of 250, 228, 572 and 376 bp, respectively, 4 primer pairs, SSH20, SSH26, SSH66 and SSH214, are specific to A₂ genome with the size of 540, 473, 393 and 534 bp, respectively. Moreover, one primer pair, SSH10, could identify the common A and B genomes with the size of 433 and 700 bp, respectively. This proved that SSH is an effective technique for identification of closely related organism.

คำสำคัญ: กล้วย *Musa* เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSH

Keywords: banana, *Musa*, DNA marker, SSH

บทนำ

กล้วยเป็นพืชที่ขึ้นในเขตร้อนชื้นแนวเส้นศูนย์สูตร แถบอเมริกากลาง อเมริกาใต้ แอฟริกา และเอเชีย โดยเฉพาะเอเชียตอนใต้รวมถึงประเทศไทย จัดเป็นแหล่งกำเนิดกล้วยด้วย (เบญจมาศ, 2545) กล้วยที่มีคุณภาพและรสชาติเป็นที่ต้องการของตลาดแถบยุโรป จะเป็นกล้วยหอมกลุ่มคาเวนดิช ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยจัดอยู่ในอันดับ Zingiberales ในอันดับนี้ทั้งหมดต้องการอากาศร้อนชื้น มีลำต้นใต้ดินที่เรียกว่าเหง้า (rhizome) กล้วยจัดเป็นหนึ่งใน 8 วงศ์ ของ Musaceae ประกอบด้วย 2 สกุล สกุลแรกคือ *Ensete* ประกอบด้วย 2 ชนิดย่อย คือ กล้วยผา (*E. superba*) และกล้วยนวล (*E. glauca*)

สกุลที่สองคือ *Musa* แบ่งได้อีก 5 กลุ่ม (section) คือ Australimusa, Callimusa, Eumusa, Rhodochlamys และ Ingentimusa ซึ่ง Eumusa เป็นกลุ่มใหญ่ที่สุด เกิดจากการผสมข้ามของกล้วยป่าสองชนิดหรือชนิดย่อย คือ *M. acuminata* และ *M. balbisiana* (Simmonds and Shepherd, 1955) จนได้ลักษณะที่ดีและมนุษย์ได้คัดเลือกมาปลูก กล้วยมีจีโนม 4 ชนิดคือ A, B, S และ T ซึ่งจีโนม A, B และ S อยู่ในกลุ่ม Eumusa (Cheesman, 1948) กล้วยจีโนม A มีรสชาติหวานหอม เช่น กล้วยหอม กล้วยไข่ ส่วนกล้วยน้ำว่าเป็นลูกผสมมีจีโนม B อยู่มากจึงมีแป้งมากกว่ากล้วยหอม และกล้วยไข่ การจัดจำแนกกล้วยกินได้นั้น ใช้การให้คะแนนตามหลักการของ Simmonds and Shepherd (1955) โดยการให้คะแนนจาก 15 ลักษณะและจัดกลุ่มจีโนมได้เป็น AA, AAA, AAB, ABB และ ABBB ต่อมาได้มีการเพิ่มกลุ่มของ BBB

กล้วยเป็นพืชเศรษฐกิจ งานวิจัยเกี่ยวกับกล้วยจึงมีทั้งงานด้านเซลล์พันธุศาสตร์และพันธุศาสตร์โมเลกุล แต่ละจีโนมถูกกำหนดโดยชุดของโครโมโซมที่เป็นแฮพลอยด์ (Lincoln *et al.*, 1982) ในการบอกความแตกต่างระหว่างจีโนมในสกุล *Musa* มีหลากหลายวิธี ทั้งทางตรงและทางอ้อม Osuji *et al.* (1997) จำแนกกล้วยจีโนม A และ B ต่อมา D' Hont *et al.* (2000) ได้จำแนกกล้วยจีโนม A, B, S และ T ซึ่งงานวิจัยทั้งสองใช้วิธี genomic *in situ* hybridization (GISH) แยกความแตกต่างของโครโมโซม ในประเทศไทยมีการตรวจสอบดีเอ็นเอกล้วยโดยใช้วิธี suppression subtractive hybridization (SSH) ร่วมกับเทคนิค genomic *in situ* hybridization (GISH) ในกล้วยป่าแพร่และกล้วยป่าพัทลุง ทำให้ทราบว่ากล้วยป่าแพร่มีจีโนมเป็น A₁A₁ (*Musa acuminata* ssp. *burmanica*) และกล้วยป่าพัทลุงมีจีโนมเป็น A₂A₂ (*Musa acuminata* ssp. *malaccensis*) (อัญมณี, 2544)

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากเทคนิค SSH ทำโดยการนำดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตสองชนิดที่มีความแตกต่างกัน กำหนดให้ดีเอ็นเอชนิดที่ต้องการหาความแตกต่างเป็น tester ส่วนดีเอ็นเออีกชนิดหนึ่ง

เป็น driver เป็นตัวใช้ดึงส่วนที่เหมือนกันให้แยกออก โดยการไฮบริดส์ ดีเอ็นเอส่วนที่ต่างนี้จะนำไปวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อออกแบบไพรเมอร์ และใช้ ตรวจสอบกับสิ่งมีชีวิตนั้น (Diatchenko *et al.*, 1996) SSH เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และสามารถใช้หาความหลากหลายทางชีวภาพได้ สามารถใช้ดีเอ็นเอตัวอย่าง ในรูปของ cDNA หรือ genomic DNA ก็ได้ เช่น การแยกเชื้อ *Mycoplasma agalactiae* และ *Mycoplasma bovis* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งเชื้อทั้งสองแยกออกจากกันได้ยาก แต่สามารถแยกโดยเทคนิคนี้ได้ (Marenda *et al.*, 2005) นอกจากนี้มีการนำเทคนิค SSH มาใช้ร่วมกับ DNA microarray ในการศึกษา พอลิมอร์ฟิซึมของ genomic DNA โดยใช้โพรบ genomic DNA ชนิดที่มีความแตกต่างกันทำไฮบริดส์กัน เพื่อหาชิ้นส่วนที่มีความจำเพาะในชนิดใดชนิดหนึ่ง เท่านั้น ตัวอย่างเช่น การนำข้อมูลพอลิมอร์ฟิซึมของ กล้วยไม้สกุลหวาย 6 ชนิด ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน มาสร้างเดนโดแกรมที่สามารถแยกความแตกต่าง และแสดงความสัมพันธ์ได้ (Li *et al.*, 2006)

การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับบ่งชี้จีโนม A_1 และ A_2 ของกล้วยและสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วย จีโนม A ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ของนักปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีจีโนมตามต้องการ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อจีโนม สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกลูกผสม ทำให้ประหยัดเวลาในการคัดเลือกพันธุ์ เพราะต้นกล้วยในจีโนม A มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก การที่จะระบุว่าเป็นกล้วยชนิดใดนั้น บางครั้ง ต้องดูลักษณะผลจึงบอกได้ งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เทคนิค SSH ในการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอ

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอกล้วย

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบอ่อนกล้วย ที่รวบรวมจากสถานีวิจัยพืชสวนปากช่องจำนวน 20 ตัวอย่าง

ได้แก่ กล้วยป่าแพร์ (A_1A_1) กล้วยหอมจำปาหรือ กล้วยป่าพัตลุง (A_2A_2) กล้วยไข่เกษตรศาสตร์ กบ.2 (A_1A_2) กล้วยไข่กำแพงเพชร (A_1A_2) กล้วยสา (A_1A_2) กล้วยหอมจันทร์ (A_1A_2) กล้วยป่าระยอง M3 (AA) กล้วยป่าระยอง M10 (AA) กล้วยหอมทอง ($A_1A_2A_2$) 1 กล้วยหอมแกรนด์เนน ($A_1A_2A_2$) กล้วยน้ำว่าปากช่อง 50 (A_2BB) กล้วยน้ำว่าค่อม (A_2BB) กล้วยน้ำว่าเงิน (A_2BB) กล้วยน้ำว่าใส่เหลือง (A_2BB) กล้วยร้อยหวี (A_1A_2B) กล้วย (A_1A_2B) กล้วยงาช้าง (A_1A_2B) กล้วย ตานิดำ (BB) กล้วยตานีใต้ (BB) และ กล้วยตานีอีสาน (BB) ด้วยวิธีประยุกต์จาก Agrawal *et al.* (1992) แล้ว ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ หลังจากนั้นตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค suppression subtractive hybridization (SSH)

นำดีเอ็นเอของกล้วยป่าแพร์และกล้วยหอม จำปามาเจือจางให้มีความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อ ไมโครลิตร มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตรวจสอบ การตัดของเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอ ของกล้วยป่าแพร์ (tester) มาเชื่อมต่อกับ *MseI* adapter โดยใช้เอนไซม์ *T*, DNA ligase และทำปฏิกิริยาฟิชอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณ จากนั้นตรวจสอบปฏิกิริยาฟิชอาร์ โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ส่วนดีเอ็นเอ ของกล้วยหอมจำปา (driver) ที่ตัดด้วยเอนไซม์แล้ว นำมาติดฉลากด้วยวิธี random prime labeling ตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล หลังจากนั้นละลายตะกอน ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วย้ายใส่ น้ำแข็งทันที เติมน้ำละลาย 10X hexanucleotide primer 2 ไมโครลิตร dATP (0.33 มิลลิโมลลาร์) 2 ไมโครลิตร dCTP (0.33 มิลลิโมลลาร์) 2 ไมโครลิตร

dGTP (0.33 มิลลิโมลลาร์) 2 ไมโครลิตร dTTP (1 มิลลิโมลลาร์) 0.8 ไมโครลิตร Biotin-16 dUTP 1.2 ไมโครลิตร และ Klenow enzyme 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมึ้น ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอน แล้วละลายด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นตรวจสอบการติดฉลากโดยทำ dot blot hybridization ตรวจสอบผลด้วยวิธี chemiluminescence นำดีเอ็นเอของกล้วยทั้งสองชนิดมาไฮบริไดซ์กัน โดยนำดีเอ็นเอกล้วยป่าแพะ 8 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอกล้วยหอมจำปา 52 ไมโครลิตร ใส่ hybridization buffer 40 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ซ้ำมึ้น แยกชั้นดีเอ็นเอที่เหมือนกันออกโดย magnetic beads ที่เคลือบด้วย streptavidin ทำให้ดีเอ็นเอที่เหลือจากการแยกกลับเป็นสายคู่ และเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ซึ่งมี 3 ขั้นตอน คือ 1) 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 2) 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ 3) 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่สนใจกับเวกเตอร์และถ่ายเข้าสู่ *E.coli* DH5 α โดยวิธี heat shock คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชั้นดีเอ็นเอแทรกอยู่โดยวิธีพีซีอาร์ และตรวจสอบผลด้วยวิธี dot blot hybridization โดยใช้ driver เป็นโพรบ คัดเลือกโคลนที่ต้องการนำมาเลี้ยงและสกัดพลาสมิดด้วยชุดสำเร็จรูป Invitex (เยอรมนี) แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม FastPCR (Kalendar *et al.*, 2009) และ Oligonucleotide Properties Calculator (Kibbe, 2007)

การตรวจสอบกล้วยด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSH

ตรวจสอบไพรเมอร์ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธีพีซีอาร์ในบัพเฟอร์ 1 เท่า ประกอบด้วยดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 3 ไมโครลิตร

ไพรเมอร์คู่ต่างๆ ดัง Table 1 (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 3 ไมโครลิตร 2 มิลลิโมลลาร์ dNTP 3 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.15 ไมโครลิตร ปรับด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้มีปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ซึ่งมี 3 ขั้นตอน คือ 1) 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที 2) 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 3) 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองและวิจารณ์

การแยกดีเอ็นเอโดยเทคนิค SSH ได้โคลนทั้งหมดจำนวน 500 โคลน และตรวจสอบโคลนที่มีชั้นดีเอ็นเอสอดแทรกด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่ามี 391 โคลน ที่มีชั้นดีเอ็นเอสอดแทรก และตรวจสอบอีกครั้งด้วยการทำ dot blot hybridization โดยเลือกโคลนที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 600 ถึง 900 คู่เบส จากโคลนที่นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 94 โคลน โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ซึ่งตรงกับข้อมูลยีน 23S rRNA 7 โคลน 16S rRNA 16 โคลน ซึ่งทั้งสองเป็นยีนในคลอโรพลาสต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับลำดับในฐานข้อมูลของของ *Musa acuminata* 26 โคลน *M. balbisiana* 7 โคลน ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีนในคลอโรพลาสต์ 7 โคลน และลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ อีก 31 โคลน จากนั้นนำไปออกแบบไพรเมอร์ได้ 34 คู่ และนำไปตรวจสอบกับกล้วยป่า กล้วยปลุก และกล้วยลูกผสมจำนวน 20 ตัวอย่าง (อุปกรณ์และวิธีการ) ผลจากการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อจีโนม A₁ จำนวน 4 คู่ คือ SSH14, SSH21, SSH23 และ SSH255 โดยให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอ 250, 288, 572 และ 376 คู่เบส ตามลำดับ (Table 1, Figure 1) จำเพาะต่อจีโนม A₂ จำนวน 4 คู่ คือ SSH20, SSH26, SSH66

Table 1 Primer sequences

	Primer	Sequence 5'→3'	PCR product (bp)	T _a (°C)
SSH14	SSH14F	AGCTAGGACGAAAGCGAG	165	55
	SSH14R	GTTACCCTCTGTCTTTGTTG		
SSH21	SSH21F	GCTCCATTAGAGACGAGTTG	228	57
	SSH21R	ACCTACTGAGGGCAGAAAGA		
SSH23	SSH23F	ACTTGGGTCAGTAGGCAAACCTCCA	572	63
	SSH23R	AGAAG CTGGTTACACTACGCCAG		
SSH255	SSH255F	GCTCCATTAGAGACGAGTTGCT	376	63
	SSH255R	GCAGTTCCAAAGTCCAAAGTGCT		
SSH20	SSH20F	GCAAGTCTAAGCTGCAGTGTC	559	55
	SSH20R	GTTGAAGTCCTTTTGTACAGG		
SSH26	SSH26F	GGCGGAATTGAGCTAGTGCT	473	55
	SSH26R	GGGGTTCCGTTTCCGTTTCA		
SSH66	SSH66F	TGGCGGAATTGAGCTAGTGCT	393	63
	SSH66R	CAGACTCAAGTGCTAGGTGTT		
SSH214	SSH214F	CCTTTTCGCAAGTCTAAGCTGCA	534	55
	SSH214R	TTTCTACAGGGGGTAATGCTCGAT		
SSH10	SSH10F	GTTTCTCGGGGTCGACTAATT	433	57
	SSH10R	GGCAAATCTTCAGCAAATGCTC		

และ SSH214 โดยให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอ 549, 473, 393 และ 534 คู่เบส ตามลำดับ (Table 1, Figure 2) และจำเพาะต่อจีโนม A และ B 1 คู่ คือไพรเมอร์ SSH 10 ที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ 433 และ 700 คู่เบส ตามลำดับ (Figure 3)

ไพรเมอร์ SSH14, SSH21 และ SSH255 ที่จำเพาะต่อจีโนม A₁ เมื่อตรวจสอบกับกล้วยตานี (BB) พบแถบดีเอ็นเอขนาด 165, 400 และ 450 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของอัญมณี (2544) ที่ได้ศึกษาดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด simple sequence repeat (SSR) ร่วมกับเทคนิค GISH ในกล้วยป่าจีโนม A และ B และถูกผสมบางตัวอย่าง พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก แสดงให้เห็นว่าจีโนม A₁ และจีโนม B อาจเป็นผลของการเกิดการกลายระหว่างวิวัฒนาการ

ความแตกต่างของจีโนม A และ B โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ สอดคล้องกับการทดลองของ Boonruangrod *et al.* (2009) ที่ศึกษา express sequence tag (EST) โดยใช้วิธี single nucleotide polymorphism (SNP) ปรากฏว่าสามารถแบ่งกล้วยป่าจีโนม A ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ A₁ (*M. acuminata* ssp. *zerbrina*), A₂ (*M. acuminata* ssp. *maleccensis*), A₃ (*M. acuminata* ssp. *burmanica*, *M. acuminata* ssp. *Burmanicoides* และ *M. acuminata* ssp. *siamea*) และ A₄ (*M. acuminata* ssp. *microcapa*, *M. acuminata* ssp. *Errans* และ *M. acuminata* ssp. *banksii*) จากไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อจีโนม A₂ คือไพรเมอร์ SSH20, SSH26, SSH66 และ SSH214 นั้น ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ในจีโนม A ของกล้วยป่าระยอง M3 และ M10 ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่าง

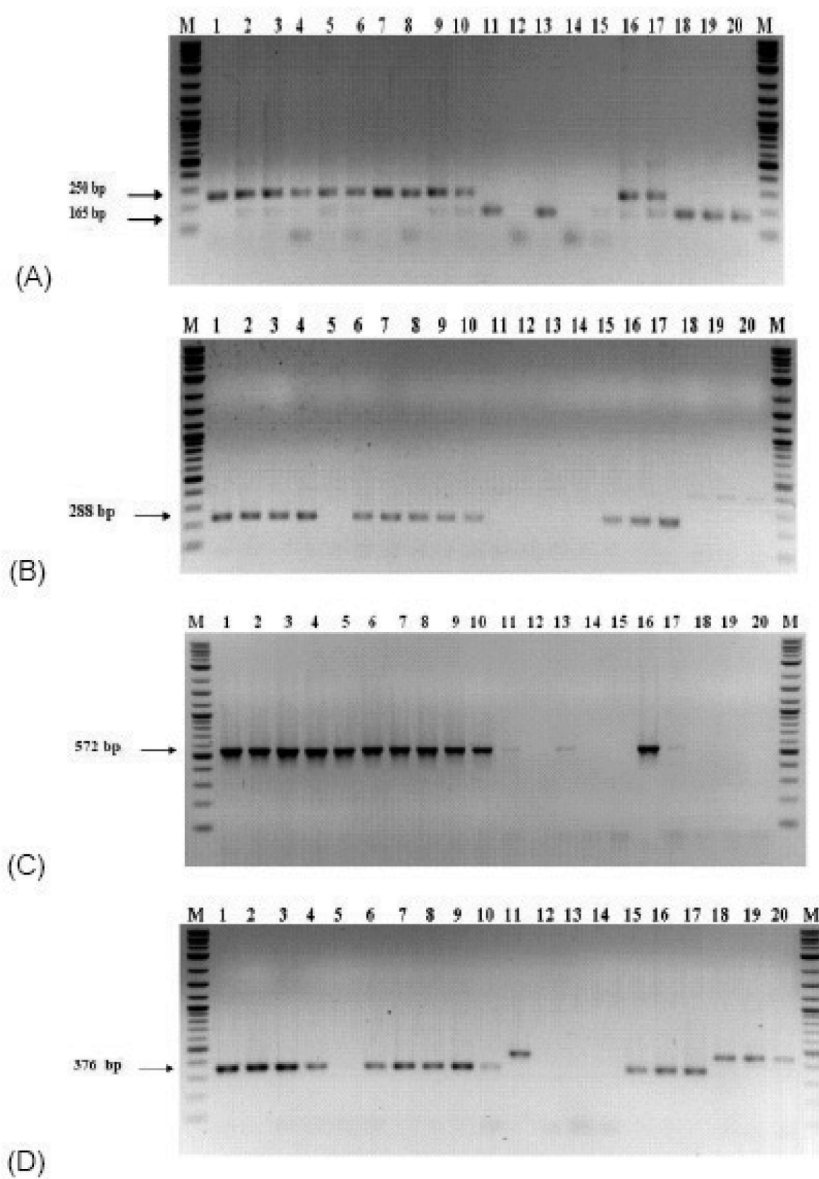


Figure 1 Electrophoretic analysis of PCR specific fragments from *A.* genome using primers SSH14 (A), SSH21 (B), SSH23 (C) and SSH255 (D). M, 1 kb marker; Lane 1, Kluai Pa-Phrae; 2, Kluai Homchumpa; 3, Kluai Khai Kasetsart 2; 4, Kluai Khai Kham Phangphaet; 5, Kluai Sa; 6, Kluai Homchan; 7, Kluai Pa Rayong (M3); 8, Kluai Pa Rayong (M10); 9, Kluai Hom Thong; 10, Kluai Hom Grand Naine; 11, Kluai Namwa Pakchong 50; 12, Kluai Namwa Khom; 13, Kluai Namwa Ngoen; 14, Kluai Namwa Sai Laung; 15, Kluai Roiwi; 16, Kluai Klai; 17, Kluai Nga Chang; 18, Kluai Tani Dum; 19, Kluai Tani Esan; 20, Kluai Tani Tai

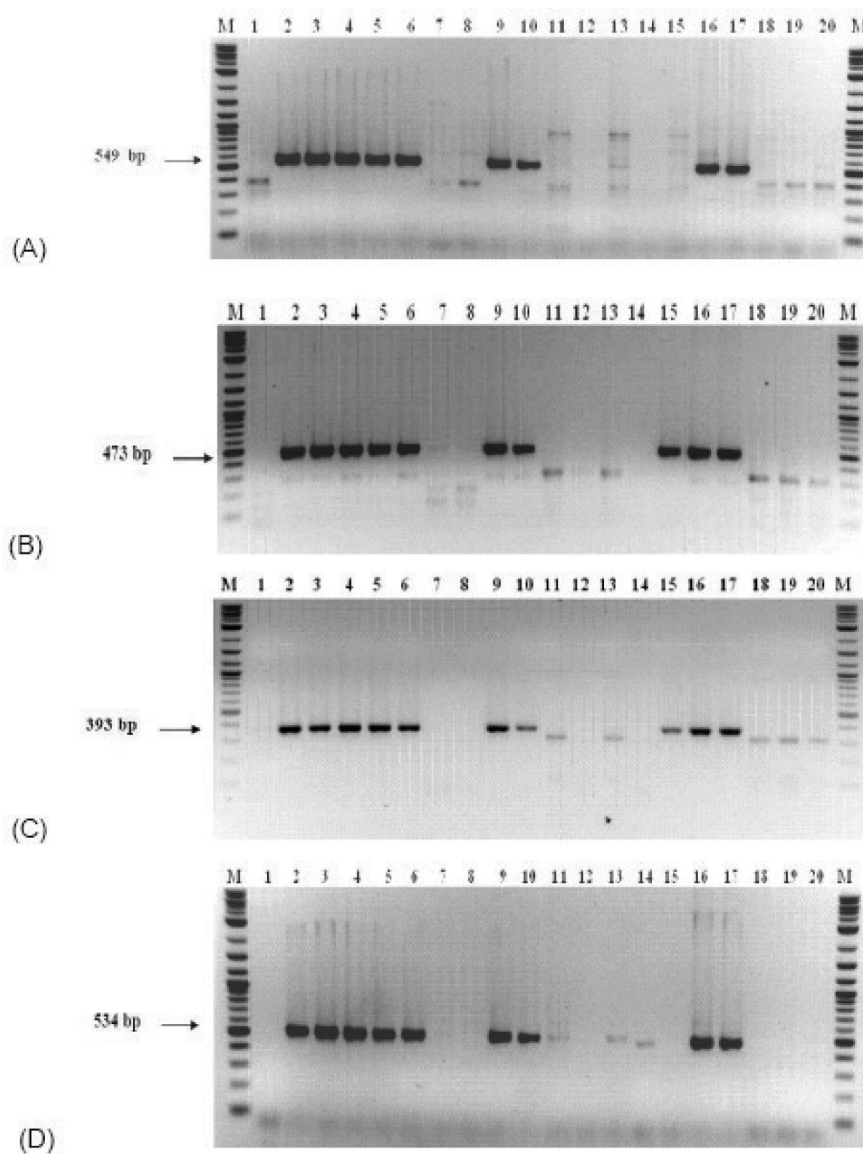


Figure 2 Electrophoretic analysis of PCR specific fragments from *A.* genome using primers SSH20 (A), SSH26 (B), SSH66 (C) and SSH214 (D). M, 1 kb marker; Lane 1, Kluai Pa-Phrae; 2, Kluai Homchumpa; 3, Kluai Khai Kasetsart 2; 4, Kluai Khai Kham Phangphaet; 5, Kluai Sa; 6, Kluai Homchan; 7, Kluai Pa Rayong (M3); 8, Kluai Pa Rayong (M10); 9, Kluai Hom Thong; 10, Kluai Hom Grand Naine; 11, Kluai Namwa Pakchong 50; 12, Kluai Namwa Khom; 13, Kluai Namwa Ngoen; 14, Kluai Namwa Sai Laung; 15, Kluai Roiwi; 16, Kluai Klai; 17, Kluai Nga Chang; 18, Kluai Tani Dum; 19, Kluai Tani Esan; 20, Kluai Tani Tai

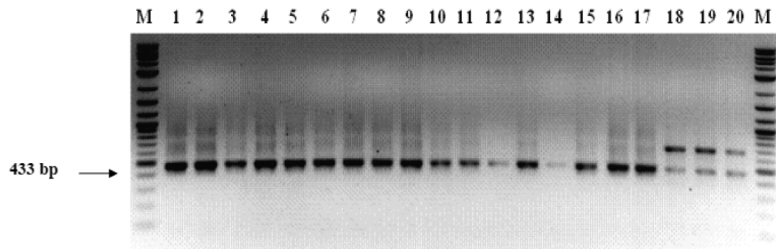


Figure 3 Electrophoresis analysis of PCR specific fragments from primer SSH10.

M, 1 kb marker; Lane 1, Kluai Pa-Phrae; 2, Kluai Homchumpa; 3, Kluai Khai Kasetsart 2; 4, Kluai Khai Kham Phangphaet; 5, Kluai Sa; 6, Kluai Homchan; 7, Kluai Pa Rayong (M3); 8, Kluai Pa Rayong (M10); 9, Kluai Hom Thong; 10, Kluai Hom Grand Naine; 11, Kluai Namwa Pakchong 50; 12, Kluai Namwa Khom; 13, Kluai Namwa Ngoen; 14, Kluai Namwa Sai Laung; 15, Kluai Roiwi; 16, Kluai Klai; 17, Kluai Nga Chang; 18, Kluai Tani Dum; 19, Kluai Tani Esan; 20, Kluai Tani Tai

ทั้งสองอาจมีจีโนม A_3 หรือเป็น *M. acuminata* ssp. *siamea* ส่วนตัวอย่างในกลุ่มจีโนม B นั้นไม่มีความแตกต่างในบริเวณดังกล่าว กล้ายป่า *M. acuminata* ssp. *maleccensis* บริเวณ EST นี้ยังมี 2 แอลลีล ซึ่งตำแหน่งหนึ่งอยู่ในกลุ่ม A_1 และอีกตำแหน่งอยู่ในกลุ่ม A_4 ในกล้ายลูกผสมจีโนม ABB 2 พันธุ์ คือ กล้ายทิพรสและกล้าย Simili Radjah จากการจำแนกด้วยการวิเคราะห์เอนไซม์ pyruvate decarboxylase พบว่าไม่มีจีโนม A พบเพียงจีโนม B ซึ่งแตกต่างจากการตรวจสอบของ Nwakanma *et al.* (2003) ซึ่งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี PCR-RFLP พบว่ากล้ายทั้งสองพันธุ์มีจีโนม A โดยในส่วนของจีโนม A นั้นมีลำดับดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ในกล้ายลูกผสม ABB อื่นๆ

สรุป

จากเทคนิค SSH ทำให้ได้ไพรเมอร์ที่สามารถตรวจสอบกล้ายจีโนม A_1 , A_2 และ B การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับบ่งชี้จีโนมของกล้ายจีโนม A สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ของนักปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ลูกผสม

ที่มีจีโนมตามต้องการ และสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกลูกผสม ทำให้ประหยัดเวลาในการคัดเลือกพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

- เบญจมาศ ศิลาย้อย. 2545. กล้าย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อัญมณี อาวษานนท์. 2544. การประยุกต์ใช้การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ *Genomic In Situ Hybridization* ในการศึกษาจีโนมของกล้ายบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Argawal, V.P. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves. *Biotech Biodiv Lett* 2: 19-24.

- Boonruangrod, R., Fluch, S. and Burg, K. 2009. Elucidation of origin of the present day hybrid banana cultivars using the 5' ETS rDNA sequence information. *Mol Breeding* 24: 77–91.
- Cheesman, E.E., 1948. Classification of the bananas II. The genus *Musa* L., *Kew Bulletin* 2: 106–117.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. and Siebert, P.D. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6025–6030.
- D' Hont, A., Paget-Goy, A., Escoute, J. and Carreel, F. 2000. The interspecific genome structure of cultivated bananas, *Musa* spp. revealed by genomic DNA *in situ* hybridisation. *Theor Appl Genet* 100: 177–183.
- Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A.H. 2009. FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes Genomes Genomics* 3: 1–14. [<http://primerdigital.com/fastpcr.html>]
- Kibbe, W.A. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: W43–W46. [<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>]
- Li, T.X., Wang, J.K., Bai, Y.F. and Lu, Z.H. 2006. Diversity suppression-subtractive hybridization array for profiling genomic DNA polymorphisms. *J Integrat Plant Biol* 48: 460–467.
- Lincoln, R.J., Boxshall, G.A. and Clark, P.F. 1982. *A Dictionary of Ecology, Evolution and Systematics*. Cambridge University Press, London.
- Marenda, M.S., Sagné, E., Poumarat, F. and Citti, C. 2005. Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences. *Microbiology* 151: 475–489.
- Nwakanma, D.C., Pilly, M., Okoli, B.E. and Tenkouano, A. 2003. Sectional relationships in the gene *Musa* L. inferred from the PCR-RFLP of organelle DNA sequence. *Theor Appl Genet* 107: 850-856.
- Osuji J.O., Harrison, G., Crouch, J. and Heslop-Harrison, J.S. 1997. Identification of the genomic constitution of *Musa* L. lines (bananas, plantains, hybrids) using molecular cytogenetics. *Ann Bot* 80: 787–793
- Simmonds, N.W. and Shepherd, K. 1955. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *J Linn Soc Lond Bot* 55: 302–312.