วารสารเกษตร 16(3) : 221 - 230 (2543)
Journal of Agriculture 16(3) : 221 - 230 (2000)

การจำแนกพันธุ์ลูกผสมสตรอเบอรี่โดยวิธีสัณฐานวิทยาและอิเล็กโทรโฟรีซิส

Identification of Strawberry Hybrids by Morphological and Electrophoretic Methods

ปราโมทย์ คำนวล[1] และ เกศิณี ระมิงค์วงศ์ [1]
Pramod Kumnuan[1] and Kesinee Ramingwong[1]

Abstract : Identification of CMU 025 x CMU 035 strawberry hybrids including the relationship among parental varieties and F_1 hybrids were carried out. Quantitative and qualitative characters of leaves, flowers and fruits were used as the key factors in the morphological method for the identification which revealed that the distinct difference among varieties could be determined by canopy density, adaxial petiole color, apical leaflet shape, apical leaflet base, stipule shape, fruit shape, and achene position.

Isozyme patterns analysis was applied for the electrophoretic study using three enzymes :leucine aminopeptidase (LAP), esterase (EST) and shikimic dehydrogenase (SKDH). EST and LAP systems showed high potential in the identification of the strawberry hybrids. They were classified into 4 distinct varieties and 3 groups with 7 patterns and 9 bands of EST, 2 patterns and 4 bands of LAP. Combination of EST and LAP could distingnish some hybrids from parental varieties and among hybrids. SKDH, which showed 1 band, was not served the purpose of strawberry identification.

[1] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
[1]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai 50200, Thailand.

บทคัดย่อ : การจำแนกสตรอเบอรี่พันธุ์ลูกผสม CMU 025 x CMU 035 และหาความสัมพันธ์ของพันธุ์แม่ พ่อ และลูกผสมชั่วที่ 1 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานด้วยการสังเกตและวัดค่าทางปริมาณรวมทั้งคุณภาพของโครงสร้างใบ ดอก และผล ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ชัดเจน โดยใช้ลักษณะของความแน่นทรงพุ่ม สีก้านใบด้านบน รูปร่างใบย่อยกลาง ฐานใบย่อยกลาง รูปร่างหูใบ รูปร่างผล และตำแหน่งเมล็ด

วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสทำโดยศึกษารูปแบบเอนไซม์ leucine aminopeptidase (LAP), esterase (EST) และ shikimic dehydrogenase (SKDH) พบว่าการใช้รูปแบบเอนไซม์ EST ร่วมกับ LAP สามารถจำแนกได้ 4 พันธุ์ กับ 3 กลุ่ม โดย EST พบ 7 รูปแบบ มีแถบเอนไซม์ 9 แถบ และ LAP พบ 2 รูปแบบ มี 4 แถบ การใช้เอนไซม์ EST ร่วมกับ LAP สามารถจำแนกลูกผสมบางเบอร์ออกจากพันธุ์แม่หรือพันธุ์พ่อ หรือระหว่างลูกผสมด้วยกันเองออกจากกันได้ แต่ไม่ทั้งหมด ส่วนเอนไซม์ SKDH แสดงออก 1 แถบ ซึ่งไม่เหมาะสมในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสของสตรอเบอรี่

Index words : สตรอเบอรี่ การจำแนกพันธุ์ อิเล็กโตรโฟลีซีส ไอโซไซม์ สัณฐานวิทยา
strawberry, identification, electrophoresis, isozyme, morphology

คำนำ

การจำแนกพันธุ์พืชทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาสัณฐานวิทยา ซึ่งได้แก่โครงสร้างส่วนต่าง ๆ ของพืช ลักษณะลำต้น ใบ ดอก ผล และ เมล็ด เพื่อใช้เป็นเกณฑ์การจัดจำแนกพืช โดยพืช ที่สืบสายมาจากต้นเดียวกัน ย่อมมีลักษณะโครง สร้างที่คล้ายคลึงกัน (เสนาะ, 2528) โครงสร้าง ทางสัณฐานวิทยานับว่าเป็นลักษณะที่น่าสนใจ สามารถแสดงความหมายได้ในทุกโอกาส รวดเร็ว สะดวก และได้ผลดี (เกศิณี, 2528)

แต่ลักษณะโครงสร้างดังกล่าวอาจผัน แปรไปเนื่องจาก ปฏิกิริยาร่วมระหว่างพันธุกรรม ของพืช กับสภาพแวดล้อม เพื่อกำจัดปัญหาดังกล่าว ปัจจุบันจึงนำวิธีการทางชีวเคมีที่ทันสมัยมาใช้ โดยการศึกษาชนิดตำแหน่งและรูปแบบ ของสารประกอบโปรตีนและเอนไซม์ในพืชที่ เรียกว่าวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อนำมาเขียนเป็น แผนภาพที่เรียกว่าไซโมแกรม (zymogram) สามารถนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์หรือ สายพันธุ์พืชนั้นๆได้ (เพิ่มพงษ์, 2531) เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถศึกษาและตรวจ สอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ของพืชชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันหรือ จำแนกพันธุ์พืชได้ จากการเปรียบเทียบรูปแบบ ของไอโซไซม์ (ชวนพิศ, 2538)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การจำแนกพันธุ์โดยวิธีสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างสตรอเบอรี่คู่ผสม CMU 025 x CMU 035 มาศึกษาลักษณะทรงพุ่ม ใบ ดอก และ ผล บันทึกความเบี่ยงเบนของลักษณะทางคุณภาพ ซึ่งดัดแปลงจากวชิรญา (2537) จากนั้นนำลักษณะทางคุณภาพมาใช้ในการจำแนกพันธุ์

2. การจำแนกพันธุ์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

เก็บใบสตรอเบอรี่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเอนไซม์ esterase (EST) และ shikimic dehydrogenase (SKDH) ใช้ใบสีเขียวอ่อนที่เพิ่งคลี่

เอนไซม์ leucine aminopeptidase (LAP) ใช้ใบแก่สีเขียวเข้ม (Bell and Simpson, 1994) โดยใช้ 100 มิลลิกรัม หั่นแล้วบดในโกร่งพร้อม เติมไนโตรเจนเหลวใส่ extraction buffer 500 ไมโครลิตร (EST และ SKDH ใช้ pH 7.5 ของ 0.1 M Tris base (aminomethane), 0.1 mM EDTA. 2 NA, 10 mM KCl, 0.1 M $MgCl_2.6H_2O$, 4% PVP 40000: LAP ใช้ pH 8.0 ของ 0.05 M Tris-base (aminomethane), 7 mM citric acid, 0.1% cystein hydrochloride, 0.1% ascorbic acid, 1% polyethylene glycol เติม 0.1% 2-mercaptoethanol 10 ไมโครลิตร ต่อ buffer 10 มล. ก่อนใช้) และ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 50 ไมโครลิตร นำไปแยกส่วน ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงดูดส่วนใส (supernatant) เก็บไว้ในหลอด eppendorf เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้ก็แบ่ง supernatant ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมกับ bromophenol blue (marker) 5.0 ไมโครลิตร เมื่อเตรียม slab gel เสร็จแล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสนำแผ่นเจล ไปย้อมเอนไซม์ 3 ชนิดคือ esterase(EST), leucine aminopeptidase (LAP) และ shikimic dehydrogenase (SKDH) แล้วศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ วาดภาพ zymogram จากค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ ของแถบสี (Rm) ตามวิธีการของอาภัสสรา (2537) แล้วจำแนก ลูกผสม และวิเคราะห์กลุ่มพืช (cluster analysis) โดยใช้โปรแกรม SPSS 6.0 ตามวิธีของ Sokal and Sneath (1973)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การจำแนกพันธุ์โดยวิธีสัณฐานวิทยา

การใช้ลักษณะของความแน่นทรงพุ่มสีก้านใบด้านบน รูปร่างใบย่อยกลาง ฐานใบย่อย กลาง รูปร่างหูใบ รูปร่างผล และตำแหน่งเมล็ด สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ชัดเจนดังภาพที่ 1

2.การจำแนกพันธุ์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อใช้ในการจำแนกลูกผสมสตรอเบอรี่โดยทำการย้อมเอนไซม์ esterase (EST), leucine aminopeptidase (LAP) และ shikimic dehydrogenase (SKDH) พบว่า

2.1 การจำแนกโดยเอนไซม์ esterase (EST)

ผลของการย้อมเอนไซม์ EST แสดงตามแผนภาพ zymogram ในภาพที่ 2 พบว่ามีจำนวนแถบเอนไซม์ 9 แถบ โดยมีค่า Rm เท่ากับ 0.36, 0.52, 0.53, 0.55, 0.62, 0.67, 0.69, 0.71 และ 0.72 หนา 0.1, 0.1, 0.1, 0.1, 0.1, 0.1, 1.0, 0.1 และ 0.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ แถบสีของเอนไซม์ที่ พบมีความแตกต่างกันในค่า Rm ความหนา และจำนวนแถบ โดยพบตั้งแต่ 6-9 แถบ ทำให้จำแนกคู่ผสม CMU 025 x CMU 035 ได้ 7 กลุ่ม ตามรูปแบบของเอนไซม์ในภาพที่ 5 ดังนี้

กลุ่มที่ 1 แสดงรูปแบบ B มี 3 พันธุ์ คือ CMU 025,เบอร์ 4 และ 5 มี 7 แถบมีค่า Rm เท่ากับ 0.52,0.53, 0.55, 0.62, 0.67, 0.69 และ 0.71

กลุ่มที่ 2 แสดงรูปแบบ A มี 1 พันธุ์ คือ เบอร์ 2 มี 8 แถบ มีค่า Rm เท่ากับ 0.52, 0.53, 0.55, 0.62, 0.67, 0.69, 0.71 และ 0.72

กลุ่มที่ 3 แสดงรูปแบบ C มี 2 พันธุ์ คือ เบอร์ 8 และ 31 มี 8 แถบ มีค่า Rm เท่ากับ 0.36, 0.52, 0.53, 0.55, 0.62, 0.67, 0.69 และ 0.71

กลุ่มที่ 4 แสดงรูปแบบ D มี 3 พันธุ์ คือ เบอร์ 9, 12 และ19 มี 9 แถบ มีค่า Rm เท่ากับ 0.36,0.52,0.53,0.55,0.62,0.67,0.69,0.71และ 0.72

กลุ่มที่ 5 แสดงรูปแบบ E มี 1 พันธุ์ คือ เบอร์ 22 มี 7 แถบ มีค่า Rm เท่ากับ 0.52, 0.53, 0.55, 0.62, 0.69, 0.71 และ 0.72

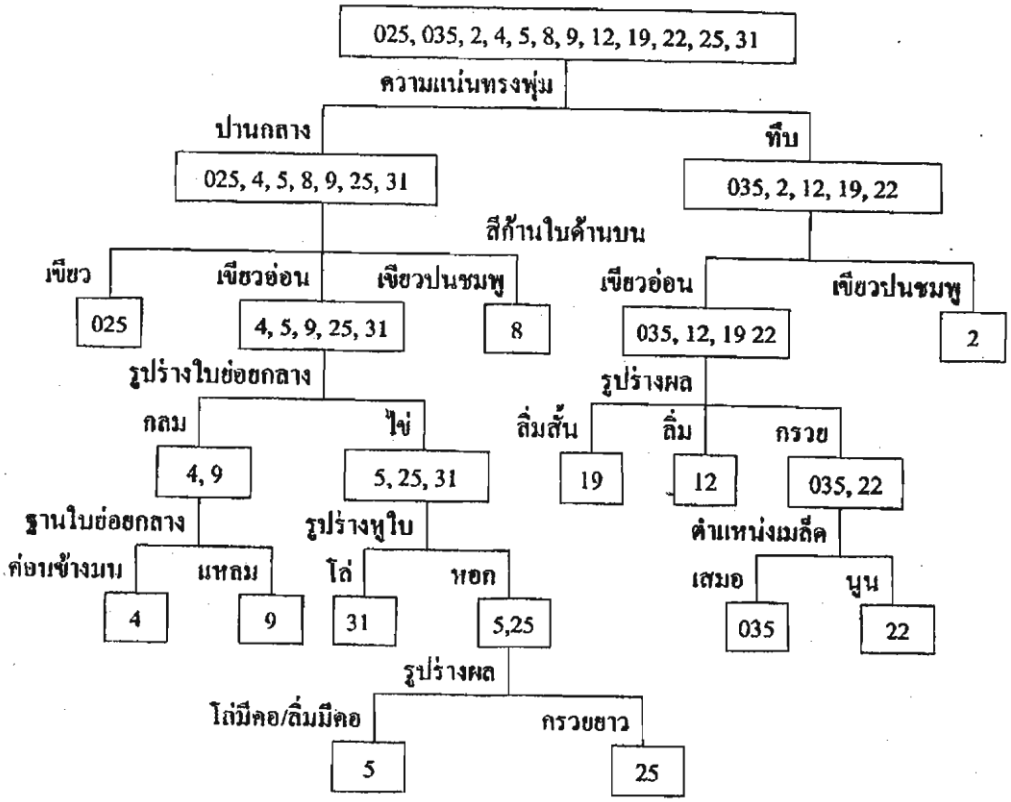

Figure 1 **Identical chart of CMU 025, CMU 035 and hybrid varieties by qualitative characters.**

กลุ่มที่ 6 แสดงรูปแบบ F มี 1 พันธุ์ คือ เบอร์ 25 มี 6 แถบ มีค่า Rm เท่ากับ 0.52, 0.53, 0.55, 0.62, 0.69 และ 0.72

กลุ่มที่ 7 แสดงรูปแบบ G มี 1 พันธุ์ คือ CMU 035 มี 8 แถบ มีค่า Rm เท่ากับ 0.36, 0.52, 0.53, 0.55, 0.62, 0.67, 0.69 และ 0.72

2.2 การจำแนกโดยเอนไซม์ leucine aminopeptidase (LAP)

ผลของการย้อมเอนไซม์ LAP แสดงตามแผนภาพ zymogram ในภาพที่ 3 พบว่ามี จำนวนแถบเอนไซม์ 4 แถบ โดยมีค่า Rm เท่ากับ 0.45, 0.48 และ 0.52 หนา 0.5, 0.5 และ 1.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ค่า Rm ที่ 0.54 มีความหนา 2 ค่าคือ 0.5 และ1.0 มิลลิเมตรแถบสีของเอนไซม์ที่พบมีความแตกต่างกันในค่าRm ความหนาและ จำนวนแถบ โดยพบตั้งแต่ 3-4 แถบ ทำให้จำแนก คู่ผสม CMU 025 x CMU 035 ได้ 2 กลุ่ม ตามรูปแบบของเอนไซม์ในภาพที่ 6 ดังนี้

กลุ่มที่ 1 แสดงรูปแบบ A มี 11 พันธุ์ คือ CMU 025, เบอร์ 2, 4, 5, 8, 9, 12, 19, 22, 25 และ 31 มี 3แถบมีค่า Rm เท่ากับ 0.45, 0.52 และ 0.54

กลุ่มที่ 2 แสดงรูปแบบ B มี 1 พันธุ์ คือ CMU 035 มี4 แถบ มีค่า Rm เท่ากับ 0.45, 0.48, 0.52 และ 0.54

แต่ถ้าพิจารณาความหนาของแถบอาจจำแนก เบอร์ 31 เป็นกลุ่มที่ 3

2.3 การจำแนกโดยเอนไซม์ shikimic dehydrogenase (SKDH)

ผลของการย้อมเอนไซม์ SKDHแสดง

ตามแผนภาพzymogram ในภาพที่ 4 พบว่ามีจำนวนแถบเอนไซม์ 1 แถบ โดยมีค่า Rm เท่ากับ 0.42 หนา 1.0 มิลลิเมตร แถบสีของเอนไซม์ที่พบไม่มี ความแตกต่างกันในค่าRm ความหนาและจำนวน แถบ โดยแสดงรูปแบบ A อย่างเดียวดัง ภาพที่ 7 ทำให้ไม่สามารถจำแนกคู่ผสม CMU 025 x CMU 035 ได้

เมื่อใช้รูปแบบเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ร่วมกันสามารถจำแนกคู่ผสม CMU 025 x CMU 035 ได้ 4 พันธุ์ กับ 3 กลุ่ม (ภาพที่ 8) ดังนี้

1. เบอร์ 2
2. เบอร์ 22
3. เบอร์ 25
4. พันธุ์ CMU 035
5. พันธุ์ CMU 025 เบอร์ 4 และ 5
6. เบอร์ 8 และ 31
7. เบอร์ 9, 12 และ 19

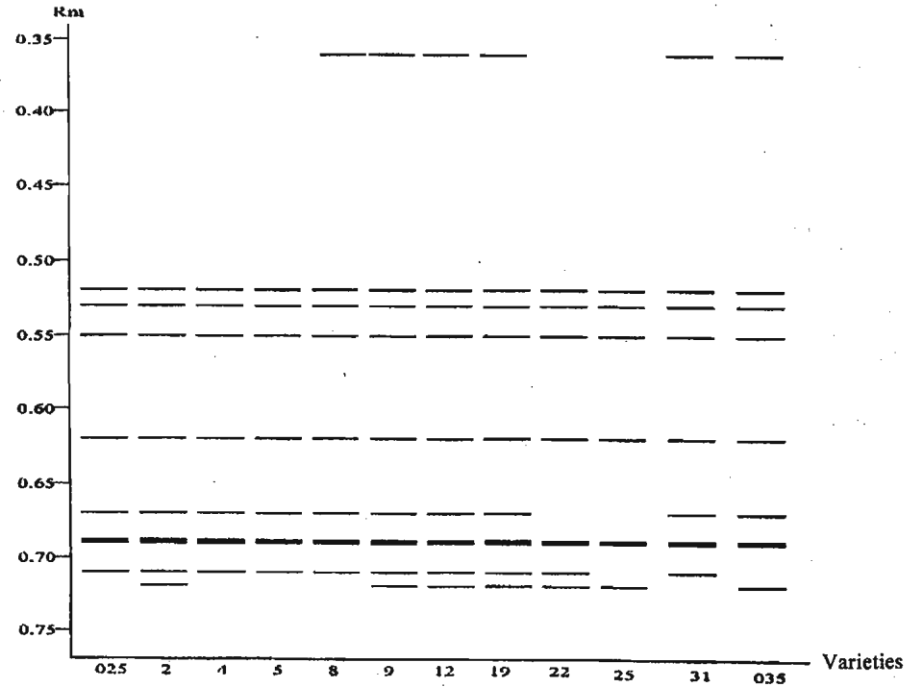

Figure 2 EST zymogram of CMU 025, CMU 035 and hybrid varieties.

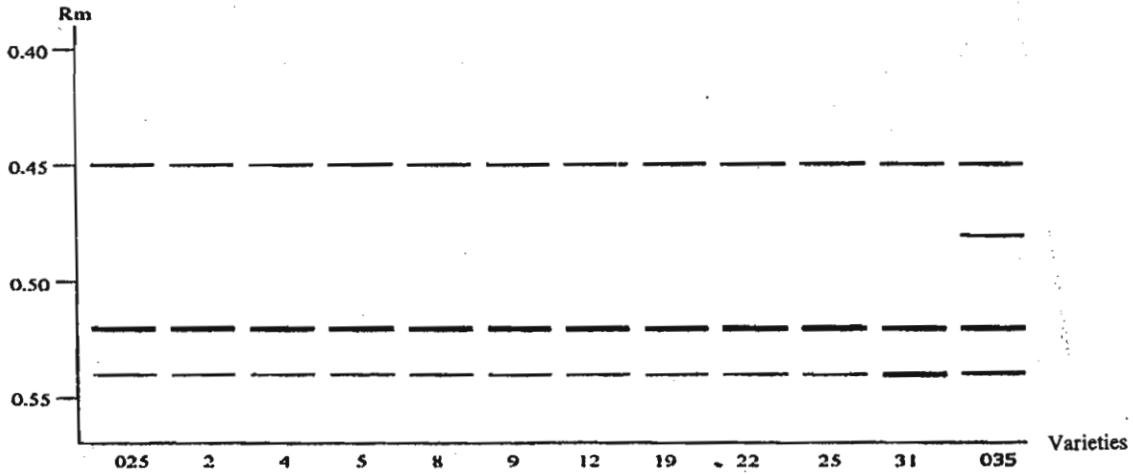

Figure 3 LAP zymogram of CMU 025, CMU 035 and hybrid varieties.

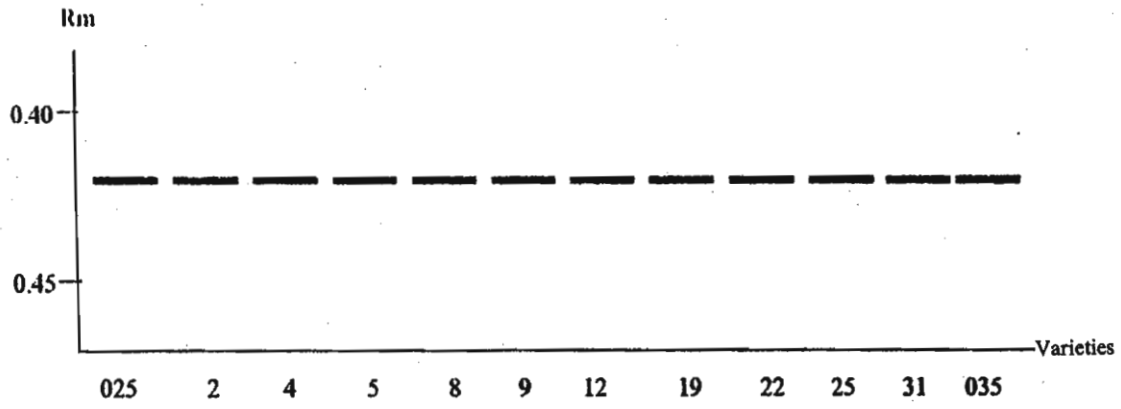

Figure 4 SKDH zymogram of CMU 025, CMU 035 and hybrid varieties.

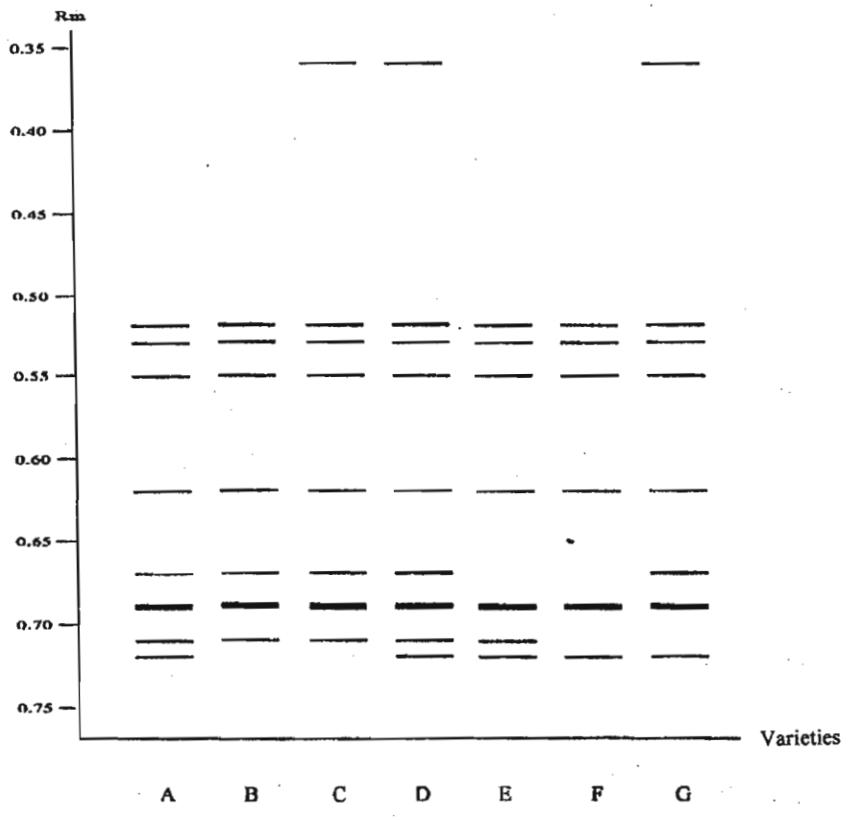

Figure 5 EST patterns of CMU 025, CMU 035 and hybrid varieties.

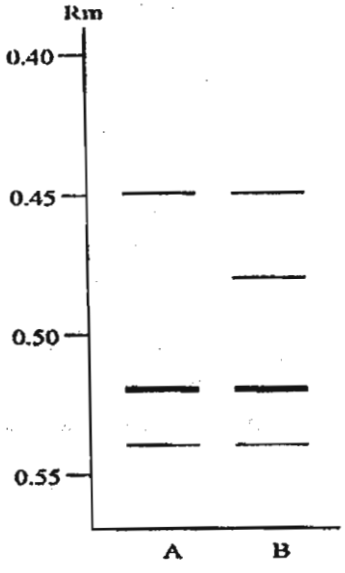

Figure 6 LAP patterns of CMU 025 xCMU 035 and hybrid varieties.

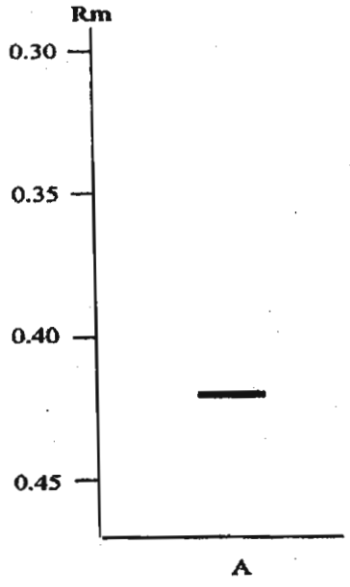

Figure 7 SKDH pattern of CMU 025 x CMU 035 and hybrid varieties.

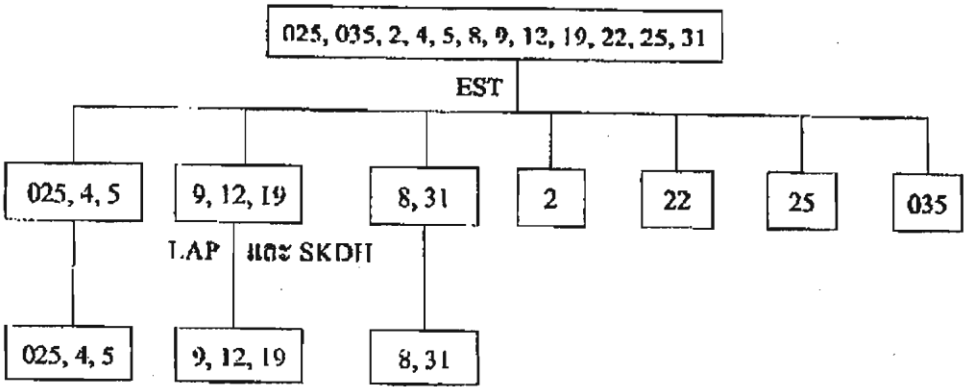

Figure 8 Identical chart of CMU 025, CMU 035 and hybrid varieties by EST, LAP and SKDH isozyme patterns.

2.4 การวิเคราะห์กลุ่มพืชเพื่อหาความสัมพันธ์ของลูกผสมกับพันธุ์แม่และพ่อ

ความสัมพันธ์ระหว่างลูกผสม CMU 025 x CMU 035 กับพันธุ์ CMU 025 และ พันธุ์ CMU 035 โดยพิจารณาจากการมีหรือไม่มีแถบสีไอโซไซม์ EST, LAPและ SKDH สามารถจัดความสัมพันธ์ได้ดังภาพที่ 9 แสดงให้เห็นว่าลูก ผสมทุกเบอร์มีความใกล้ชิดกับพันธุ์ CMU 025 มากกว่าพันธุ์ CMU 035 โดยพันธุ์ CMU 025 มี ความแตกต่างมากกับพันธุ์ CMU 035

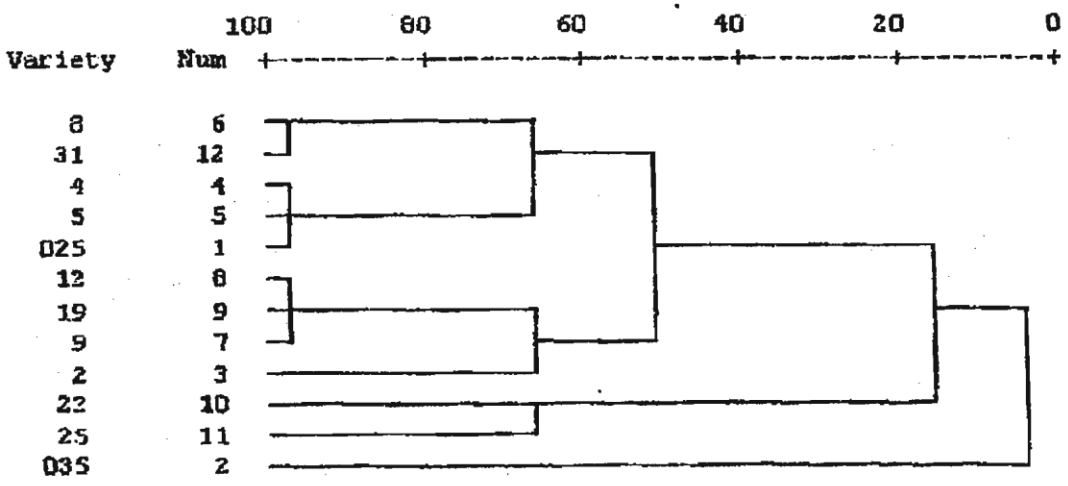

Figure 9 Relationship among CMU 025, CMU 035 and hybrid varieties from the presence of EST, LAP and SKDH.

การที่เอนไซม์บางแถบพบในลูกผสมแต่ไม่พบในพันธุ์พ่อหรือแม่ เนื่องจากลูกผสมเป็นผลจากการรวมตัวของพันธุกรรมแม่และพ่อ จึงเกิดการกลายพันธุ์ (gene recombination) ขึ้น ส่งผลให้ลูกผสมผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นมา หรือบางแถบพบในพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่แต่ไม่พบในลูกผสม เนื่องจากลูกผสมไม่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดเดิมได้ เนื่องจากเหตุผลเดียวกันด้านความหนาของแถบที่ต่างกันของแถบเอนไซม์ที่ตำแหน่ง Rm เดียวกันนั้น สมิต และประวิทย์ (2533) กล่าวว่าการที่แถบไอโซ-ไซม์หนึ่ง ๆ ปรากฏอยู่ในไซโมแกรมของ สายพันธุ์ที่ต่างกัน 2 สายพันธุ์แต่มีความแตกต่าง กันในด้านความเข้มของสีเป็นความแปรปรวนทางปริมาณ ซึ่งไม่ชัดเจนเหมือนความแปรปรวนทาง ด้านคุณภาพ อย่างไรก็ตามความแปรปรวนทั้ง สองชนิดนี้จะเป็นตัวกำหนดศักยภาพของระบบไอโซไซม์นั้น ๆ ในการระบุพันธุ์พืช

สรุปผลการทดลอง

จากการจำแนกสตรอเบอรี่พันธุ์ลูกผสม CMU 025 x CMU 035 และหาความสัมพันธ์ของ พ่อแม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 โดยวิธีสัณฐานวิทยา และชีวเคมี พบว่า

1. ลักษณะของความแน่นทรงพุ่ม สีก้านใบด้านบน รูปร่างใบย่อยกลาง ฐานใบย่อยกลาง รูปร่างหูใบ รูปร่างผล และตำแหน่งเมล็ด ใช้จำแนกลูกผสมจากพันธุ์พ่อและแม่ได้ชัดเจน

2. รูปแบบเอนไซม์ EST ร่วมกับ LAP สามารถจำแนกได้ 4 พันธุ์ กับ 3 กลุ่ม โดย EST พบ 7 รูปแบบ มีแถบเอนไซม์ 9 แถบ และ LAP พบ 2 รูปแบบ มี 4 แถบ

3. เอนไซม์ SKDH แสดงออก 1 แถบ ในทุกคู่ผสมซึ่งไม่เหมาะสมในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสของสตรอเบอรี่

เอกสารอ้างอิง

เกศิณี ระมิงค์วงศ์. 2528. การจัดจำแนกไม้ผล. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 289 น.

ชวนพิศ อรุณรังสิกุล. 2538. เทคนิคการตรวจ สอบและจำแนกพันธุ์พืชด้วยการใช้ Isozyme pattern, น.16-30. *ใน* เอกสารประกอบการ ฝึกอบรมทางวิชาการ การตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยการใช้ Isozyme pattern และ RAPD. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2531. เทคนิคทางอิเล็กโทร-โฟรีซิสในการจำแนกพันธุ์พืช, น.17-33. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิสในการจำแนกพันธุ์พืช.สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน,นครปฐม.

วชิรญา อิ่มสบาย. 2537. การเปรียบเทียบพันธุ์สตรอเบอรี่ในสภาพพื้นที่ราบ. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 54 น.

สมิต บุญเสริมสุข และ ประวิทย์ จิตต์จำนงค์. 2533. การศึกษา isozyme กับพรรณไม้ป่า. วนสาร 48(1): 20-24.

เสนาะ บุญมี. 2528. อนุกรมวิธานและสัณฐาน วิทยาของพืช. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศรีนครินทร-วิโรฒ (มหาสารคาม), มหาสารคาม. 159 น.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิส. ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 86 น.

Bell, J. A. and D.W. Simpson. 1994. The use of isozyme polymorphisms as an aid for cultivar identification in strawberry. Euphytica 77:113-117.

Sokal, R. R. and P. H. A. Sneath. 1973. Principles of Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco. 573 p.