

การจำแนกพันธุ์และเพศมะละกอโดยใช้เทคนิค DNA Amplification Fingerprinting (DAF)
Identification of Certain Papaya Cultivars and Sex Identification in Papaya by
DNA Amplification Fingerprinting (DAF)

ทรงพล สมนศรี^{1/}

Songpol Somsri^{1/}

สุคนธ์ทิพย์ บุษบากรกุล^{2/}

Sukhontip Bussabakornkul^{2/}

ABSTRACT

DNA amplification fingerprinting (DAF) was employed to study the relationships among fourteen cultivars of the papaya (*Carica papaya* L.) collected from Srisaket and Chantaburi Horticultural Research Centre. Ten-base synthetic oligonucleotides were chosen that gave multiple PCR amplification products using papaya DNA as template. Using the 11 primers, a total of 129 distinct fragments were amplified. Cultivars were scored for the presence or absence of DAF fragments and grouped by cluster analysis using sample matching coefficients of similarity and the unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA). The results identified three groups of cultivars. The first group was comprised of Pak Chong, Khaeg Dum, Mexico Mammy and Khaeg Nuan. The second group was comprised of Cocoa Karn Dum, Apple, Tainung, Mae Hia, Florida Tolerant, Sunset and Mexico Amerilla. The third group was comprised of Taiwan, Kapoho Solo and Richter. The DAF Technology is a rapid, precise and sensitive techniques for genomic analysis, and is recommended as a accurate method to identify plant genotypes within the same species. The best DAF reaction mixture contained 30 ng of genomic DNA, 5 mM magnesium ion, 2.5 mM primer per 20 μ l reaction. A total of 52 primers were used in bulk segregate analysis (BSA) against of male, female and hermaphroditic plants. The OPA 06 (5' GGT CCC TGAC 3') primer could be used to identify the sex type of papaya plants. This primer produced two polymorphic bands: one of ~ 365 base pairs (bp) from hermaphrodite bulk DNA and the

^{1/} สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

Horticulture Research Institute, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

^{2/} ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี, กรมวิชาการเกษตร อ.แหลมสิงห์ จ.จันทบุรี 22110

Chanthaburi Horticultural Research Centre, Laem Sing district, Chanthaburi province 22110

other of ~ 360 bp from the male bulk DNA. Neither band was detected for females. Evaluation of the accuracy of OPA 06 analysis was done using 254 plants of different generations and their original parents, and the analysis correctly identify sex type for 88.18% of the plants. The final experiment, 47 tissue cultured hermaphrodite plants of the Khaeg Dum cultivar were examined using OPA 06 , and the sex type was identified correctly for 100% of the plants.

Key words : *Carica papaya*, cultivars, sex-type, identification, DNA fingerprinting, DAF technique

บทคัดย่อ

การศึกษาและตรวจสอบลักษณะประจำพันธุ์ในระดับพันธุกรรมของมะละกอ (*Carica papaya* L.) ด้วยเทคนิค DNA Amplification Fingerprinting (DAF) และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA จากการใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้วจำนวน 11 ไพรเมอร์จาก 52 ไพรเมอร์ได้แก่ OPA 04, OPA 08, OPB 05, OPB 09, OPC 03, OPC 05, OPC 06, OPC 10, OPE 17, OPG 01 และ OPS 10 ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และสถาบันวิจัยพืชสวนพบว่า การจำแนกพันธุ์มะละกอ 14 พันธุ์ด้วยเทคนิค DAF โดยใช้ 11 ไพรเมอร์ขยายปริมาณ

แถบ DNA ได้ทั้งหมด 129 แถบ โดยพบแถบที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic loci) 28 แถบ คิดเป็น polymorphic loci 21.71 % และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของแถบ DNA แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพันธุ์ปากช่อง แหกดำ Mexico Mammy และแหกนวล กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยพันธุ์โกโก้ก้านดำ Apple Tainung แม่เหี้ยะ Florida Tolerant, Sunset และ Mexico Amerilla กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยพันธุ์ Taiwan Kapoho Solo และ Richter สำหรับอัตราส่วนของสารละลายที่เหมาะสมที่สุด ในการขยายเพิ่มปริมาณแถบ DNA ของมะละกอ ด้วยเทคนิค DAF พบว่า ประกอบด้วย genomic DNA 2.5 ไมโครลิตรจำนวน 30 นาโนกรัม แมกนีเซียมไอออน 5 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 10 mer 2.5 มิลลิโมลาร์ต่อสารละลาย (reaction solution) 20 ไมโครลิตร นอกจากนี้ได้จำแนกเพศของมะละกอในระยะต้นกล้าโดยไพรเมอร์ทั้งหมด 52 ไพรเมอร์ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์แถบ DNA แบบ bulk segregate กับต้นมะละกอเพศผู้ เพศเมีย และต้นสมบูรณ์เพศ (กระเทย) ของลูกผสมชั่วที่ 1 พบว่า ไพรเมอร์ OPA-06 (5' GGT CCC TGAC 3') ใช้จำแนกเพศของมะละกอได้ โดยจะให้ความแตกต่างของแถบ DNA (polymorphic) 2 แถบๆ แรกมีขนาดประมาณ 365 base pairs (bp) จากต้นสมบูรณ์เพศ (กระเทย) และอีกแถบมีขนาดประมาณ 360 bp จากต้นเพศผู้ ส่วนเพศเมียไม่พบแถบทั้งสอง ต่อมาได้ทำการทดสอบไพรเมอร์ OPA-06 กับมะละกอลูกผสมชั่วที่ 1 2

3 4 และพ่อแม่พันธุ์จำนวน 254 ต้น พบว่า จำแนกเพศได้อย่างถูกต้อง 88.18 % และได้ทำการทดสอบกับต้นมะละกอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 47 ต้น พบว่าสามารถใช้จำแนกเพศได้ถูกต้อง 100 %

คำหลัก : *Carica papaya* การจำแนกพันธุ์ เพศ ปลายพิมพ์ DNA เทคนิค DAF พันธุ์มะละกอ ลูกผสมชั่วที่ 1 2 3 และ 4

คำนำ

มะละกอ (*Carica papaya* L.) นับว่าเป็นผลไม้เขตร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย การปลูกมะละกอเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถเติบโตได้รวดเร็วให้ผลผลิตได้เร็ว ต้นทุนในการปลูกต่ำ และเป็นพืชที่ใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย มะละกออุดมไปด้วยวิตามิน A และ C และมีเอนไซม์ที่ชื่อว่าปาเปน (papain) เป็นจำนวนมาก ซึ่งเอนไซม์นี้เป็นส่วนประกอบสำคัญทางเภสัชกรรม สิ่งทอและอุตสาหกรรมฟอกหนัง (Ranganna, 1977) ต้นมะละกอเพศกระเทย (gynodioecious) นิยมปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศ เช่น อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี จ.ขอนแก่น และจ.นครราชสีมา เป็นต้น แต่สามารถพบต้นเพศผู้ได้ในบางครั้ง

มะละกอเป็นพืชที่มีดอกแยกเพศอยู่ต่างต้น สามารถเป็นได้ทั้งเพศผู้ เพศเมียและสมบูรณ์เพศ (กระเทย) การแสดงออกของเพศในมะละกอนั้น

มีผลต่อผลผลิต (productivity) ตลอดจนจำนวนของเกสรตัวเมียหรือดอกสมบูรณ์เพศ (กระเทย) ซึ่งถูกถ่ายละอองเรณูบนต้นที่โตเต็มที่ และยังส่งผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผล (Arkle *et al.*, 1984) ในประชากรของพืชที่มีดอกแยกเพศอยู่ต่างต้น พบว่าลมเป็นปัจจัยสำคัญในการกระจายละอองเกสร ช่อดอกเพศผู้ที่ห้อยยาวลงมาปล่อยละอองเกสรไปอย่างรวดเร็วกับลมที่พัดผ่าน (Prest, 1955; Storey, 1969) อย่างไรก็ตาม Allan (1963) ได้รายงานว่ามีละอองเกสรมะละกอเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่ลอยไปกับอากาศ และกล่าวว่าผึ้งอาจมีส่วนในการกระจายละอองเกสรตัวผู้ การที่มีดอกแยกเพศของมะละกอ ทำให้ต้องมีการถ่ายข้ามละอองเรณู เนื่องจากการแยกกันของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ดังนั้น จึงมีการปลูกต้นมะละกอเพศผู้เพื่อถ่ายละอองเกสรในการเพิ่มผลผลิตมะละกอ

ในอดีตยอมรับกันว่ามีความแตกต่างอย่างมาก ในลักษณะของการเจริญเติบโตของต้น และลักษณะคุณภาพผลของมะละกอ ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการปลูกโดยใช้เมล็ด ปัจจุบันการผลิตเชิงการค้าโดยการขยายพันธุ์ด้วยสายต้นในโรงเรือนเพาะชำ และการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นที่ยอมรับอย่างสูง ถึงแม้การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีการต่อกิ่งเสียบยอด หรือการปักชำมะละกอและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีปัญหาการช้ำของตายอด แต่เนื่องจากมีความต้องการในการอนุรักษ์ความหลากหลายของเชื้อพันธุ์สำหรับใช้ประโยชน์ใน

การปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต และการอนุรักษ์ในสภาพไร่นาดูเหมือนจะค่อนข้างทำได้ลำบาก เนื่องจากต้องใช้เนื้อที่และแรงงานเป็นจำนวนมาก นอกจากนั้นต้องเผชิญกับภัยธรรมชาติ ศัตรูพืช และยังเป็นพาหะของโรคด้วย

การจำแนกพันธุ์พืชสามารถจำแนกได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่การจำแนกสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันนั้นยุ่งยากและมีเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดสูง ดังนั้น การใช้ DNA หรือการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมเป็นวิธีที่ให้ความถูกต้องได้มากกว่า

เพศของมะละกอถูกควบคุมโดยยีน 1 ตำแหน่งและมีรูปแบบ 3 แบบของยีนคือ M 1 (เพศผู้) M 2 (สมบุรณ์เพศหรือกระเทย) และ m (เพศเมีย) (Hofmeyr, 1938; Storey, 1938; 1953, 1976; Gupta, 1989; Manshardt, 1992) เพศผู้ (M 1m) และต้นสมบุรณ์เพศ (กระเทย) (M 2m) เป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ในทางตรงข้ามต้นเพศเมีย (mm) เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) การรวมกันของลักษณะเด่น เช่น M1M1, M1M2 หรือ M2M2 จะเป็นหมัน (Storey, 1938)

เพศของมะละกอแต่ละต้น จากการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นไม่สามารถทราบเพศได้จนกว่ามะละกอจะออกดอกซึ่งปกติแล้วใช้เวลา 6 เดือนหรือมากกว่าหลังจากเมล็ดงอก (Storey, 1953; Gupta, 1989) มีความพยายามใช้ลักษณะทางกายภาพ เคมี และวิธีการต่าง ๆ เพื่อทำนายเพศของมะละกอ แต่

ยังไม่ประสบความสำเร็จ (Rao *et al.*, 1985) วิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและง่ายสำหรับการจำแนกเพศมะละกอในช่วงการเจริญเติบโตระยะต้นกล้า ซึ่งอาจจะนำมาใช้ในการเตรียมต้นที่มีเพศตามความต้องการก่อนปลูก และการปรับปรุงพันธุ์มะละกอ ได้แก่วิธีการดำนโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker) โดยเฉพาะการใช้เทคนิค DNA amplification fingerprint; DAF (Somsri *et al.*, 1998; Somsri, 1999; สุคนธ์ทิพย์, 2547)

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction; PCR) เป็นหลักพื้นฐานสำหรับ การขยายเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น Random amplified polymorphic DNA; RAPD (Williams *et al.*, 1990), Arbitrarily primed-polymerase chain reaction; AP-PCR (Welsh *et al.*, 1990), DNA amplification fingerprinting; DAF (Caetano-Anolles *et al.*, 1991; Bentley and Bassam, 1996) และ Amplified fragment length polymorphism; AFLP (Vos *et al.*, 1995) ซึ่งถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในการสร้างโมเลกุลเครื่องหมาย สำหรับการทำแผนที่ยีนอนุกรมวิธานโมเลกุล และการวินิจฉัยโมเลกุล (Bassam and Bentley, 1994) สำหรับมะละกอ Sondur และคณะ (1996) ได้สร้างแผนที่ความเชื่อมโยงของยีนโดยใช้วิธี RAPDs และได้จำแนกโมเลกุลเครื่องหมาย 2 โมเลกุล เครื่องหมายที่กำหนดเพศที่ตำแหน่งประมาณ 7 เซ็นติมอแกน (centimorgans)

ในการศึกษานี้ เทคนิค DAF ถูกใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์มะละกอ 14 พันธุ์ โดยพันธุ์มะละกอ 2 ใน 14 พันธุ์ ประกอบด้วยเชื้อพันธุ์ Hawaiian ซึ่งรวมถึงพันธุ์ Kapoho solo (Nakasone *et al.*, 1972) และ Sunset (Hamilton and Ito, 1968) ส่วนพันธุ์ Florida Tolerant และ Richter ซึ่งพิจารณาว่ามีความเป็นเลือดชิดน้อยกว่าพันธุ์อื่นในการศึกษาครั้งนี้ (Bussabakornkul, 2003)

จากการศึกษาวิเคราะห์หลายตัวแปรได้สร้าง dendrogram สำหรับจัดหมวดหมู่พันธุ์ ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ซึ่งมีที่มาที่ไม่ชัดเจน ซึ่งผลลัพธ์ดังกล่าวทำให้เชื่อว่าเทคนิค DAF จะเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ประมาณค่าความสัมพันธ์ความห่างและความใกล้ชิดของชนิดและพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ ยังใช้เทคนิค DAF เพื่อการวิเคราะห์การจำแนกเพศของมะละกอ ในระยะต้นกล้าของมะละกอพันธุ์ต่าง ๆ และลูกผสมเพื่อประโยชน์ในการวางแผนการผลิตมะละกอหรือการปรับปรุงพันธุ์มะละกอต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมต้นพืช และตัวอย่างใบมะละกอ

1.1 พันธุ์มะละกอทั้ง 14 พันธุ์ที่ใช้ศึกษา (Table 1) เก็บรวบรวมในประเทศไทย โดย 12 พันธุ์ปลูก ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ จ.ศรีสะเกษ และอีก 2 พันธุ์ปลูกเลี้ยงในโรงเรือนกระจก ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จ.จันทบุรี ซึ่งมีสภาพอุณหภูมิประมาณ 25-35 °ซ แล้ว

ทำการเก็บตัวอย่างใบจากแต่ละต้นหลังจากงอกได้ 3 เดือน เก็บรักษาใบในอุณหภูมิ -20 °ซ หรือ -70 °ซ ก่อนทำการทดลอง

1.2 ลูกผสมชั่วที่ 1 ต้นกระเทย ต้นตัวผู้ และต้นตัวเมียสุ่มมาอย่างละ 8 ต้น ซึ่งได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างต้นกระเทยพันธุ์แขกดำเป็นต้นแม่กับต้นตัวผู้พันธุ์ Richter เป็นต้นพ่อ จากแปลงทดลองศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี

1.3 ลูกผสมชั่วที่ 1 2 3 4 และมะละกอพันธุ์ต่างๆ จำนวน 254 ต้น จากแปลงทดลองศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี

1.4 มะละกอพันธุ์แขกดำต้นสมบูรณ์เพศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 47 ต้น จากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

2. การสกัด DNA

สกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากใบอ่อนของมะละกอโดยใช้ Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ตามวิธีของ Somsri และคณะ (1998) และ Somsri (1999) ซึ่งประยุกต์จากวิธีของ Graham และคณะ (1994) โดยใช้ใบอ่อนหนักประมาณ 0.2 ก. บดให้ละเอียดในโกร่งซึ่งมีไนโตรเจนเหลวอยู่ ใส่ตัวอย่างใบที่บดเป็นผงละเอียดแล้วลงในหลอดขนาด 1.5 มล. ซึ่งมีสารละลาย CTAB อยู่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สารละลาย CTAB buffer ประกอบด้วย CTAB 2 % NaCl 1.4 โมลาร์ Tris 100 มิลลิโมลาร์ EDTA 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 20 นาที นำมาตกตะกอนโดยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่

Table 1. List of 14 *Carica papaya* cultivars with their source of origin and collected locations for DNA amplification fingerprinting (DAF) analysis

Cultivar	Source of origin	Collected location
1 Pak Chong	Thailand	Srisaket Horticultural Research Centre, Si Sa Ket
2 Cocoa Karn Dum	Thailand	Srisaket Horticultural Research Centre, Si Sa Ket
3 Apple	Indonesia	Srisaket Horticultural Research Centre, Si Sa Ket
4 Taiwan	Taiwan	Srisaket Horticultural Research Centre, Si Sa Ket
5 Mexico Mammy	Mexico	Srisaket Horticultural Research Centre, Si Sa Ket
6 Tainung	Taiwan	Srisaket Horticultural Research Centre, Si Sa Ket
7 Khaeg Dum	Thailand	Srisaket Horticultural Research Centre, Si Sa Ket
8 Mae Hia	Hawaii, U.S.A	Srisaket Horticultural Research Centre, Si Sa Ket
9 Florida Tolerant	Florida, U.S.A.	Srisaket Horticultural Research Centre, Si Sa Ket
10 Khaeg Nuan	Thailand	Srisaket Horticultural Research Centre, Si Sa Ket
11 Mexico Amerilla	Mexico	Srisaket Horticultural Research Centre, Si Sa Ket
12 Kapoho Solo	Hawaii, U.S.A.	Srisaket Horticultural Research Centre, Si Sa Ket
13 Sunset	Hawaii, U.S.A.	Chantaburi Horticultural Research Centre, Chanthaburi
14 Richter	Australia	Chantaburi Horticultural Research Centre, Chanthaburi

ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที
 ดูดสารละลายส่วนสีเขียวใส (supernatant) ที่อยู่
 ส่วนบนออกมาใส่ในหลอดใหม่ เติมสารละลาย
 คลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลบิวทรานอล (chloroform
 : isoamylbutranol) อัตราส่วน 24 ต่อ 1 ปริมาตร
 500 ไมโครลิตร เขย่าขึ้นลงจนเข้ากันดี จากนั้น
 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที
 ดูดส่วนใส (aqueous phase) ที่ได้ใส่ในหลอดใหม่
 เติมโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate, pH 5.2)
 3 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเอทานอล
 95 % ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เอียงหลอด

ไปมาจะพบดีเอ็นเอที่ตกตะกอนนำไปปั่นเหวี่ยงที่
 ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เท
 สารละลายทิ้ง แล้วเติมเอทานอล 70 % นำไป
 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที ทำจนครบ
 3 ครั้ง คว่ำหลอดจนแห้งหมด แล้วเติม TE buffer
 (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มล., pH 8.0)
 และ RNase A 10 ไมโครกรัม/มล. ปริมาตร 50
 ไมโครลิตรลงในดีเอ็นเอ จากนั้นทำการบ่มที่
 อุณหภูมิ 30-35 °ซ เป็นเวลา 30-45 นาที แล้ว
 เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

3. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้เบื้องต้น

หาความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยการเปรียบเทียบ กับ Lamda/Hind III ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้น นำดีเอ็นเอไปแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 0.7 % ใน TBE buffer (Tris-acetate 40 มิลลิโมลาร์ boric acid 20 มิลลิโมลาร์ EDTA 2 มิลลิโมลาร์ pH 8.0) ใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 45-60 นาที แล้วนำเจลไปย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ 0.3 ไมโครกรัม/มล. เป็นเวลา 10-15 นาที และนำไปส่องใต้กล้องดูภายใต้แสง ultraviolet (320 นาโนเมตร) บันทึกภาพและเปรียบเทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้น

4. การขยายเพิ่มปริมาณ DNA

เทคนิค DAF ถูกพัฒนาโดย Bentley และ Bassam (1996) และถูกนำมาดัดแปลงใช้โดย Somsri และคณะ (1998) และ Somsri (1999) สุ่มไพรเมอร์ 10 mer (Operon technologies) ใช้แทนไพรเมอร์ 8 mer โดยมีการปรับอุณหภูมิ ลดหลั่นในแต่ละรอบ ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 25 นาโนกรัม มาขยายโดยทำปฏิกิริยาในสารละลาย 20 ไมโครลิตร ทำการสุ่มไพรเมอร์จำนวน 10 mer ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl (pH 8.3) 10 มิลลิโมลาร์ KCl 10 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ dNTPs 200 ไมโครโมลาร์ และเอ็นไซม์ AmpliTaq Stoffel Fragment (Perkin Elmer) 3 หน่วย ปฏิกิริยาถูกกระทำขึ้น

ภายในหลอด PCR ใน Perkin Elmer ขนาด 9,600 thermal cycler กระบวนการ thermocycling ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °ซ นาน 5 นาที จากนั้นจึงตามด้วย 35 รอบ ซึ่งประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที การ annealing ที่อุณหภูมิ 57 56 55 54 และ 53 °ซ เป็นเวลาอุณหภูมิละ 1 นาทีตามลำดับ จากนั้นจึงทำรอบสุดท้ายที่ 72 °ซ นาน 5 นาที

การขยายเพิ่มปริมาณแถบ DNA ใช้สารละลาย 2 ไมโครลิตรกับสารละลาย loading buffer 1 ไมโครลิตร (ยูเรีย 40 % (w/v), Ficoll 400 3 %, Tris (pH 7.5) 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 3 มิลลิโมลาร์, xylene cyanol 0.02 % (w/v), bromophenol blue 0.02 % (w/v)) โดยทำการแยกโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (PAGE) โดยใช้เครื่อง Mini-Protean II (Bio-Rad) และนำมาย้อมให้เห็นแถบ DNA ชัดเจนด้วยสารละลาย Silver Nitrate (Bassam *et al.*, 1991; Bentley and Bassam, 1996; Somsri, *et al.*, 1998; Somsri, 1999) โพลีอะครีลาไมด์เจลประกอบด้วย โพลีอะครีลาไมด์ 10 % (w/v) ยูเรีย 10 % (v/v) กลีเซอรอล 5 % ใน TBE buffer และเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการย้อมใช้เจลที่มีความหนา 0.5 มม. เกลบบนแผ่นฟิล์ม Gel Bond PAGE backing film (FMC Bio Products) ซึ่งให้ความสะดวกในการจัดการและการเก็บรักษา เจลถูกละลายโดยใช้ความต่างศักย์ 300 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที (Bio-Rad

3000Xi) ทำให้ดีเอ็นเอติดกับเจล ด้วยกรดอะซิติก 7.5 % (v/v) เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำกลั่น 2 นาที จำนวน 3 ครั้ง ย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต 0.01 % (w/v) ฟอรัมาดีไฮด์ 0.15 % เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 20 วินาที และย้อมเพื่อให้เกิดแถบด้วยไดโซเดียมคาร์บอเนต 3 % ฟอรัมาดีไฮด์ 0.3 % (v/v) และโซเดียมไฮโอซัลเฟต 0.02 % (w/v) จนกระทั่งย้อมติด (2-4 นาที) และหยุดการย้อมโดยการเติมกรดอะซิติกเย็น 7.5 % (v/v) 5 นาที ก่อนจะล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 5 นาทีเป็นขั้นตอนสุดท้าย ตากเจลด้วยลมให้แห้งหนึ่งคืน และเก็บอย่างถาวรในฟิล์ม ทั้งนี้มีโมเลกุลเครื่องหมาย มีขนาด 10 นาโนกรัม สำหรับโมเลกุลเครื่องหมาย ดีเอ็นเอของ pGEM เป็นตัวเทียบมาตรฐาน

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ binary matrix จากแถบ ดีเอ็นเอหากมีให้เห็นแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 1 หากไม่แสดงแถบมีค่าเท่ากับ 0 หลังจากนั้นทำการคำนวณหาค่าดัชนีความเหมือน โดยใช้วิธีการของ Nei และ Li (1979) และ NTSYS PC version 2.0 จากจำนวนแถบที่ปรากฏและสร้าง dendrogram โดยใช้วิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average (UPGMA) ด้วยโปรแกรม BioGene ver 99.03 (Vilber Loumat, France)

ผลการทดลองและวิจารณ์

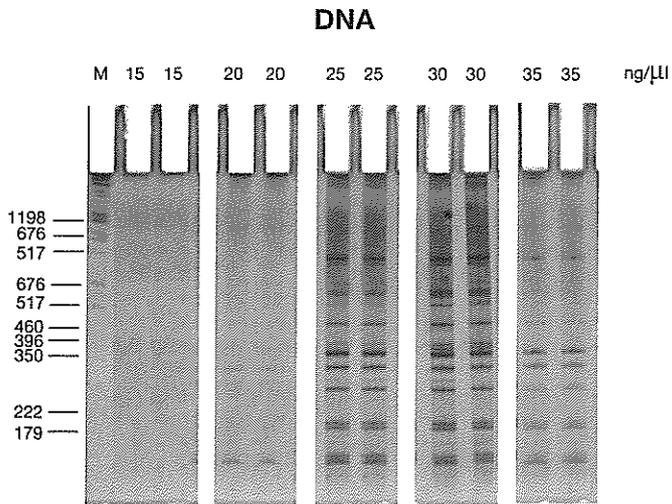
1. การศึกษาทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารประกอบต่างๆ ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase chain reaction: (PCR)

ได้ใช้สูตรสารละลายจาก Bentley และ Bassam (1996) โดยดัดแปลงปรับเปลี่ยน เฉพาะสารที่ต้องการทดสอบ นำมาสังเคราะห์ ดีเอ็นเอตามเทคนิค DAF ด้วยเครื่องควบคุม อุณหภูมิอัตโนมัติ เพื่อทดสอบหาสัดส่วนของ สารประกอบที่เหมาะสมได้ผลดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารประกอบต่าง ๆ ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาทดลองหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมตามเทคนิค DAF โดยการปรับความเข้มข้นของสารละลาย ดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้น 15 20 25 30 และ 35 นาโนกรัม/ไมโครลิตรอัตรา 2.5 ไมโครลิตร/สารละลาย 20 ไมโครลิตร แล้วนำมาเปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาด้วยวิธีโพลี อะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้โพลี อะครีลาไมด์เจล 10% ใน TBE buffer ผลปรากฏว่า สารละลายดีเอ็นเอที่ทุกระดับความเข้มข้นสามารถ สังเคราะห์ดีเอ็นเอตามเทคนิค DAF ได้ แต่ที่ ระดับความเข้มข้น 30 นาโนกรัม/ไมโครลิตรเกิด ปฏิกิริยาได้ดีที่สุด โดยที่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และสม่ำเสมอว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ (Figure 1a)

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาทดลองหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมตามเทคนิค DAF โดยใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 3 4 5 6 และ 7 มิลลิโมลาร์ ในแต่ละปฏิกิริยา โดยปรับปริมาตรของน้ำกลั่น ให้มีปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำมาเปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาด้วย วิธีโพลีอะครีลาไมด์



1a

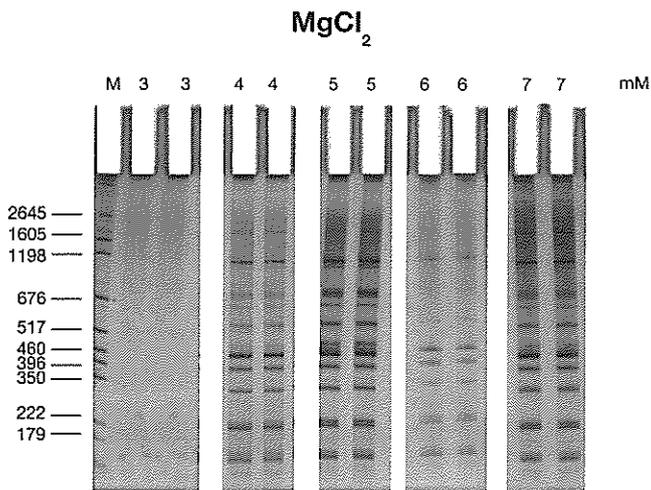
Figure 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of DAF-modified papaya DNA. DNAs were amplified using primer OPA 06 and separated on a 10% polyacrylamide gel as described in the methods.

Lane M : DNA size markers. base pair (bp)

1a: DNA with 15-35 ng/μl for DNA Amplification Fingerprinting (DAF)

1b: MgCl₂ 3-7 mM for DNA Amplification Fingerprinting (DAF)

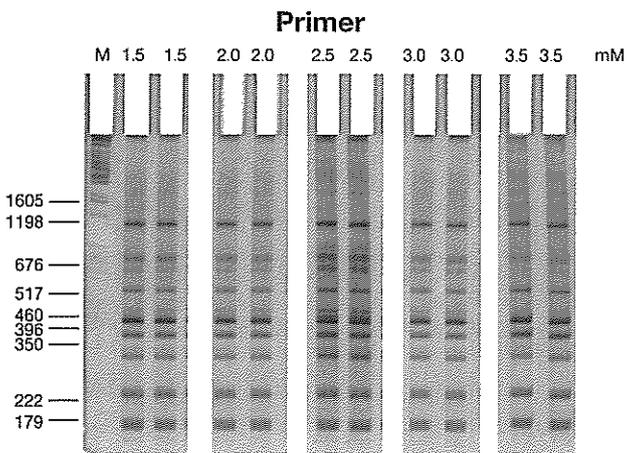
1c: Primer 1.5-3.5 mM for DNA Amplification Fingerprinting (DAF)



1b

เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้โพลีอะครีลาไมด์เจล 10% ใน TBE buffer ผลปรากฏว่าที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ ส่วนที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ โดยที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์นั้นเกิดแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนที่สุด (Figure 1b)

การทดลองที่ 1.3 การศึกษาทดลองหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมตามเทคนิค DAF โดยใช้ไพรเมอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 2.0 2.5 3.0 และ 3.5 มิลลิโมลาร์ในแต่ละปฏิกิริยา โดยปรับปริมาตรของน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร แล้วนำมาเปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาด้วยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้โพลีอะครีลาไมด์เจล 10% ใน TBE



1c

buffer ปรากฏว่าทุกระดับความเข้มข้นสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ แต่ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์นั้นสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุดโดยเกิดแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด (Figure 1c)

2. การจำแนกพันธุ์มะละกอ

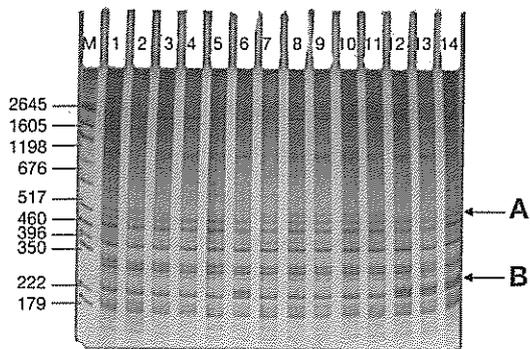
การทดลองที่ 2 ใช้ 11 ไพร์เมอร์ที่ถูกคัดเลือกสำหรับวิเคราะห์ DAF-PCR เพื่อจำแนกพันธุ์มะละกอ 14 พันธุ์ ได้จำนวนแถบทั้งหมด 129 แถบ โดยมีแถบที่มีความแตกต่างกัน 28 แถบคิดเป็น 21.71 % (polymorphism) มีขนาดแตกต่างกันระหว่าง 179 ถึง 2645 bp. (Tables 2, 3 and Figures 2a, 2b, 2c) โดยแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มแรกประกอบด้วยปากช่อง แยกดำ Mexico Mammy และแยกนวน กลุ่มที่สองประกอบด้วยโกโก้ก้านดำ แอปเปิล Tainung, แม่เหี้ยะ Florida Tolerant, Sunset และ Mexico Amerilla ในกลุ่มสุดท้ายประกอบด้วยไต้หวัน Kapoho Solo และ Richter โดยพันธุ์ Florida tolerant และ Sunset มีความใกล้เคียงกันที่ระดับ 99 % ขณะที่โกโก้ก้านดำ และแอปเปิล มีความใกล้เคียงกันที่ระดับ 97 % พันธุ์ไต้หวัน และ Kapoho Solo มีความใกล้เคียงกันที่ระดับ 97 % ส่วนพันธุ์ปากช่อง และแยกดำนั้นมีความใกล้เคียงกันที่ระดับ 96 % (Table 3 and Figure 3)

ในอดีตมีการกล่าววามะละกอเป็นพืชพื้นเมืองเขตร้อนของทวีปอเมริกา ได้แก่แถบประเทศเม็กซิโก หรืออเมริกากลาง ต่อมาพันธุ์มะละกอป่าและพันธุ์พื้นเมืองได้กระจายสู่ประเทศเขตร้อนอื่น ๆ โดยกะลาสีชาวสเปนและ

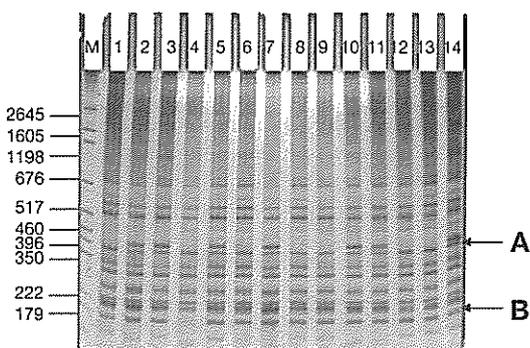
โปรตุเกส (Chandler, 1958) ในการศึกษาพบว่าสามารถแบ่งมะละกอ 14 พันธุ์ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ พันธุ์ปากช่องนั้นมีความใกล้เคียงกับพันธุ์แยกดำ ซึ่งได้รับการยืนยันว่าเป็นลูกผสมระหว่างแยกดำกับพันธุ์ Sunrise ของฮาวาย (สิริกุล, 2542) มะละกอไทยได้แก่พันธุ์ แยกดำ แยกนวน ปากช่องอยู่ในกลุ่มเดียวกับพันธุ์ Mexico Mammy ส่วนพันธุ์โกโก้ก้านดำ แม่เหี้ยะ อยู่ในกลุ่มเดียวกับพันธุ์แอปเปิล (Apple) Tainung Florida Tolerant, Sunset และ Mexico Amerilla แสดงว่าพันธุ์มะละกอไทยน่าจะมีต้นกำเนิดมาจากทวีปอเมริกากลางนั่นเอง โดยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันระดับ 91 % ขึ้นไป (Table 3 and Figure 3) ซึ่ง Stiles และคณะ (1993) รายงานว่ามะละกอพันธุ์ต่าง ๆ ที่อยู่ในชนิดเดียวกันของ *Carica papaya* จะมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงระหว่าง 70-95%

ขณะที่พืชสกุลมะละกอในวงศ์ Caricaceae ระหว่าง *C. papaya* กับ *Carica* ชนิดอื่น ๆ จะมีความใกล้เคียงกันระหว่าง 25-48% *C. microcarpa* กับ *C. goudotiana* มีความใกล้เคียงที่ระดับ 25 % *C. microcarpa* กับ *C. monoica* มีความใกล้เคียงที่ระดับ 68% และ *C. stipulata* กับ *C. pubescens* มีความใกล้เคียงที่ระดับ 71% (Sharon et al., 1992) และในการทดลองนี้ *C. papaya* ระหว่างพันธุ์ต่าง ๆ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความใกล้เคียงอยู่ระหว่าง 91 ถึง 99 % (Table 3) ดังนั้นการจำแนกพันธุ์มะละกอโดยใช้เทคนิค DAF น่าจะเป็นที่ยอมรับได้

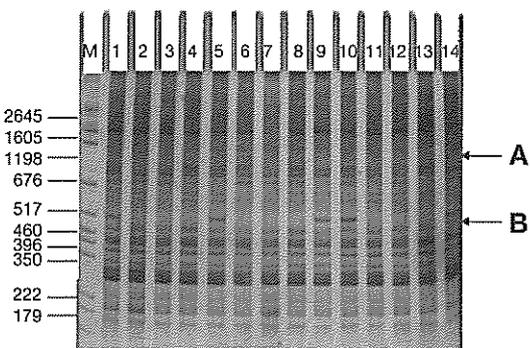
นอกจากนี้ Stiles และคณะ (1993) ได้



2a



2b



2c

Figure 2. Polyacrylamide gel of DAF-modified papaya DNA. DNA from each of the fourteen papaya cultivars as described in the methods. The cultivar number corresponds to the cultivars showed in Table 3.

Lane M : DNA size markers. A and B are polymorphism.

1=Pak Chong, 2=Cocoa Karn Dum, 3=Apple, 4=Taiwan, 5=Mexico Mammy, 6=Tainung, 7=Khaeg Dum, 8=Mae Hia, 9=Florida Tolerant, 10=Khaeg Nuan, 11=Mexico Amerila, 12=Kapoho Solo, 13=Sunset, 14=Richter

2a: Primer OPA 04 and separated on a 10% polyacrylamide gel

2b: Primer OPC 10 and separated on a 10% polyacrylamide gel

2c: Primer OPS 10 and separated on a 10% polyacrylamide gel

รายงานว่าการจำแนกพันธุ์มะละกอ 10 พันธุ์ โดยเทคนิค RAPD พบว่าพันธุ์ที่มาจากแหล่งพันธุ์ฮาวายด้วยกันมีความใกล้ชิดกันระหว่าง 70-95 % และพบว่าพันธุ์ Sunset และพันธุ์ Sunrise มีกำเนิดมาจากลูกผสมชั่วที่ 2 เหมือนกัน โดยพบว่าพันธุ์ Sunset มีความใกล้ชิดกับพันธุ์ Florida tolerant ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพันธุ์พ่อแม่มาจากแหล่งพันธุ์ฮาวายเหมือนกัน

การศึกษานี้พบว่าไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือกทั้ง 11 ไพรเมอร์ แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) ได้ดีคือไพรเมอร์ OPA-04, OPA-08, OPB-05, OPB-09, OPC-03, OPC-05, OPC-06, OPC-10, OPE-17, OPG-10 และ OPS-10 โดยผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากใบมะละกอที่เป็นใบอ่อนกับใบแก่เต็มที นั้น จะพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อนจากยอดอ่อน

Table 2. Synthetic deoxyribonucleotides used as primer for amplification of papaya DNA

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	No of scorable bands	No polymorphic bands	Polymorphic bands (%)
OPA 04	AAT CGG GCTG	10	3	30
OPA 08	GTG ACG TAGG	12	3	25
OPB 05	TGC GCC CTTC	14	5	36
OPB 09	TGG GGG ACTC	9	2	22
OPC 03	GGG GGT CTTT	16	3	19
OPC 05	GAT GAC CGCC	14	3	21
OPC 06	GAA CGG ACTC	8	2	25
OPC 10	TGT CTG GGTG	11	2	18
OPE 17	CTA CTG CCGT	8	1	13
OPG 01	CTA CGG AGGA	15	2	13
OPS 10	ACC GTT CCAG	12	2	17
Total		129q	28	21.71

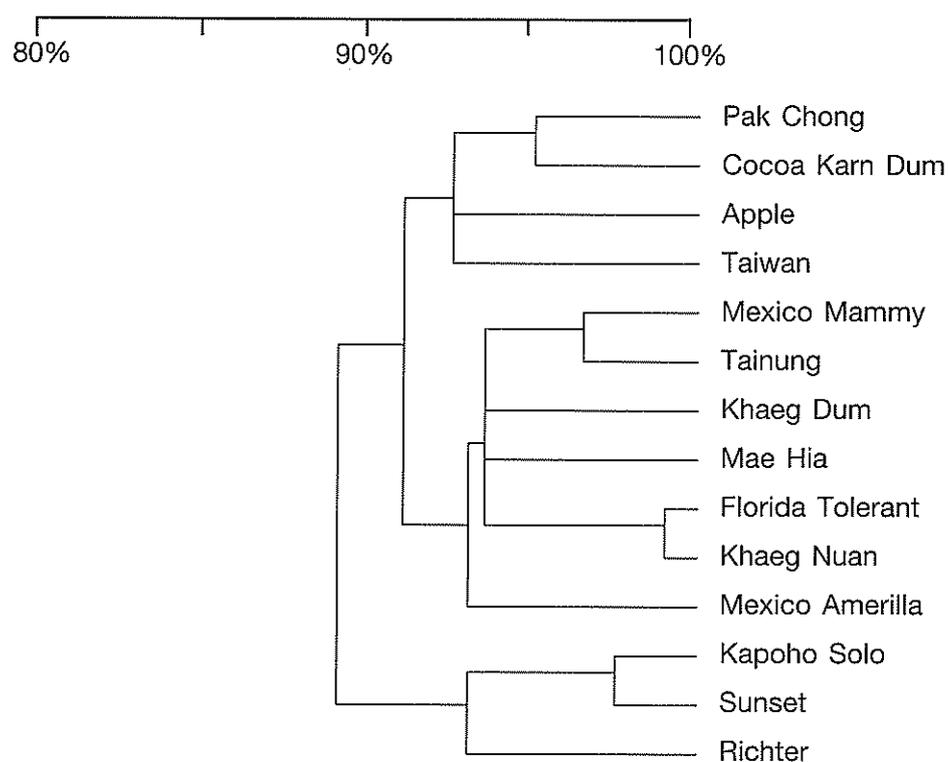


Figure 3. Dendrogram of papaya cultivars as determined from 129 DAF fragment. The pair-wise coefficients of correlation (Table 3) were clustered using UPGMA and assembled into the dendrogram as described in the method.

ของต้นมะละกอจะให้แถบที่ชัดเจนดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับ Eiadthong และคณะ (1998) ซึ่งได้รายงานไว้ว่าการสกัดดีเอ็นเอจากมะม่วงโดยใช้ใบอ่อนสามารถแสดงแถบดีเอ็นเอได้ดีกว่าใบแก่ที่ขยายใบเต็มที่ อย่างไรก็ตาม Somsri (1999) ได้กล่าวไว้ว่าไม่มีความแตกต่างในรูปแบบของแถบในใบมะละกอที่เจริญเติบโตเต็มที่กับใบอ่อนยกเว้นในพันธุ์โกโก้ กับเทคนิค isozyme ด้วยเอ็นไซม์

PGM ทั้งนี้ Trigiano และ Caetano-Anolles (1998) พบว่าใบอ่อนที่ยังไม่ขยายเต็มที่ที่เป็นใบที่มีเนื้อเยื่อสีเขียวอ่อนซึ่งเมื่อเก็บในช่วงเช้าตรู่ก่อนที่ใบจะทำการสะสมอย่างเต็มที่นั้น เหมาะที่สุดในการนำมาสกัดดีเอ็นเอ ส่วนจรัสศรีและสุวิมล (2543) ได้รายงานว่าการใช้สารละลาย CTAB Buffer นั้นให้ปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใบพืชสกุลกลางสาตได้ดีที่สุด (*Lansium sp.*) สำหรับใน

Table 3. Simple matching coefficients of similarity determined from analysis using 11 different primers that amplified 129 distinct products. Coefficients are calculated by dividing the sum of the common amplification products present and absent between the cultivars being compared by the total number of fragments observed.

	Pak Chong	Cocoa Karn Dum	Apple	Taiwan	Mexico Mammy	Tainung	Khaeg Dum	Mae Hia	Florida Tolerant	Khaeg Nuan	Mexico Amerilla	Kapoho Solo	Sunset	Richter
Pak Chong	1.00	0.96	0.96	0.92	0.96	0.94	0.96	0.96	0.95	0.95	0.94	0.95	0.95	0.95
Cocoa Karndum		1.00	0.97	0.94	0.95	0.97	0.97	0.96	0.96	0.94	0.95	0.94	0.97	0.95
Apple			1.00	0.92	0.94	0.94	0.96	0.97	0.96	0.95	0.96	0.93	0.98	0.94
Taiwan				1.00	0.96	0.96	0.93	0.92	0.93	0.91	0.92	0.97	0.92	0.96
Mexico Mammy					1.00	0.95	0.95	0.94	0.94	0.94	0.94	0.91	0.97	0.95
Tainung						1.00	0.96	0.94	0.95	0.91	0.96	0.95	0.95	0.95
Khaeg Dum							1.00	0.95	0.97	0.93	0.96	0.94	0.97	0.96
Mae Hia								1.00	0.96	0.95	0.96	0.93	0.98	0.96
Florida Tolerant									1.00	0.92	0.95	0.93	0.99	0.95
Khaeg Nuan										1.00	0.93	0.93	0.93	0.93
Mexico Amerilla											1.00	0.92	0.95	0.95
Kapoho Solo												1.00	0.93	0.97
Sunset													1.00	0.95
Richter														1.00

การศึกษานี้พบว่าสารละลาย CTAB buffer เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอกับใบมะละกอ

3. การศึกษาไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบเพศในมะละกอลูกผสมชั่วที่ 1 ในระยะต้นกล้า

การทดลองที่ 3 ทำการศึกษาไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับจำแนกความแตกต่างระหว่างเพศมะละกอทั้งสามเพศของมะละกอลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างต้นมะละกอต้นกระเทยพันธุ์แขกดำ กับต้นตัวผู้พันธุ์ Richter แล้วทำการรวม (bulk) ดีเอ็นเอของใบจากต้นเพศกระเทย เพศผู้ และเพศเมียอย่างละ 8 ต้นด้วยไพรเมอร์ 52 ไพรเมอร์ ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ในกลุ่ม OPA ได้แก่ ไพรเมอร์ OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-11, OPA-12, OPA-13, OPA-14 และ OPA-20 จำนวน 12 ไพรเมอร์ กลุ่ม OPB ได้แก่ ไพรเมอร์ OPB-01 – OPB-07 จำนวน 7 ไพรเมอร์ กลุ่ม OPC ได้แก่ ไพรเมอร์ OPC-01 - OPC-20 จำนวน 20 ไพรเมอร์และ กลุ่ม OPF ได้แก่ ไพรเมอร์ OPF-01 - OPF-06 และ OPF-14 - OPF-20 จำนวน 13 ไพรเมอร์ ได้แสดงผลการทดสอบ โดยพบว่าสามารถแยกไพรเมอร์ออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มแรกเป็นไพรเมอร์ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศของมะละกอได้ คือเป็นไพรเมอร์ที่ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (monomorphism) ระหว่างมะละกอทั้งสามเพศ ซึ่งกลุ่มของไพรเมอร์ OPA นั้น พบว่าให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันจำนวน 128 แถบ กลุ่ม OPB จำนวน 72 แถบ กลุ่ม OPC จำนวน 218 แถบ และกลุ่ม OPF จำนวน 127

แถบ ส่วนไพรเมอร์กลุ่มที่สอง คือไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของเพศมะละกอทั้งสามเพศได้ ซึ่งมีเพียงไพรเมอร์เดียวคือไพรเมอร์ OPA-06 มีลำดับเบส 5'GGTCCCTGAC 3' ซึ่งไพรเมอร์นี้ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเพศของมะละกอทั้งสามเพศ (polymorphism) โดยในต้นสมบูรณเพศ (กระเทย) จะเกิดแถบดีเอ็นเอที่ระดับ 365 คู่เบส (base pair) และต้นเพศผู้จะเกิดแถบที่ระดับ 360 คู่เบส ส่วนในต้นเพศเมียนั้นจะไม่เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งสองระดับ (Figure 4)

4. การทดสอบไพรเมอร์ที่คาดว่าจะสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างเพศทั้งสามได้กับมะละกอพันธุ์ต่าง ๆ และลูกผสมชั่วที่ 1 2 3 และ 4

การทดลองที่ 4 นำไพรเมอร์ OPA-06 ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพความถูกต้องในการจำแนกเพศกับต้นมะละกอพันธุ์ Richter จำนวน 39 ต้น Sunset จำนวน 4 ต้น แขกดำศรีสะเกษ จำนวน 2 ต้น แขกดำภูเรือจำนวน 10 ต้น แขกดำตราดจำนวน 4 ต้น และลูกผสมระหว่างพันธุ์ Richter และ Sunset (F1-B4xSS5, F2-B6xSS6-15-7, F2-G6-97-2, F2-G6-91A-15, F3-G6-69-1-24, F3-G5-93-2-17-9, F3-G5-93-2-18-10, F4-RA205-17-9, F4-RA205-5-9, F4-RA205-1-9, F4-RA317-4-9, F4-RA317-4-12 และ F4-RA317-4-13) ลูกผสมระหว่างพันธุ์ Richter และแขกดำ (F4-P31-2-11-3) ลูกผสมระหว่างพันธุ์ 2.001 กับ Sunset (F4-TS177-2-7, F4-TS177-4-8, F4-TS119-2-1-11 และ F4-TS179-1-14)

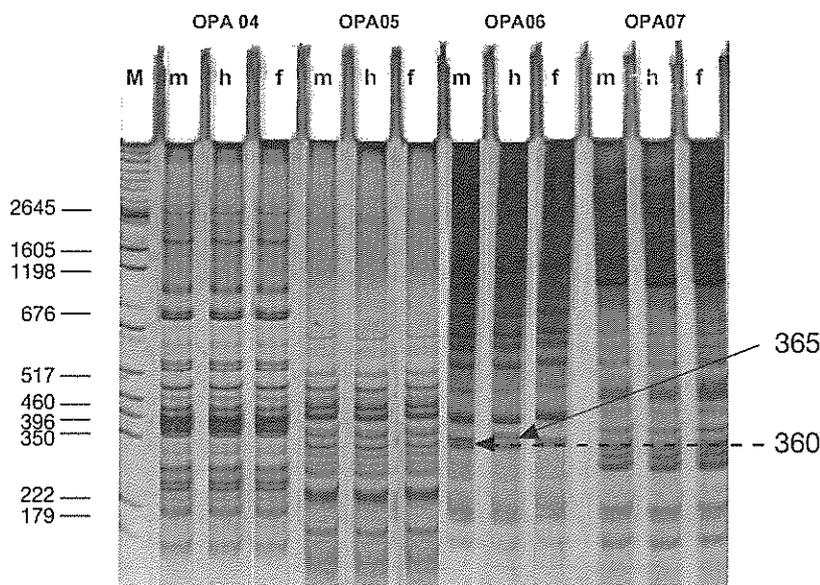


Figure 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of papaya DNA. DAF amplification of OPA04, OPA05, OPA06 and OPA07 using for sex identification in papaya by DNA Amplification Fingerprinting (DAF) of Khaeg Dum papaya

Lane M: DNA size markers. male (m), hermaphrodite (h) and female (f)

ลูกผสมระหว่างพันธุ์ (Richter x แหกดำ) x Sunset (F1-P31-2 x SS2-1) และลูกผสมระหว่าง แหกดำ และ Florida (ท่าพระ 2) รวมทั้งสิ้น 254 ต้น และนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับเพศของ ต้นมะละกอจริงที่ปลูกในแปลงทดลอง (Table 4, Figure 5) พบว่าไพรเมอร์ OPA-06 สามารถ จำแนกความแตกต่างของมะละกอทั้งสามเพศได้ ถูกต้องจำนวน 224 ต้นคิดเป็น 88.18% ตรวจสอบผิดพลาดจำนวน 26 ต้น และไม่สามารถ ตรวจสอบได้เนื่องจากไม่ปรากฏแถบที่ระดับดังกล่าวจำนวน 4 ต้น ส่วนที่ผิดพลาดหรือไม่ สามารถให้แถบดีเอ็นเอได้นั้นสาเหตุส่วนหนึ่ง อาจเกิดจากการ crossing over ทำให้ในขั้นตอนของการทำพีซีอาร์เกิดความผิดพลาดได้

5. การตรวจสอบความแม่นยำของไพรเมอร์ ในการจำแนกเพศต้นมะละกอที่ได้จากการเพาะ เลี้ยงเนื้อเยื่อ

การทดลองที่ 5 นำไพรเมอร์ OPA-06 มาทำการทดสอบกับมะละกอพันธุ์แหกดำสายต้น (accession) ต่างๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยมะละกอทั้งหมดมาจากต้นสมบูรณ์เพศ (กระเทย) เพื่อทดสอบความถูกต้องแม่นยำของ ไพรเมอร์ รวมทั้งสังเกตความแปรปรวนที่อาจ เกิดขึ้น ซึ่งใช้มะละกอทั้งสิ้น 47 ต้น พบว่า สามารถตรวจสอบเพศของมะละกอได้ถูกต้อง แม่นยำทั้ง 47 ต้น คิดเป็น 100 % และไม่พบ ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) ที่ตำแหน่งอื่น (Figure 6a, 6b)

Table 4. Testing of primer OPA 06 with papaya cultivars and F1, F2, F3, F4 hybrids

Cultivars/Hybrids	Correct	Not correct	No band	No of plants
Richter	37	2	-	39
Sunset	4	-	-	4
KD(Sri Sa Ket)-6-2	2	-	-	2
KD(Phu Rua)-15-1	9	1	-	10
KD(Trat)-8-1	4	-	-	4
TP2-2-6	1	1	-	2
F1-B4xSS5	15	-	-	15
F1-P31-6 x SS2-1	1	-	-	1
F2-B6xSS6-15-7	1	-	-	1
F2-G6-97-2	14	1	-	15
F2-G6-91A-15	12	3	-	15
F3-G6-69-1-24	14	-	-	14
F3-G5-93-2-17-9	16	3	1	20
F3-G5-93-2-18-10	3	2	-	5
F4-RA205-17-9	4	-	-	4
F4-RA205-5-9	16	3	-	19
F4-RA205-1-9	5	1	-	6
F4-RA317-4-9	15	3	-	18
F4-RA317-4-12	13	2	3	18
F4-RA317-4-13	11	4	-	15
F4-TS177-2-7	3	-	-	3
F4-TS177-4-8	5	-	-	5
F4-TS119-2-1-11	9	-	-	9
F4-TS179-1-14	1	-	-	1
F4-P31-2-11-3	9	-	-	9
Total	224	26	4	254
Accuracy (%)				88.18

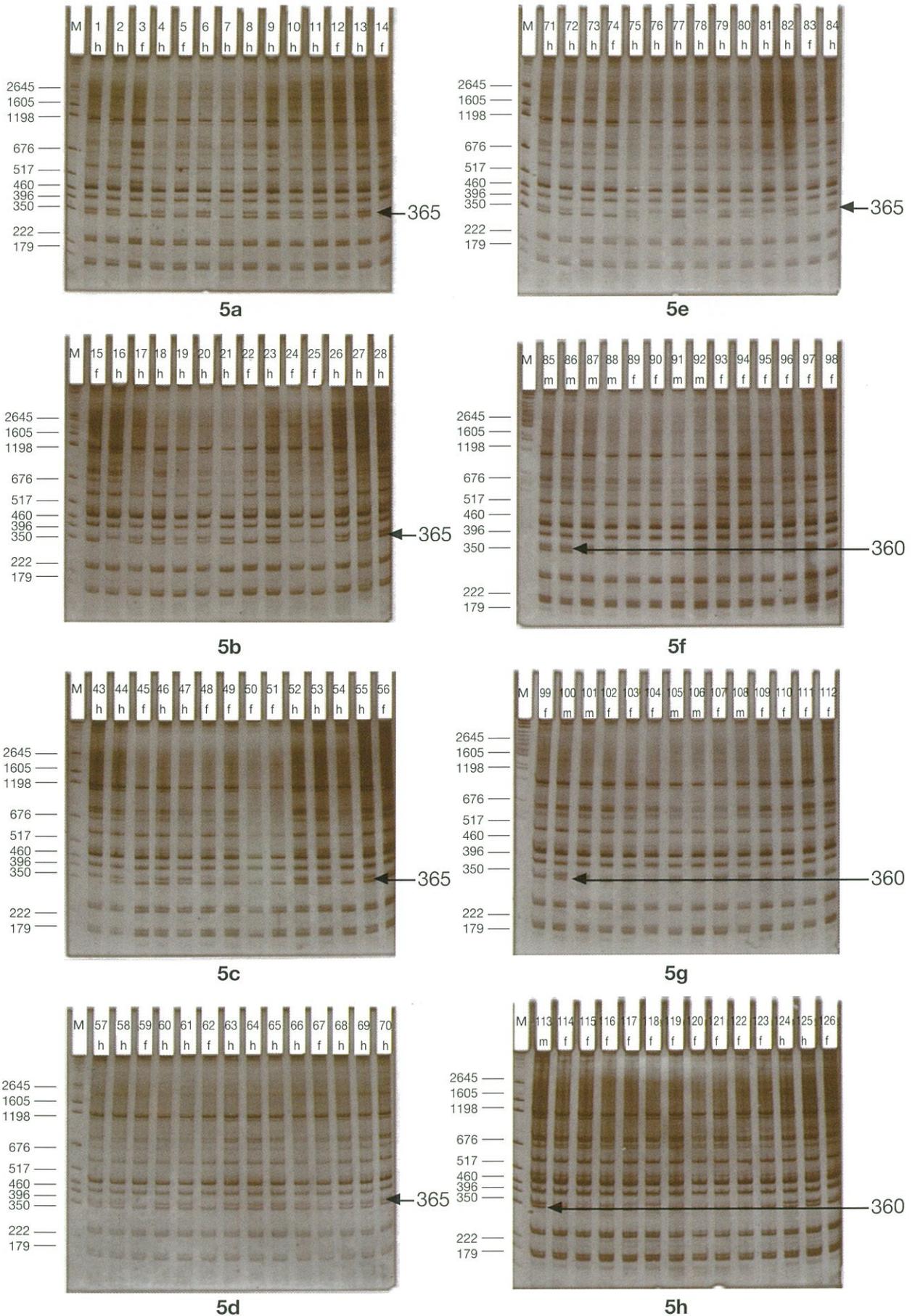


Figure 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of papaya DNA. DAF amplification using OPA06 in some cultivars and lines

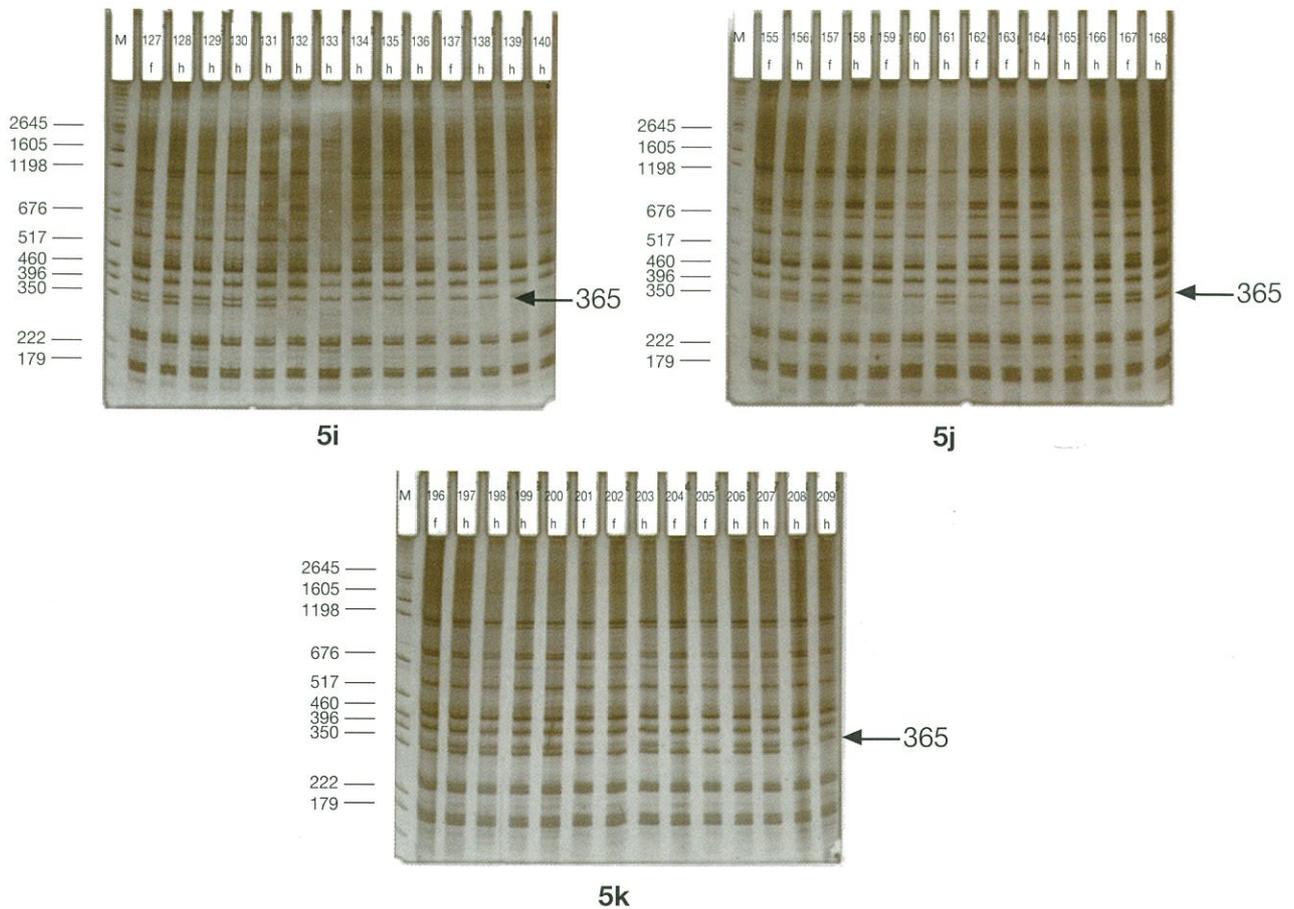


Figure 5. (continue)

Lane M : DNA size markers and number above each lane corresponded to the following cultivars

m = male f = female h = hermaphrodite

5a	lane 1-14	= F1-B4 x SS5
5b	lane 15-28	= F3-G5-93-2-17-9
5c	lane 45-56	= F2-G6-97-2
5d-5e	lane 60-73	= F3-G6-69-1-24
5e	lane 76-84	= F4-P31-2-11-3
5f-5g	lane 85-112	= Richter
5h	lane 124-125	= Khaeg Dum Sri Sa Ket -6-2
5h-5i	lane 126-127	= Ta Pha 2 2-6
5i	lane 128-131	= Khaeg Dum Tart 8-1
5i	lane 132-140	= Khaeg Dum Phu Rua 15.1
5j	lane 157-160	= F4-RA317-4-9
5j	lane 161-165	= F4-RA317-4-12
5j	lane 166-168	= F4-RA205-5-9
5k	lane 196	= F4-TS179-1-14
5k	lane 197-199	= F4-TS177-2-7
5k	lane 200-207	= F4-TS119-2-1-11
5k	lane 208-209	= F4-P31-2-11-3

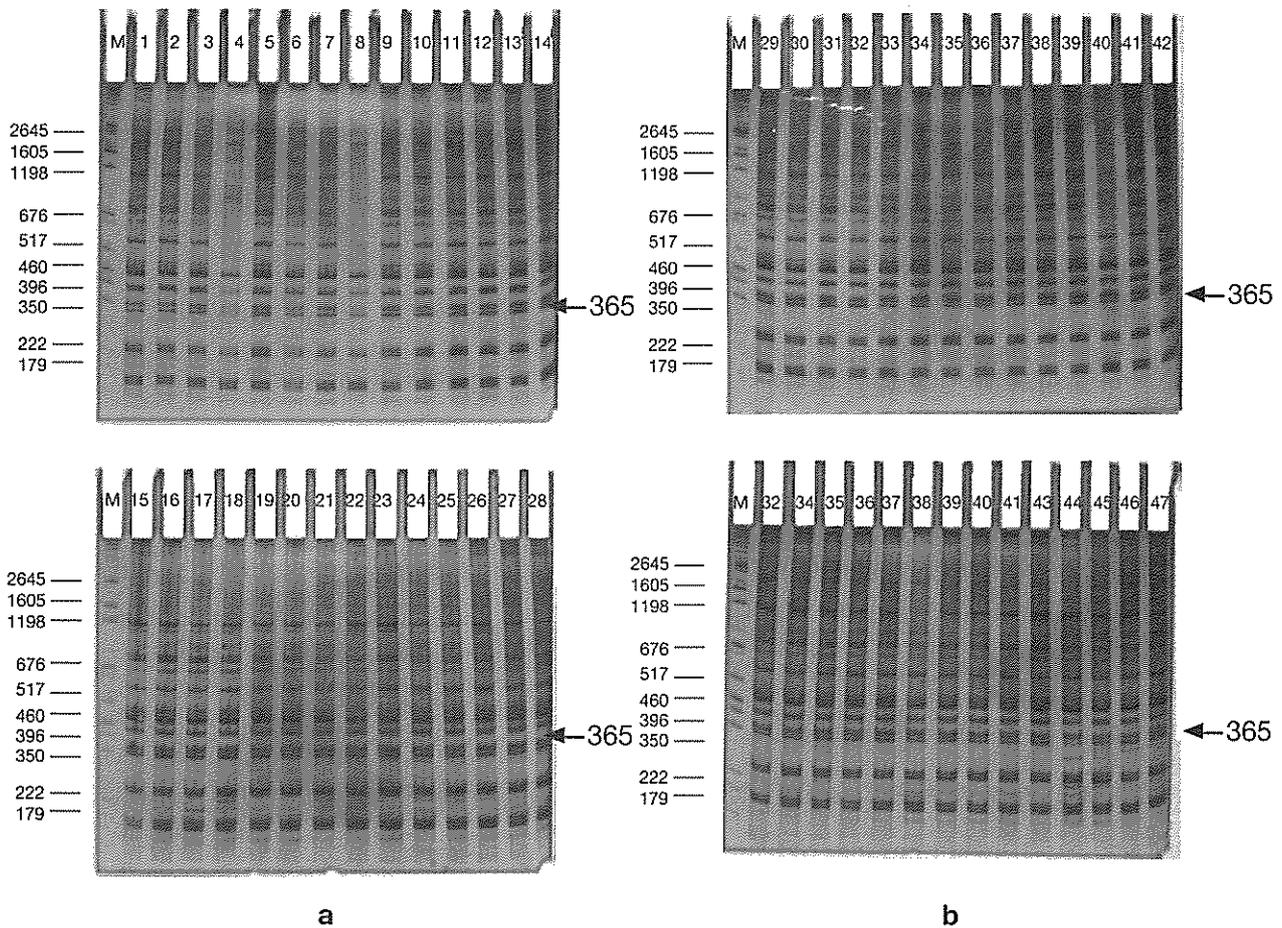


Figure 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of papaya DNA. DAF amplification using OPA06 with hermaphrodite Khaeg Dum derived from tissue culture.

Lane M: DNA size markers

6a: Lane 1 – 28 6b: Lane 29 – 47

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค DAF มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการจำแนกพันธุ์ และศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุ์มะละกอต่าง ๆ ที่นำเชื้อดีเอ็นเอ มีประสิทธิภาพโดยใช้ไพรเมอร์ปริมาณน้อย ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและสามารถจำแนกเพศมะละกอในระยะต้นกล้าของพันธุ์ต่างๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการผลิตและการปรับปรุงพันธุ์ และนอกจากนี้

อาจใช้ในการจำแนกลักษณะเฉพาะบางประการ เช่น สีดอก สีก้านดอก สีเนื้อ ความหนาเนื้อ ความหวาน อายุเก็บเกี่ยว เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาหาความเข้มข้นของสารประกอบที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามเทคนิค DAF พบว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ที่เหมาะสมเท่ากับ 30 นาโนกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของโพรีเมอร์ที่เหมาะสมเท่ากับ 2.5 ไมโครโมลาร์

2. เทคนิค DAF สามารถจำแนกพันธุ์มะละกอทั้ง 14 พันธุ์ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่งประกอบด้วย ปากช่อง แขกดำ Mexico Mammy และ แขนกนวล กลุ่มที่สองประกอบด้วย โกไก่ก้านดำ แอปเปิล Tainung แม่เหียะ Florida Tolerant Sunset และ Mexico Amerilla และกลุ่มสุดท้ายประกอบด้วยได้หวัน Kapoho Solo และ Richter

3. การคัดเลือกโพรีเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศของมะละกอทั้งสามเพศจากการใช้โพรีเมอร์จำนวน 52 โพรีเมอร์ พบว่ามีเพียงโพรีเมอร์เดียวที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างเพศของมะละกอทั้งสามได้ คือ โพรีเมอร์ OPA-06 ซึ่งมีลำดับเบส 5' GGTCCTGAC 3'

4. การทดสอบประสิทธิภาพความถูกต้องของโพรีเมอร์ OPA-06 กับมะละกอพันธุ์ต่างๆและลูกผสมชั่วที่ 1 2 3 และ 4 จำนวน 254 ต้น พบว่าสามารถตรวจสอบเพศได้ถูกต้อง 224 ต้น คิดเป็น 88.18 %

5. การทดสอบประสิทธิภาพความถูกต้องของโพรีเมอร์ OPA-06 กับมะละกอแขกดำต้นสมบูรณเพศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 47 ต้น พบว่าสามารถตรวจสอบเพศได้ถูกต้อง 100 % และไม่มีความแปรปรวนของแถบดีเอ็นเอ

เอกสารอ้างอิง

- จรัสศรี นวลศรี และสุวิมล กลศึก. 2543. การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA) ในพืชสกุลกลางสาด. *วารสารสงขลานครินทร์ ฌบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 22 (4) : 403-410.
- สุนันท์ทิพย์ บุษบากรกุล. 2547. *การใช้เทคนิค DNA Amplification Fingerprinting ในการแยกเพศมะละกอ (Carica papaya L.)* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 84 หน้า.
- สิริกุล วะลี. 2542. *มะละกอ*. สำนักพิมพ์ J. Film Process. กรุงเทพฯ . 45 หน้า.
- Allan, P. 1963. Pollination of pawpaws. *Farm South Africa* 8: 13-15.
- Arkle, T.D.Jr. and H.Y. Nakasone, 1984. Floral differentiation in the hermaphrodite papaya. *J. Hort. Sci.* 19: 832-834.
- Bassam, B.J. and Bentley, S. 1994. DNA fingerprinting using Arbitrary Primer Technology (APT): A tool or torment? *Australasian Biotechnology* 4: 232-236.
- Bassam, B.J., G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 80: 81-84.
- Bentley, S. and B.J. Bassam. 1996. A robust

- DNA amplification fingerprinting system applied to analysis of genetic variation within *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *J. Phytopathology* 144: 207-213.
- Bussabakornkul, S. 2003. *Identification of some papaya cultivars by DNA amplification fingerprinting (DAF)*. Special Problem, Kasetsart University. 24 p.
- Caetano-Anolles, G., B.J. Bassam and P.M. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligo-nucleotide primers. *Bio/Technology* 9: 553-557.
- Chandler, W.H. 1958. *Evergreen Orchards*. Lea and Febiger, Philadelphia. 490 p.
- Eiadthong, W., K. Yonemori, A. Sugiura, N. Utsunomiya and S. Subhadrabandhu. 1998. Isozyme polymorphisms of mango cultivars in Thailand. *Thai J. Agric. Sci.* 31(4): 555-568.
- Graham G.C., Mayers P., and R.J. Henry, 1994. A simple and rapid method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *BioTechniques* 16: 48-50.
- Gupta, S. K. 1989. Sibmate papaya for obtaining breeders seed. *Indian Horticulture* 36(3): 16-19.
- Hamilton, R. A. and P. Ito. 1968. 'Sunrise Solo' a Different Colored Solo Papaya. Hawaii Agricultural Experiment Station Circ. USA. 69 p.
- Hofmeyr, J. D. J. 1938. Determination of sex in *Carica papaya* L. *Farm South Africa* 13: 332.
- Manshardt R. M. 1992. Papaya. Pages 489-511. *In: Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. Hammeschlag F.A. and Litz R.E. (eds.), CAB International, U.K.
- Nakasone, H.Y., Crozier, J. A. Jr. and D. K. Ikehara. 1972. *Evaluation of 'Waimanalo', a New Papaya Strain*. Hawaii Agricultural Experiment Station. Technical. Bulletin. 79 p.
- Nei, M and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 76 : 5269-5273.
- Prest, R.L. 1955. Unfruitfulness in pawpaw. *Queensl. Agric. J.* 81 : 144-148.
- Ranganna, S. 1977. *Manual of Analysis of Fruit and Vegetable Products*. Tata McGrae Hill Publ, New Delhi. 126 p.
- Rao, O.P., Singh, R.N. and B.P. Singh. 1985. Sex identification in papaya through colorimetric tests and morphological characters of leaf petiole. *Progressive Horticulture* 17(4): 340-346.
- Sharon, D., J. Hillel, A. Vainstein and U. Lavi. 1992. Application of DNA fingerprinting for identification and genetic analysis of *Carica papaya* and other *Carica* species. *Hort. Science.* 14(4) : 689-694.
- Somsri, S. 1999. *Improvement of papaya*

- (*Carica papaya* L.) for south-east Queensland : investigation of sex-type and fruit quality. Ph.D. thesis. University of Queensland, Gatton College, Queensland, Australia. 260 p.
- Somsri, S., R.J. Fletcher, M. Jobin, R. Drew W. Lawson and M.W. Graham. 1998. Developing molecular markers for sex prediction in papaya (*Carica papaya* L.) *Acta Hort.* 461 : 141-148.
- Sondur, S.N., Manshardt, R.M. and J.I. Stiles. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 547-553.
- Stiles, J.I., C. Lemme, S. Sondur, M.B. Morshidi and R. Manshardt. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 697-701.
- Storey, W.B. 1938. Segregation of sex types in Solo papaya and their application to the selection of seed. *Proceedings of the American Society for Hort. Sci.* 35: 83-85.
- Storey, W.B. 1953. Genetics of the papaya. *J. of Heredity* 44: 70-78.
- Storey, W.B. 1969. Papaya (*Carica papaya* L.). pages 39-407 In: *Outline of Perennial Crop Breeding in the Tropics*. Ferwerda, P. and F. Wit. (eds.). H. Veenman and Zonen, Wageningen.
- Storey, W.B. 1976. Papaya. Pages 21-24. In: *Evolution of Crop Plants*. Simmonds N.W. (ed.). Longman Inc., New York.
- Trigiano, R.N. and G. Caetano-Anolles. 1998. Laboratory exercises on DNA amplification fingerprinting for evaluating the molecular diversity of horticultural sciences. *Hort. Tech.* 8(3) : 413-423.
- Vos, P., Hogers, R., Bleake, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Freitjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kulper, M. and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Welsh J., and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.