ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสับปะรด โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR

Genetic Diversity and DNA Fingerprint of Pineapple (*Ananas comosus*) Using SSR Markers

สุภาวดี ง้อเหรียญ[1/*] จีราพร แก่นทรัพย์[1/] วิภาวี ชั้นโรจน์[1/] มัลลิกา นวลแก้ว[2/]

Suphawadee Ngorian[1/*] Jeeraporn Kansup[1/] Vipavee Chanroj[1/] Mallika Nuankaew[2/]

Received 22 Feb. 2024/Revised 28 Mar. 2024/Accepted 3 Apr. 2024

ABSTRACT

The research and development of pineapple varieties in order to obtain good yield and quality, resistance to disease and insects, breeders need to have sufficient information about breed varieties and their genetic diversity to make a decision on selecting appropriate parents. This research aimed to assess the genetic diversity and analyse a cluster of 57 pineapple cultivars/lines from DOA germplasm collection using 20 fluorescent-labeled SSR markers, was conducted from October 2021 to September 2023. Results showed that all 20 SSR markers were able to differentiate genetically among pineapple cultivars/lines used in this experiment, generating a polymorphic allele in total of 105 alleles varying from 3 to 9 alleles per locus, with an average of 5.3 alleles per locus. All of 105 alleles showed that the polymorphic bands accounted for 100%. The sizes of DNA fragments ranged from 94 to 400 base pairs. The Polymorphism Information Content (PIC) value ranged from 0.44 to 0.67, with an average of 0.59. Cluster analysis based on UPGMA and genetic relationships using NTSYSpc version 2.10e showed similarity coefficient value in range of 0.50 to 1.00, and revealed 5 distinct groups, consistent with pedigree and the grouping of cultivars/lines based on morphological characteristics, with a cophenetic correlation (r) of 0.85. Therefore, SSR markers used in this study were appropriate to identify the genetic differences between pineapple cultivars/lines and the uniqueness of the cultivars in this experiment. Besides, the genetic diversity database of pineapples is useful for parental selection in pineapple breeding programs.

Keywords: *Ananas comosus*; genetic diversity; SSR marker; DNA fingerprint

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[1/] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

[2/] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี กรมวิชาการเกษตร อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี 76120

[2/] Phetchaburi Agricultural Research and Development Center, Department of Agriculture, Cha-am, Phetchaburi 76120, Thailand

*** Corresponding author: fringer_1234@yahoo.com**

บทคัดย่อ

การวิจัยและพัฒนาพันธุ์สับปะรดเพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีผลผลิตและคุณภาพที่ดี ทนทานต่อโรคและแมลงนักปรับปรุงพันธุ์จำเป็นต้องทราบข้อมูลด้านพันธุ์ และข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ เพื่อการตัดสินใจคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรดของกรมวิชาการเกษตร จำนวน 57 สายพันธุ์/พันธุ์ ดำเนินการวิจัยระหว่างเดือน ต.ค. 2564 – ก.ย. 2566 โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR (simple sequence repeat) ที่ติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ จำนวน 20 คู่ไพรเมอร์ ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 20 คู่ไพรเมอร์ สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรดได้ดี พบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด 105 อัลลีล มีอัลลีลต่อตำแหน่ง 3 – 9 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 5.3 อัลลีล/ตำแหน่ง อัลลีลที่พบทั้งหมดแสดงความแตกต่างกันคิดเป็น 100% แถบดีเอ็นเอ มีขนาดตั้งแต่ 94 – 400 คู่เบส มีค่า PIC (polymorphism information content) อยู่ระหว่าง 0.44 – 0.67 หรือเฉลี่ย 0.59 เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.10e พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.50 – 1.00 สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสับปะรดได้เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับประวัติพันธุ์และการจัดกลุ่มพันธุ์ตามลักษณะสัณฐานวิทยา โดยมีค่า cophenetic correlation (r) 0.85 แสดงว่า มีการจัดกลุ่มได้ในระดับที่ดีและมีความแตกต่างอย่างชัดเจน จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์สับปะรด เพื่อระบุเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์สับปะรดต่อไป

คำสำคัญ: สับปะรด; ความหลากหลายทางพันธุกรรม; เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR; ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

บทนำ

สับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) เป็นพืชอุตสาหกรรมที่สำคัญของประเทศไทย แหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญ ได้แก่ จ. ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ระยอง ฉะเชิงเทรา จันทบุรี ตราด ภูเก็ต พังงา และชุมพร ปี พ.ศ. 2565 มีพื้นที่เก็บเกี่ยวสับปะรด 457,255 ไร่ ผลผลิต 1.17 ล้านตัน ผลผลิตเฉลี่ย 3,875 กก./ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2565) ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกสับปะรดรายใหญ่ของโลก ผลิตภัณฑ์สับปะรดส่งออกที่สำคัญ คือ สับปะรดกระป๋อง น้ำสับปะรดเข้มข้น และสับปะรดกวน ปี พ.ศ. 2565 มีมูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์สับปะรด 23,700 ล้านบาท การส่งออกในรูปสับปะรดผลสดน้อย ส่วนใหญ่เกษตรกรจะปลูกพันธุ์ปัตตาเวียสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูป และใช้กันมานาน จึงจำเป็นต้องมีการวิจัยและพัฒนาพันธุ์สับปะรดใหม่ ๆ ทั้งพันธุ์ที่เหมาะต่ออุตสาหกรรมแปรรูป และพันธุ์สำหรับการบริโภคผลสด เพื่อให้มีทางเลือกด้านพันธุ์เพิ่มขึ้น แต่การปรับปรุงพันธุ์สับปะรดเพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีคุณภาพดีนั้น การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เป็นขั้นตอนแรกที่มีความสำคัญ การคัดเลือกจากลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถจำแนกชนิด

หรือระบุพันธุ์ของสับปะรดออกจากกันได้อย่างชัดเจน เนื่องจากลักษณะภายนอกมักขึ้นกับสภาพแวดล้อม ทำให้ไม่สามารถบ่งบอกลักษณะทางพันธุกรรมที่ถูกต้องแม่นยำได้ จึงจำเป็นต้องมีข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ทั้งลักษณะภายนอกที่ปรากฏ (phenotype) และลักษณะทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ (genotype) เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจคัดเลือกพันธุ์ที่ถูกต้อง นอกจากนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรดยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์เช่นกัน เนื่องจากสามารถบ่งบอกถึงความห่างหรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์มีข้อมูลในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม มีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพโดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม

การนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR (simple sequence repeat) เข้ามาช่วยในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ สามารถจำแนกความแตกต่างแบบข่มร่วม (co-dominant) ได้ ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮทเทอโรไซกัส (heterozygous) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของพืชได้เป็นอย่างดี (Hokanson et al., 1998) อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิด เช่น มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) (Costa et al., 2013) และมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) (Yanfeng et al., 2019) สำหรับในสับปะรดมีรายงานวิจัยของ Abdalah et al. (2018) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในสับปะรดที่ปลูกในแทนซาเนีย 7 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 18 เครื่องหมาย พบว่า มี 10 เครื่องหมาย ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ดี สามารถให้แถบดีเอ็นเอ 22 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 2.2 อัลลีล/ไพรเมอร์ มีค่า polymorphism information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.17 – 0.79 เฉลี่ย 0.41 โดยไพรเมอร์ที่ให้ค่า PIC สูงสุด คือ TsuAC010 และสามารถแบ่งกลุ่มพันธุกรรมสับปะรดออกได้เป็น 4 กลุ่มหลัก

กรมวิชาการเกษตร โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี ได้เก็บรวบรวมพันธุ์สับปะรดจากภายในประเทศและพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ แต่ยังขาดข้อมูลด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังนั้น จึงดำเนินการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์สับปะรดที่เก็บรวบรวมไว้นี้ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR สำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ การบ่งชี้ลักษณะประจำพันธุ์ สร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรด และพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์สับปะรดของประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอจากสับปะรด

เก็บตัวอย่างใบสับปะรดจากแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี จำนวน 57 สายต้น/พันธุ์ ประกอบด้วย กลุ่มพันธุ์ queen กลุ่มพันธุ์ smooth cayenne กลุ่มพันธุ์ Spanish กลุ่มพันธุ์ maipure หรือ perolera กลุ่มพันธุ์ไม่ระบุชนิด และกลุ่มพันธุ์ลูกผสม (Table 1) นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก

Dellaporta et al. (1983) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวัดค่าความเข้มข้น (optical density, O.D.) ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร และนำมา เจือจาง ด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือ น้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 40 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสับปะรดด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสับปะรด จำนวน 57 ตัวอย่างพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 4 ชนิดสี ได้แก่ FAM (blue), HEX (green), TAMRA (yellow) และ ROX (red) จำนวน 20 คู่ไพรเมอร์ (Table 2) โดยใช้ชุด GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 60 – 100 นาโนกรัม, 1X GoTaq® Green Master Mix, 0.5 µM upstream primer, 0.5 µM downstream primer ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ pre-denature 95° ซ. 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ denature 94° ซ. 30 วินาที annealing 52 – 60° ซ. 45 วินาที extension 70° ซ. 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Extension 72° ซ. 10 นาที อีก 1 รอบ และตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp DNA ladder marker (Fermentas, USA) พร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

Table 1 Pineapple accessions (*Ananas* sp.) used in this study

Accession number	Cultivar	Group	Scientific name	Source
PA1	Tradsithong	Queen	*A. comosus* var. *comosus*	PB ARDC*
PA2	Homsuwan	Smooth Cayenne (Hybrid)	*A. comosus* var. *comosus*	PB ARDC
PA3	Pattavia	Smooth Cayenne	*A. comosus* var. *comosus*	PB ARDC
PA4	Sawi	Queen	*A. comosus* var. *comosus*	PB ARDC
PA5	Phuket	Queen	*A. comosus* var. *comosus*	PB ARDC
PA6	Intrachit Khaw	Spanish	*A. comosus* var. *comosus*	PB ARDC
PA7	Intrachit Dang	Spanish	*A. comosus* var. *comosus*	PB ARDC
PA8	Nanglae	Smooth Cayenne	*A. comosus* var. *comosus*	PB ARDC
PA9	Phetchaburi	Queen ‘Tainan 41’	*A. comosus* var. *comosus*	PB ARDC
PA10	Phetchaburi2	Smooth Cayenne	*A. comosus* var. *comosus*	PB ARDC
PA11	Australia	Smooth Cayenne	*A. comosus* var. *comosus*	Australia
PA12	Brazil	*Ananas* sp.	*A. comosus* var. *lucidus*	Brazil
PA13	Clone13	Smooth Cayenne	*A. comosus* var. *comosus*	Australia
PA14	Clone30	Smooth Cayenne	*A. comosus* var. *comosus*	Australia
PA15	F 180	Smooth Cayenne ‘Abacaxi’	*A. comosus* var. *comosus*	Australia
PA16	HANA17	Queen	*A. comosus* var. *comosus*	Hawaii
PA17	HANA119	Smooth Cayenne	*A. comosus* var. *comosus*	Hawaii
PA18	HANA25	Queen	*A. comosus* var. *comosus*	Hawaii
PA19	HANA58	Intra-specific hybrid	*A. hybrids* wild Brazil × Lot520	Hawaii
PA20	HANA64	*Ananas* sp.	*A. comosus* var. *bracteatus* 'CB 5'	Hawaii
PA21	HANA100	Smooth cayenne	*A. comosus* var. *comosus* 'Cayenne #59 4N'	Hawaii

Table 1 (continued)

Accession number	Cultivar	Group	Scientific name	Source
PA22	HANA114	Smooth cayenne	*A. comosus* var. *comosus* 'Cayenne Bottleneck'	Hawaii
PA23	HANA133	Smooth cayenne	*A. comosus* var. *comosus* 'Kew'	Hawaii
PA24	MD2-1	Smooth Cayenne (Hybrid)	*A. comosus* var. *comosus*	Hawaii
PA25	White Jewel	Maipure / Perolera	*A. comosus* var. *comosus*	Hawaii
PA26	MD2-2	Smooth Cayenne (Hybrid)	*A. comosus* var. *comosus*	Fair Trade Group
PA27	MG3	Smooth Cayenne (Hybrid)	*A. comosus* var. *comosus*	Fair Trade Group
PA28	Sawi6	Queen	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection Year 59-63
PA29	Sawi18	Queen	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection Year 59-63
PA30	SWPV#34	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection Year 59-63
PA31	SWPV#35	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection Year 59-63
PA32	PVIR#70	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection Year 59-63
PA32	PVIR#70	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection Year 59-63
PA33	SPPV#51	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection Year 59-63
PA34	PNPV#61	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection Year 59-63
PA35	Amornchan1	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA36	Amornchan3	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA37	Amornchan5	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA38	Amornchan13	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA39	Amornchan15	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA40	Amornchan17	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA41	Amornchan19	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA42	Phuchawa	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA43	Tubtim Siam	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA44	Thainan17	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA45	Thong Rayong	Queen	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA46	Pattavia-2	Smooth Cayenne	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA47	MD2-3	Smooth Cayenne (Hybrid)	*A. comosus* var. *comosus*	Amornchan Farm
PA48	PB49-07-024	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection T1/6.1
PA49	PB49-07-037	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection T2/6.1
PA50	PB49-07-224	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection T5/6.1
PA51	PB49-13-186	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection T14/6.1
PA52	PB49-13-251	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection T16/6.1
PA53	PB49-14-046	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection T18/6.1
PA54	PB49-14-168	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection T21/6.1
PA55	PB49-12-041	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection T10/6.1
PA56	PB49-07-045	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Clone Selection T3/6.1
PA57	Srivichai	Hybrid	*A. comosus* var. *comosus*	Rajamangala University of Technology Srivijaya

*PB ARDC : Petchaburi Agricultural Research and Development Center

Table 2 List of 20 fluorescent-labeled SSR primers used in the study of genetic diversity of 57 pineapple cultivars

Primer name	Sequence (5' → 3')		Size of alleles (bp)	Temperature (°C)
	Forward primer	Reverse primer		
Acom_9.9	HEX-TTTAATCGGGTGGAGTAAGGA	GCCAATATGAACAGGGGAAA	144 – 186	60
Acom_78.4	HEX-GCAAATGAGGCCACAAACTT	GGGTGGTGTGGACTTTCTCT	188 – 215	55
AJ845033	FAM-TCCACAGTGGGCGCAAAC	AAAGGACATGAGGTAGGCC	134 – 170	58
AJ845038	ROX-TGATCATGGCGACGACCCAG	TCATTGTCGCGGCACCATG	340 – 389	55
AJ845039	FAM-TTGGAGCCGATATTATCGTCC	ACGATCTCACAATGCTCCTCG	141 – 168	58
AJ845048	TAMRA-TCATCACCCCGCGCCTTTGC	TGCCAAGCCATCCTCAGACG	206 – 224	52
AJ845052	FAM-CAGTGGTGATTGAAGCCATGC	TTCACACCGAGAAAGCCCGG	96 – 131	52
AJ845056	ROX-TGCTGGCTCTGTGGGATG	TTAGGTTTTCAGTGGAGAGAG	294 – 316	52
AJ845069	ROX-TCCCCCTAATCATCGGAAGCC	GGATGATGATGGTCACCTCTG	257 – 277	52
AJ845076	ROX-ACCCAGCCATTGTCGTGCCTG	AGTTTACAAGGCGCATAGG	361 – 403	52
AJ845081	HEX-ACATTCCTCAGAGTGACCAGC	CACTAATCCTTGACCCAGACC	202 – 236	52
EP-05	TAMRA-CAGCCAATAACAACCTCAAG	TCCATACACACAGTACGTCG	254 – 301	58
EP-11	FAM-AGCGAGATAGCAGAGATAGG	TAGAGCGATGTTCGGATG	173 – 184	52
EP-12	TAMRA-TTAACACATGCACGGAGTAC	CTAAGAGACAACCCAGGAAG	232 – 239	54
EP-13	TAMRA-GCCAATAACAACCTCAAGC	TCCATACACACAGTACGTCG	251 – 341	58
EP-16	HEX-TAGTGAGTCAGGAGGAGAATG	CAAATAAACGGAGCGGAT	205 – 228	52
EP-20	HEX-TAATCGGGTGGAGTAAGG	GCTCACATAGGCCAATATG	152 – 195	55
EP-23	FAM-ATGGTGGTTCACTTATCAGC	AGACATTCAAAGCGGAGAG	102 – 126	55
EP-24	ROX-GCTGCTCTTGCTGCCAT	AAGCCATAGGACCACCAC	168 – 262	55
TsuAC010	TAMRA-TGAGTTGTGTCATTGTGTGTCA	GGGGGTCTCCATACATTTTT	211 – 236	52

3. การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ (fragment analysis) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้จากดีเอ็นเอของสับปะรด (ข้อ 2) ไปเข้าเครื่องวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอแบบอัตโนมัติ (Applied Biosystems™ 3730XL DNA analyzer, Foster City, CA) โดยการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค capillary electrophoresis ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ในระดับความห่างไม่น้อยกว่า 2 – 3 คู่เบส แสดงผลในรูปแบบของกราฟ (eletropherograms) และขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้ เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของตัวอย่างสับปะรดต่อไป

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกข้อมูลขนาดแถบดีเอ็นเอของแต่ละพันธุ์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่ ลงในตาราง ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่า 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่า 0 แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า polymorphic information content (PIC) จากข้อมูล genotype เป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่ได้จากแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอในการแสดงพอลิเมอร์ฟิซึม ซึ่งเป็นฟังก์ชันของทั้งจำนวนและความถี่อัลลีล เป็นค่าที่อธิบายถึงโอกาสที่จีโนไทป์เฮเทอโรไซกัส ซึ่งมีสองอัลลีลที่แสดงความหลากหลายของอัลลีลที่แตกต่างกันจะสามารถถ่ายทอดอัลลีลให้แก่รุ่นลูก (transmission informativeness) (กิตติพัฒน์, 2564)

จากสูตร

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2p_i^2 p_j^2$$

กำหนดให้ค่า p_i, p_j เป็นความถี่ของอัลลีล i และ j ตามลำดับ และ n เป็นจำนวนอัลลีล (Botstein et al., 1980) ซึ่งสูตรนี้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อลดข้อบกพร่องในกรณีที่มีความเป็นไปได้ที่เฮทเทอโรไซโกตจะไม่ให้ข้อมูลเนื่องจากมีพ่อแม่ที่มีจีโนไทป์เฮทเทอร์โรไซกัสที่เหมือนกัน

ทำการคำนวณค่าสังเกตเฮทเทอโรไซโกซิตี้ (observed heterozygosity: Ho) และค่าคาดหมาย (expected heterozygosity: He) ด้วยวิธีของ Nei (1978) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc 2.01e โดยอาศัยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ด้วยวิธี Jaccard's similarity coefficients และการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (cluster analysis) ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) การวิเคราะห์ข้อมูลและแสดงผลในรูปแบบ dendrogram และการวิเคราะห์ความถูกต้องของการจัดกลุ่ม โดยการวิเคราะห์ cophenetic correlation (r) (Rohlf, 2000)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์สับปะรด

ไพรเมอร์ SSR ทุกคู่ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์สับปะรดได้ดี ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และมีแถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบหรือหลายอัลลีล (3 – 9 อัลลีล/เครื่องหมาย) (Figure 1) แต่การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอของพันธุ์สับปะรดที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้ จึงนำผลผลิตพีซีอาร์ไปวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ABI3730XL สามารถจำแนกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในสับปะรดแต่ละพันธุ์ได้ในระดับที่แตกต่างกันเพียง 2 – 3 คู่เบส ซึ่งแสดงค่าขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์คู่ต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน และมีความจำเพาะกับพันธุ์สับปะรด มีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ โดยข้อมูลขนาดดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนทั้งสิ้น 1,140 ข้อมูล ทั้งนี้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้สามารถนำไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์เพื่อการตรวจสอบพันธุ์การรับรองพันธุ์ การคุ้มครองพันธุ์ให้มีความถูกต้องตรงตามพันธุ์ได้

2. การวิเคราะห์ข้อมูลและการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรด

การวิเคราะห์ข้อมูลขนาดดีเอ็นเอของสับปะรดที่ได้จากไพรเมอร์แต่ละคู่ พบว่า อัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด จำนวน 105 อัลลีล มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งตั้งแต่ 3 – 9 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 5.3 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกัน (polymorphic) จำนวน 105 อัลลีล คิดเป็น 100% โดยไพรเมอร์ที่พบอัลลีลมากที่สุด จำนวน 9 อัลลีล คือ EP-24 ส่วนไพรเมอร์ที่พบอัลลีลน้อยที่สุด จำนวน 3 อัลลีล คือ AJ845039 EP-11 และ EP-12 ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 94 – 400 คู่เบส ค่าสังเกตเฮทเทอโรไซโกซิตี้ (Ho) อยู่ระหว่าง 0.40 – 0.89 มีค่าเฉลี่ย 0.70 ค่าคาดหมายเฮทเทอโรไซโกซิตี้ หรือ ค่าความหลากหลายของยีน (gene diversity, He) อยู่ระหว่าง 0.51 – 0.72 เฉลี่ย 0.65 การวิเคราะห์ค่า PIC พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.44 – 0.67

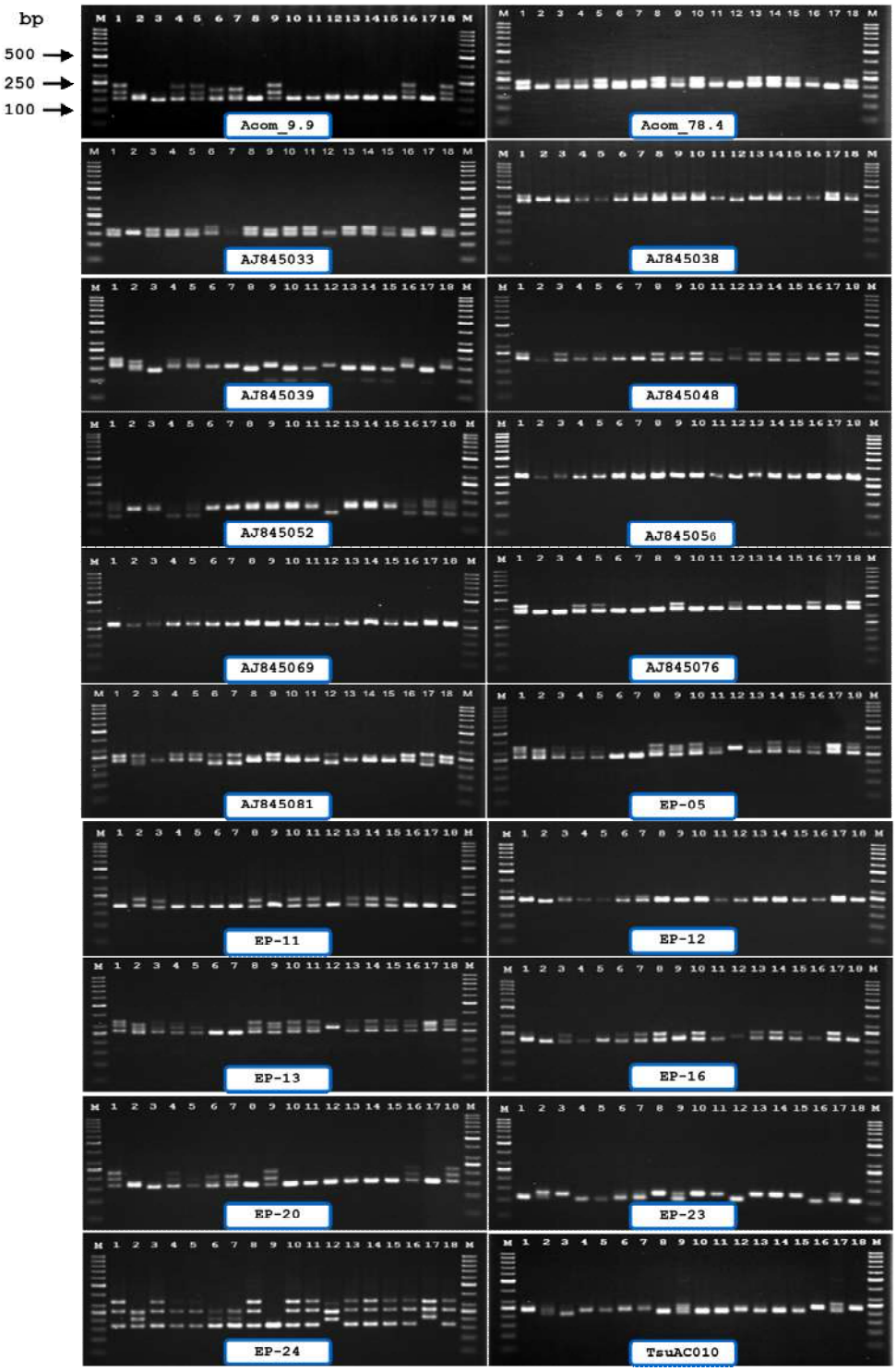

Figure 1 PCR amplification profiles of 18 pineapple cultivars using 20 fluorescent-labeled SSR primers separated by 2% agarose gel electrophoresis, Lane M = 50 bp DNA Ladder, Lane 1 = Trad Sithong, Lane 2 = Homsuwan, Lane 3 = Pattavia, Lane 4 = Sawi, Lane 5 = Phuket, Lane 6 = Intrachit Khaw, Lane 7 = Intrachit Dang, Lane 8 = Nanglae, Lane 9 = Phetchaburi, Lane 10 = Phetchaburi2, Lane 11 = Australia, Lane 12 = Brazil, Lane 13 = Clone13, Lane 14 = Clone30, Lane 15 = F180, Lane 16 = HANA17, Lane 17 = HANA119, Lane 18 = HANA25

Table 3 Results of genetic diversity analysis of 57 pineapple cultivars using 20 SSR markers

Primer/ (Locus)	Number of alleles	Number of polymorphic	% Polymorphic	Size of alleles (bp)	Mean of alleles (bp)	Observed heterozygosity (Ho)	Expected heterozygosity (He)	Polymorphic information content (PIC)
Acom_9.9	7	7	100	144-184	155	0.65	0.68	0.63
Acom_78.4	5	5	100	184-201	193	0.77	0.67	0.60
AJ845033	7	7	100	130-164	146	0.81	0.71	0.66
AJ845038	7	7	100	338-400	359	0.67	0.68	0.63
AJ845039	3	3	100	137-161	148	0.49	0.65	0.57
AJ845048	5	5	100	207-235	213	0.81	0.67	0.60
AJ845052	4	4	100	94-122	115	0.79	0.63	0.57
AJ845056	5	5	100	300-325	306	0.74	0.62	0.56
AJ845069	6	6	100	250-285	271	0.81	0.67	0.60
AJ845076	4	4	100	365-392	374	0.68	0.60	0.54
AJ845081	5	5	100	196-230	220	0.63	0.58	0.53
EP-05	5	5	100	253-297	273	0.81	0.72	0.67
EP-11	3	3	100	173-184	178	0.51	0.51	0.44
EP-12	3	3	100	232-239	235	0.70	0.66	0.58
EP-13	5	5	100	251-295	271	0.81	0.72	0.67
EP-16	4	4	100	205-228	210	0.40	0.53	0.44
EP-20	8	8	100	146-192	164	0.70	0.68	0.63
EP-23	5	5	100	104-135	114	0.74	0.67	0.61
EP-24	9	9	100	168-262	208	0.89	0.64	0.58
TsuAC010	5	5	100	206-234	218	0.56	0.66	0.59
Mean	5.35		100		218.60	0.70	0.65	0.59

เฉลี่ย 0.59 โดยไพรเมอร์ที่มีค่า PIC สูงสุดคือ EP-05 และ EP-13 และไพรเมอร์ที่มีค่า PIC ต่ำสุด คือ EP-11 และ EP-16 ตามรายงานของ Yu et al. (2012) ระบุว่าค่า PIC > 0.50 แสดงถึงความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับสูง ถ้ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.25 < PIC < 0.50 ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างระดับปานกลาง และค่า PIC < 0.25 ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับที่ต่ำ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ค่า PIC ของไพรเมอร์ที่คัดเลือกและนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรดมีค่าอยู่ระหว่าง 0.44 – 0.67 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์สับปะรดได้อยู่ในระดับปานกลางจนถึงระดับสูง (Table 3)

การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม พบว่า มีค่าตั้งแต่ 0.50 – 1.00 โดยพันธุ์ที่มีค่า similarity coefficient สูงสุด 1.00 คือ 1) กลุ่มพันธุ์ตราดสีทอง สวี สวี6 สวี18 ภูเก็ต HANA17 HANA25 ทองระยอง และ PNPV#61 2) กลุ่มพันธุ์ SWPV#34 และ SWPV#35 3) กลุ่มพันธุ์หอมสุวรรณ MD2-1 MD2-2 MD2-3 และ MG3 4) กลุ่มพันธุ์ปัตตาเวีย นางแล เพชรบุรี2 Australia Clone13 Clone30 F180 HANA133 และ ปัตตาเวีย-2 และพันธุ์ที่มีค่า similarity coefficient ต่ำสุด 0.50 คือ 1) PB49-07-224 กับ HANA58 2) HANA64 กับ Brazil และ 3) White

Jewel กับ HANA64 เมื่อนำค่า similarity matrix ที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (cluster analysis) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) พบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสับปะรดทั้ง 57 สายพันธุ์/พันธุ์ แบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม (Figure 2) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ queen ประกอบด้วย พันธุ์ตราดสีทอง สวี สวี6 สวี18 ภูเก็ต HANA17 HANA25 ทองระยอง เพชรบุรี และกลุ่มพันธุ์ลูกผสมซึ่งมีฐานพันธุกรรมมาจากประชากรพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ที่อยู่ภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน ประกอบด้วย ภูชวา (ปัตตาเวีย x ภูเก็ต) อมรจันทร์15 (ปัตตาเวีย x MD2) อมรจันทร์19 (MD2 x ภูชวา) PB49-07-024 PB49-07-037 PB49-07-045 PB49-07-224 (ปัตตาเวีย x สวี) PB49-13-251 SWPV#34 SWPV#35 (สวี x ปัตตาเวีย) และ PNPV#61 (ปัตตานี (Queen) x ปัตตาเวีย)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อยที่ 1 จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ smooth cayenne ประกอบด้วย พันธุ์ปัตตาเวีย ปัตตาเวีย-2 นางแล เพชรบุรี2 ออสเตรเลีย Clone13 Clone30 F180 HANA100 HANA114 HANA119 HANA133 และกลุ่มพันธุ์ลูกผสมซึ่งมีฐานพันธุกรรมมาจากประชากรพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ที่อยู่ภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน ประกอบด้วย อมรจันทร์1 อมรจันทร์3 (ปัตตาเวีย x MD2) SPPV#51 (สิงคโปร์ปัตตาเวีย x ปัตตาเวีย) PVIR#70 (ปัตตาเวีย x อินทรชิต) PB49-13-186 (สวี x ปัตตาเวีย) PB49-14-046 PB49-14-168 (ตราดสีทอง x ปัตตาเวีย) PB49-12-041 (ภูเก็ต x ปัตตาเวีย) ในขณะที่พันธุ์ White jewel ซึ่งเป็นกลุ่มพันธุ์ maipure หรือ perolera ก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย และกลุ่มย่อยที่ 2 เป็นกลุ่มพันธุ์ลูกผสมระหว่าง smooth cayenne กับ smooth cayenne ได้แก่ พันธุ์หอมสุวรรณ MD2-1 MD2-2 MD2-3 MG3 (58-1184 x 59-443) ไทนาน17 อมรจันทร์5 อมรจันทร์13 (ปัตตาเวีย x MD2) และ smooth cayenne กับ queen คือ พันธุ์อมรจันทร์17 (สิงคโปร์ปัตตาเวีย x MD2)

กลุ่มที่ 3 สำหรับประชากรในกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นกลุ่มขนาดเล็ก ประกอบด้วย พันธุ์ทับทิบสยาม ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างกลุ่มพันธุ์ queen กับพันธุ์ป่า (wild) และ พันธุ์ Brazil เป็นกลุ่มพันธุ์ *Ananas* sp. ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นำเข้าจากบราซิล มีชื่อพันธุ์ทางพฤกษศาสตร์ (variety) เป็น *A. comosus* var. *lucidus*

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์อินทรชิตขาว อินทรชิตแดง ศรีวิชัย และ HANA64 สำหรับ พันธุ์อินทรชิตขาว และ อินทรชิตแดง จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ Spanish สำหรับพันธุ์ศรีวิชัย เป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ภูเก็ต และ ปัตตาเวีย และพันธุ์ HANA64 เป็นกลุ่มพันธุ์ *Ananas* sp. ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นำเข้าจากฮาวาย โดยพันธุ์ HANA64 มีชื่อพันธุ์ทางพฤกษศาสตร์เป็น *A. comosus* var. *bracteatus* ในขณะที่สับปะรดทั้ง 3 พันธุ์ที่กล่าวมาข้างต้น เป็น *A. comosus* var. *comosus*

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย พันธุ์ HANA58 จัดเป็น outgroup ได้แก่ พันธุ์ HANA58 (Ananas hybrid, wild Brazil x Lot 520) เป็นกลุ่มพันธุ์ intra-specific hybrid

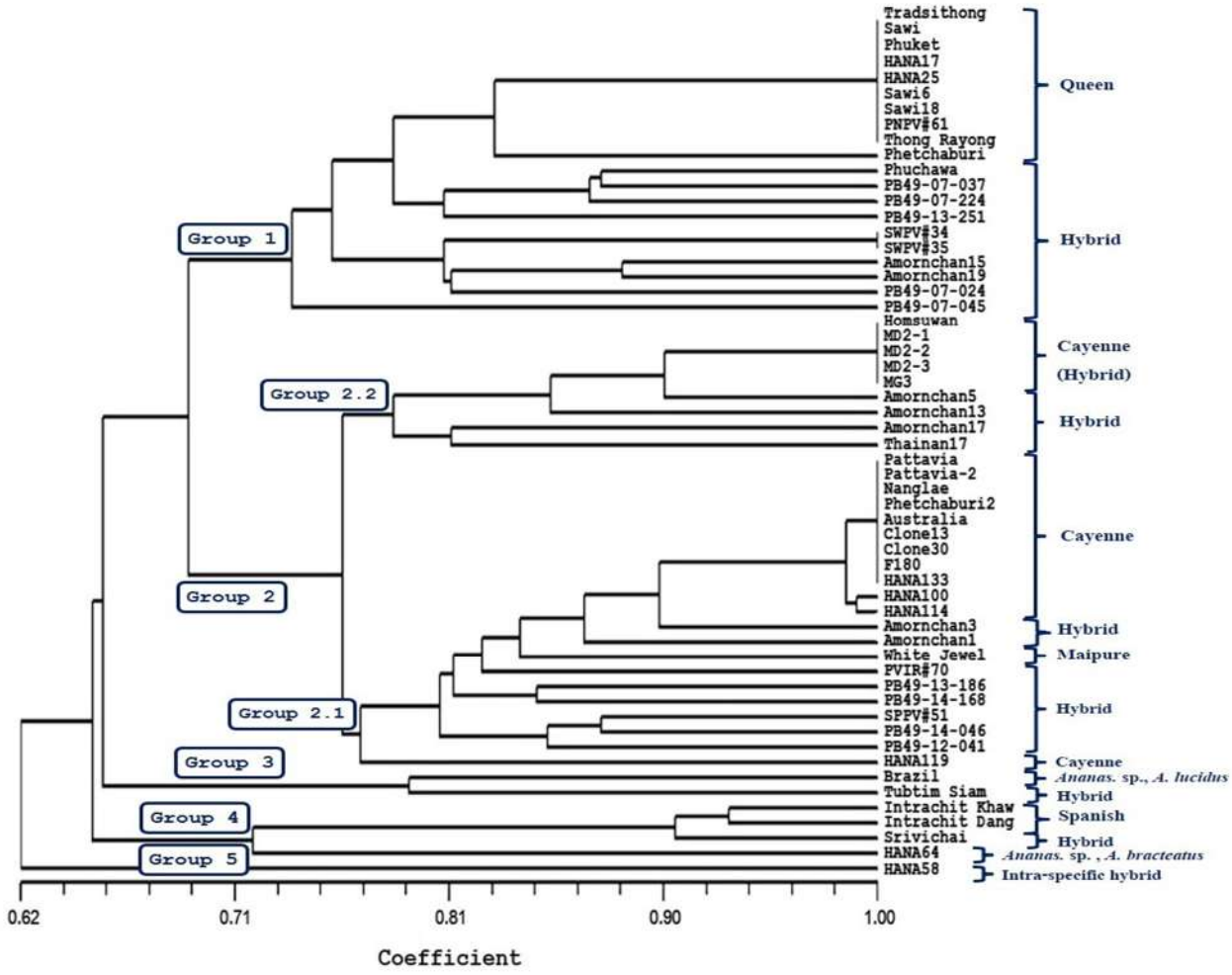

Figure 2 Dendrogram of 57 pineapple cultivars generated by UPGMA clustering using 20 SSR markers

เมื่อวิเคราะห์ความถูกต้องของการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation พบว่า มีค่า 0.85 ซึ่งเป็นค่าบวก หมายความว่า ค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์ มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับดี (Sirithunya et al., 2001) จากผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ทั้ง 20 คู่ไพรเมอร์ สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรดได้ดี แต่มีบางพันธุ์ที่ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากกันได้ เนื่องจากผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมมีค่า 1 ซึ่งอาจแปลผลได้ว่า พันธุ์สับปะรดดังกล่าวอาจจะเป็นพันธุ์เดียวกัน แต่มีการกระจายพันธุ์ไปยังพื้นที่ต่าง ๆ อาจมีการปรับตัวและกลายลักษณะโดยธรรมชาติทำให้ลักษณะฟีโนไทป์แตกต่างกันไปบ้าง และมีการเรียกชื่อพันธุ์แตกต่างกันตามพื้นที่ปลูก เช่น พันธุ์ปัตตาเวีย มีการนำเข้ามานาน เมื่อนำไปปลูกในพื้นที่ อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี เรียกว่า พันธุ์ศรีราชา หรือปลูกใน ต. ห้วยมุ่น อ. น้ำปาด จ. อุตรดิตถ์ เรียกว่า พันธุ์ห้วยมุ่น (สาวบางแค 22, 2565) สำหรับพันธุ์หอมสุวรรณ พบว่า เป็นพันธุ์เดียวกับพันธุ์ MD2 ซึ่งเป็นสับปะรดลูกผสมจากฮาวาย สหรัฐอเมริกา (มนตรี, 2560) และพันธุ์ MG3 พบว่าเป็นพันธุ์ที่ได้มาจากคู่ผสมพ่อแม่เดียวกันกับพันธุ์ MD2 นำเข้ามาจากประเทศฟิลิปปินส์ โดยบริษัท

โดล ประเทศไทย จำกัด (มนตรี, 2563) หรือเป็นพันธุ์ที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกันสูงมาก เช่น พันธุ์ SWPV#34 และ SWPV#35 เป็นลูกผสมชุดเดียวกันที่มาจากคู่ผสมระหว่างพันธุ์สวีกับปัตตาเวีย

อย่างไรก็ตาม ผลการจัดกลุ่มดังกล่าวนอกจากจะมีความสอดคล้องกับประวัติพันธุ์แล้ว ยังสอดคล้องกับวิธีการจัดจำแนกกลุ่มพันธุ์สับปะรดโดย Py et al. (1987) ที่ใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์เบื้องต้น ได้แก่ ทรงต้น การมีหนาม บริเวณขอบใบ ทรงผล และเนื้อผล สามารถจัดกลุ่มสับปะรดที่พบปลูกในประเทศไทย ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่ม smooth cayenne มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มขนาดใหญ่ ขอบใบเรียบมีหนามเฉพาะปลายใบ หน่อมีน้อย ผลขนาดใหญ่ทรงกระบอกตาแบนกว้าง ผลสุกสีเหลืองปนส้ม เนื้อสีเหลืองอ่อน รสหวาน-อมเปรี้ยว เยื่อใยน้อย 2) กลุ่ม queen มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มขนาดปานกลาง ขอบใบมีหนาม หน่อมีมาก ผลขนาดเล็ก ทรงกรวยกระบอกตาพองนูน ผลสุกสีเหลือง เนื้อสีเหลืองใส รสหวานกรอบ เยื่อใยน้อย และ 3) กลุ่ม spanish มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มขนาดใหญ่ ขอบใบมีหนาม หน่อมีน้อย ผลขนาดปานกลาง ทรงกลม ตานูนกว้าง ผลสุกสีเหลืองปนแดง เนื้อสีเหลืองอ่อน-ขาว รสหวานอ่อน เยื่อใยมาก ทั้งนี้ยังพบกลุ่มพันธุ์อีก 1 กลุ่ม ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ได้แก่ พันธุ์ White Jewel จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ maipure หรือ perolera เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากฮาวาย มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มขนาดใหญ่ ขอบใบเรียบไม่มีหนาม เป็นแบบ piping หน่อมีน้อย ผลขนาดใหญ่ ทรงกระบอก ตาแบนกว้างไม่สม่ำเสมอ ผลสุกสีเหลืองปนแดง เนื้อสีเหลืองใส-เหลืองซีด รสหวาน-อมเปรี้ยว มีกลิ่นเฉพาะตัว เยื่อใยน้อย และยังมีกลุ่มพันธุ์ที่ไม่ระบุชนิด ได้แก่ พันธุ์ Brazil เป็นกลุ่มพันธุ์ *Ananas* sp. มีชื่อวิทยาศาสตร์ *A. comosus* var. *lucidus* เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากประเทศบราซิล มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มขนาดเล็ก ใบเล็กแคบตั้งตรง ขอบใบไม่มีหนาม ใบเป็นมันเงาสีม่วงปนแดง ผลขนาดเล็กทรงกระบอก ผลสุกสีชมพูปนแดง เนื้อสีเหลืองขาว-ขาวครีม และ พันธุ์ HANA64 เป็นกลุ่มพันธุ์ *Ananas* sp. มีชื่อวิทยาศาสตร์ *A. comosus* var. *bracteatus* มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่มขนาดค่อนข้างใหญ่ ใบใหญ่ มีลักษณะอ่อนสีเขียวสด ขอบใบมีหนามแข็งขนาดใหญ่โค้งงอไปหาปลายใบ ผลมีขนาดเล็กทรงกระบอก เนื้อสีขาว-ขาวครีม (Figure 3) โดยทั้ง 2 กลุ่มพันธุ์นี้มีลักษณะเนื้อแข็ง รสชาติไม่ดี ไม่เหมาะกับการนำมาบริโภค มักจะใช้เป็นไม้ประดับหรือไม้ตัดดอก หรืออาจนำมาใช้ประโยชน์เป็นเชื้อพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากสับปะรดกลุ่มพันธุ์ดังกล่าวมีลักษณะความต้านทานต่อโรคเหี่ยวได้ดี (ทวีศักดิ์, 2560)

ข้อมูลที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสับปะรดทั้ง 57 สายพันธุ์/พันธุ์ นับเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญต่องานด้านการปรับปรุงพันธุ์อย่างมาก เนื่องจาก สามารถบ่งบอกถึงความห่างหรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เพื่อให้นักปรับปรุงพันธุ์มีข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ และสามารถจับคู่ผสมในโครงการปรับปรุงพันธุ์สับปะรดได้อย่างเหมาะสม โดยการจับคู่ผสมระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาผสมพันธุ์กัน ทำให้สามารถเพิ่มโอกาสที่จะได้พันธุ์ที่มีลักษณะดีเด่นและลูกผสมที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากยิ่งขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการทรัพยากรเชื้อพันธุกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์สับปะรดในอนาคต

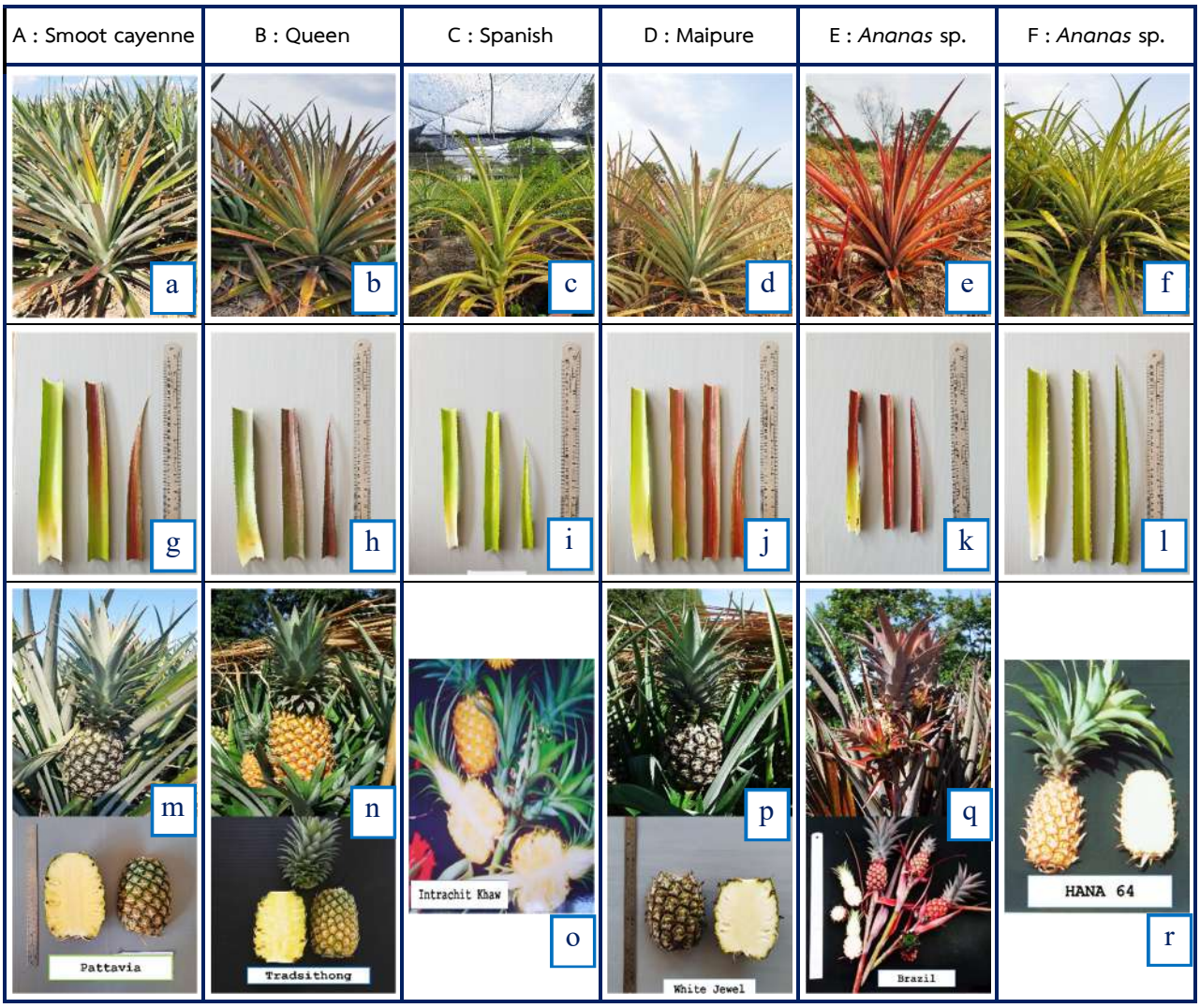

Figure 3 Morphological characteristics of pineapple cultivars representative of each group and *Ananas* sp. used in this study. The cultivars include Pattavia (smoot cayenne), Tradsithong (queen), Intrachit Khaw (spanish), White Jewel (maipure), Brazil (*Ananas* sp., *A. comosus* var. *lucidus*) and HANA64 (*Ananas* sp., *A. comosus* var. *bracteatus*), as shown in column A, B, C, D, E and F respectively, a - f, rosette shape; g - l, leaf shape; m - r, fruit shape and color

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอและการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์สับปะรดที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร ประกอบด้วย กลุ่มพันธุ์ที่รวบรวมภายในประเทศ กลุ่มพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ และกลุ่มพันธุ์ลูกผสม จำนวน 57 สายพันธุ์/พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 20 คู่ไพรเมอร์ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับปะรดกลุ่มพันธุ์ต่าง ๆ และเป็นวิธีการที่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรดได้เป็นอย่างดี รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์สับปะรด

ทั้งสิ้น 1,140 ข้อมูล พบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด 105 อัลลีล มีอัลลีลต่อตำแหน่ง 3 – 9 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 5.3 อัลลีล/ตำแหน่ง อัลลีลที่พบทั้งหมดแสดงความแตกต่างกันคิดเป็น 100% แถบดีเอ็นเอมีขนาดตั้งแต่ 94 – 400 คู่เบส มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.44 – 0.67 หรือเฉลี่ย 0.59 เมื่อนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถแบ่งกลุ่มออกได้เป็น 5 กลุ่ม ที่แสดงความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับประวัติพันธุ์และการจัดจำแนกกลุ่มพันธุ์สับปะรดตามลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการบ่งชี้ และสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์สับปะรด เพื่อการระบุ ตรวจสอบ และจำแนกพันธุ์ รวมทั้งยังใช้เป็นข้อมูลสำหรับการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในงานปรับปรุงพันธุ์สับปะรดเพื่อสร้างลูกผสมให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2564. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี. 393 หน้า.

ทวีศักดิ์ แสงอุดม. 2560. การจัดการการผลิตสับปะรดคุณภาพ. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 184 หน้า.

มนตรี กล้าขาย. 2560. MD-2: สับปะรดผลสดพันธุ์ใหม่ที่ครองใจคนทั้งโลก. แหล่งข้อมูล: https://www.technologychaoban.com/agricultural-echnology/article_33935. สืบค้น: 23 พฤษภาคม 2567.

มนตรี กล้าขาย. 2563. MG-3: สับปะรดพันธุ์ใหม่ รสหวานได้ใจ ผลใหญ่จากฟิลิปปินส์.แหล่งข้อมูล: https://www.Technologychaoban.com/agricultural-technology/article136154. สืบค้น: 19 มีนาคม 2567.

สาวบางแค 22. 2565. ชื่อสับปะรดปัตตาเวียเหมือนกัน แต่รสชาติความอร่อยต่างกัน. แหล่งข้อมูล: https://www.Technologychaoban.com/agricultural-technology/article205445. สืบค้น: 23 พฤษภาคม 2567.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2565. ภาพรวมสถานการณ์สินค้าเกษตรปี 2565 และแนวโน้มปี 2565. แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th. สืบค้น: 2 ธันวาคม 2566.

Abdalah, M., M.S. Seth, A. Ndee, E.E. Mneney, G. Mbwambo, K. Lema, A. Godfrey, L. Mrema, A. Kachiwile, E. Mrema and T.J. Msogoya. 2018. Diversity and genetic identity of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] in Tanzania based on microsatellite markers. African Journal of Biotechnology. 17(26): 811 – 817.

Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics. 32(3): 314 – 331.

Costa, T.R.D., P.S.V. Filho, M.C. Gonçalves-Vidigal, M.Z. Galván, G.F. Lacanallo, L.I. da Silva and M.V. Kvitschal. 2013. Genetic diversity and population structure of sweet cassava using simple sequence repeat (SSR) molecular markers. African Journal of Biotechnology. 12(10): 1040 – 1048.

Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II, Plant Molecular Biology Reporter. 1(4): 19 – 21.

Hokanson, S.C., A.K. Szewc-McFadden, W.F. Lamboy and J.R. McFerson. 1998. Microsatellite (SRR) markers reveal genetic identities,

genetic diversity and relationships in a Malus x domestica borkh. core subset collection. Theoretical and Applied Genetics. 97(5): 671 – 683.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89(3): 583 – 590.

Py, C., J.J. Lacoeuilhe and C. Teisson. 1987. The Pineapple Cultivation and Uses. G.P. Maisonneuve et Larose Publisher, Paris. 568 p.

Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Exeter Publishing Setauket, New York.

Sirithunya, P., E. Roumen, S. Mongkolsomrit, S. Sriprakhon, P. Hutamekalin and T. Sreewongchai. 2001. Instruction Manual Workshop on Molecular Genetic Analysis on Diversity of Blast Pathogen in Thailand. Yothee laboratory Unit Bangkok, Thailand.

Yanfeng, D., J. Liu, J. Xu, C. Bian, S. Duan, W. Pang, J. Hu, G. Li and L. Jin. 2019. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis with simple sequence repeat markers of 217 potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) in China. American Journal of Potato Research. 96: 21 – 32.

Yu, J.Z., D.D. Fang, R.J. Kohel, M. Ulloa, L.L. Hinze, R.G. Percy, J. Zhang, P.W. Chee, B.E. Scheffler and D.C. Jones. 2012. Development of a core set of SSR markers for the characterization of Gossypium germplasm. Euphytica. 187(2): 203 – 213.