

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนก ทุเรียนด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

Genetic Relationship Assessment and Identification of Durian Using HAT-RAPD Markers

ทัศนีย์ สิงห์ศิริรักษ์ และธีระชัย ธานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Tassanee Singhsilarak and Theerachai Thanananta

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Narumol Thanananta*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,
Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

บทคัดย่อ

ทุเรียนจัดเป็นราชาของผลไม้และเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของทุเรียน 30 พันธุ์ จากสวนบ้านเรา จังหวัดระยอง ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อตรวจสอบไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ 20 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจน เมื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอรวม 240 แถบ ขนาดประมาณ 300-2,500 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความหลากหลาย 205 แถบ (85.42 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.59-0.89 และสามารถแบ่งทุเรียนเป็น 2 กลุ่ม โดยผลการวิจัยนี้สามารถใช้ประโยชน์ในการค้าและการปรับปรุงพันธุ์ทุเรียน

คำสำคัญ : ทุเรียน; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก; แฮตอาร์เอพีดี

Abstract

Durian is the king of fruits and a major economic fruit of Thailand. This research investigated the relationships among 30 durian cultivars from Suanbanrao durian orchard in Rayong province using

high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique. The total of 72 primers used, 20 primers which gave obvious amplified PCR products were selected. Then, the selected primers were used for DNA fingerprinting and resulted in 240 DNA bands ranging from 300 to 2500 bp. The number of polymorphic bands was 205 (85.42 %). In addition, a dendrogram was constructed using UPGMA by the NTSYS-pc ver. 2.01e program based on similarity coefficient ranging from 0.59-0.89 and resulted in two major groups. This research could be useful as a guideline for trading and plant breeding.

Keywords: durian; genetic relationship; identification; HAT-RAPD

1. คำนำ

ทุเรียน (durian) เป็นผลไม้เขตร้อน จัดอยู่ในอันดับ Males วงศ์ Bombacaceae สกุล *Durio* มีถิ่นกำเนิดในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีศูนย์กลางความหลากหลายอยู่ในเกาะบอร์เนียว (Mendoza, 1941; Macmillan, 1949; Lim, 1990)

พืชในสกุล *Durio* มีเพียง *Durio zibethinus* Murr. (ทุเรียนบ้าน) เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ได้รับความนิยม เพราะเป็นไม้ผลพันธุ์ปลูกที่ให้ผลผลิตดีและมีรสชาติอร่อย ทุเรียนชนิดนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) สูง โดยสีของเปลือกผลมีความผันแปรจากเขียวถึงเหลืองแดง สีของเนื้อผันแปรจากขาวถึงเหลืองเข้ม เปลือกผลมีหนามแหลม เนื้อผลมีรสชาติหวานมันและมีกลิ่นแรงเมล็ดสีน้ำตาลมีขนาดเล็กถึงใหญ่ (ทรงพล, 2551)

ในอดีต พบทุเรียนในประเทศไทยประมาณ 480 พันธุ์ เป็นพันธุ์ปลูกทางการค้าประมาณ 60 พันธุ์ แต่ปัจจุบัน เหลือพันธุ์ปลูกทางการค้าเพียงไม่กี่พันธุ์ที่ผู้บริโภคนิยม ได้แก่ หมอนทอง ชะนี ก้านยาว กระดุมทอง และพวงมณี (พิทักษ์, 2550) ทำให้ทุเรียนพันธุ์โบราณค่อย ๆ มีปริมาณลดลงอย่างมาก และมีแนวโน้มว่าจะสูญพันธุ์ อย่างไรก็ตาม หน่วยงานรัฐและเกษตรกรผู้ปลูกทุเรียนบางรายได้เก็บรวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์ทุเรียนไว้เพื่อไม่ให้สูญหายไป

ปัจจุบันพบพันธุ์ทุเรียนในประเทศไทยมากกว่า 200 พันธุ์ แบ่งเป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มกบ กลุ่มหลวง กลุ่มก้านยาว กลุ่มกำปั่น กลุ่มทองย้อย และกลุ่มเบ็ดเตล็ด โดยใช้เกณฑ์การจำแนกจากลักษณะสัณฐานของทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ทรงผล และหนามผล (หิรัญ และคณะ, 2541; สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544) เนื่องจากเกษตรกรในอดีตมักปลูกและขยายพันธุ์ทุเรียนด้วยเมล็ด จึงเกิดความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) จากการผสมพันธุ์ ทั้งการผสมภายในพันธุ์และการผสมข้ามพันธุ์ รวมทั้งอาจการเกิดการกลาย (mutation) ขึ้น จึงทำให้ทุเรียนมีลักษณะประจำพันธุ์ไม่คงที่ อีกทั้งมีการนำทุเรียนไปปลูกในหลากหลายสถานที่ คนปลูกต่างคน และมีการตั้งชื่อพันธุ์ทุเรียนใหม่ ๆ ขึ้นมากมาย อย่างไรก็ตาม ในระยะต่อมาเมื่อพบพันธุ์ที่มีลักษณะที่ดี เกษตรกรจะหันมาขยายพันธุ์ด้วยการเสียบยอดหรือการทาบกิ่งให้ได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนเดิมปริมาณมาก ๆ เพื่อปลูกทางการค้า

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA maker) เพื่อจำแนกสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์จะช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตนั้นมีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลในพืชนั้น สามารถใช้ประโยชน์

ด้านการปรับปรุงพันธุ์ ขยายพันธุ์ และการอนุรักษ์
โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ ได้แก่ อาร์เอฟแอลพี
(RFLP, restriction fragment length polymorphism)
(Tanksley *et al.*, 1989) เอเอฟแอลพี (AFLP,
amplified fragment length polymorphism) (Vos *et al.*, 1995) อาร์เอพีดี (RAPD, random amplified
polymorphic DNA) (William *et al.*, 1990) สก็อต
(SCoT, start codon targeted) (Collard and Mackill,
2009) เป็นต้น

แฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - random amplified polymorphic DNA) ดัดแปลงมาจากอาร์เอพีดี (Weising *et al.*, 2005) โดยเพิ่มอุณหภูมิขั้นตอนไพรเมอร์เข้าจับกับ ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) จากเดิม 35-42 เป็น 46-62 องศาเซลเซียส ทำให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) มีความหลากหลาย (polymorphic) สูงขึ้น และแถบดีเอ็นเอมีความชัดเจนมากขึ้น (Anuntalabhochai *et al.*, 2000) โดยไพรเมอร์ที่ใช้ เป็นไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เมื่อเปรียบเทียบกับ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น พบว่าแฮตอาร์เอพีดี เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ทำให้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และราคาไม่แพงนัก ซึ่งมีรายงานการใช้ในพืชหลาย ชนิด ได้แก่ ผักกาด (จาดุรงค์ และคณะ, 2557) ถั่วลิสง (วริศรา และคณะ, 2557) ถั่วเหลือง (นฤมล และคณะ, 2559) ถั่วเขียว (หมั่นไกรเซอร์ชูเช และลูกผสม จุฑาทิพย์ และคณะ, 2559) ถั่วเขียว (หมั่นไกรเซอร์ชูเช และลูกผสม จุฑาทิพย์ และคณะ, 2559) ถั่วเขียว (หมั่นไกรเซอร์ชูเช และลูกผสม จุฑาทิพย์ และคณะ, 2559) เป็นต้น

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพันธุ์ทุเรียน โดยศึกษาในตัวอย่างทุเรียนที่เก็บรวบรวมไว้ ณ สวนบ้านเรา ซึ่งเป็นสวนทุเรียนของเอกชนที่อยู่ในจังหวัดระยอง

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ทูเรียน

ตัวอย่างใบทูลเรียน 30 พันธุ์ ซึ่งนำมาจาก
สวนบ้านเรา จังหวัดระยอง ได้แก่ (1) กบวัดกล้วย
(2) กบเจ้าคุณ (3) ห้าลูกไม่ถึงผิว (4) ลงทอง
(5) นกหยิบ (6) กำปั้งเหลือง (7) กำปั้งเดิม
(8) ทองแดง (9) ทองย้อยฉัตร (10) พวงมณี
(11) หลงลับแล (12) ทองสุก (13) ต้นใหญ่
(14) ก้านยาว (15) ชะนี (16) ชะนีน้ำตาลทราย
(17) หลินลับแล (18) ฉัตรสีทอง (19) ชมพูพาน
(20) กะเทยเนื้อขาว (21) ชมพูศรี (22) กำปั้งพวง
(23) ธรณีไหว (24) อีลีบนายทิพย์ (25) กบพิกุล
(26) ทับทิม (27) กบรัศมี (28) เม็ดในก้านยาว
(29) ก้านสั้น และ (30) กบสุวรรณ

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบทุเรียนด้วยวิธี CTAB ซึ่งประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีของ ปิยดา และคณะ (2558) แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 % และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วนำไปตรวจดูการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) เพื่อตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.3.1 การคัดเลือกไพรเมอร์

นำดีเอ็นเอทุเรียน 30 พันธุ์ มาเจี๊จางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และนำมาผสมรวมกันเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction) ด้วยไพรเมอร์แบบสั้น จำนวน 6 ชุด รวม 72 ชนิด (Wako Company, Japan) ความเข้มข้น 250 นาโนโมลาร์ (nM) ในบัฟเฟอร์ [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1),

0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM MgCl₂ ที่มีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (unit) ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร (นฤมล และคณะ, 2555) ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที บ่ม

ที่ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และบ่มที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Sambrook *et al.*, 1989)

ตารางที่ 1 จำนวนแถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนที่ได้จากแฮตอาร์เอฟดี ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์แบบสุ่ม 20 ชนิด

ลำดับ	ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			เปอร์เซ็นต์ความหลากหลาย
			ทั้งหมด	ที่มีความหลากหลาย	ที่ไม่มีความหลากหลาย	
1	A22	GCCTGCCTCACG	11	9	2	81.82
2	A24	CTCCTGCTGTTG	10	3	7	30.00
3	A30	GACCTGCGATCT	1	-	1	0.00
4	A31	AAGGCGCGAACG	19	19	-	100.00
5	A32	TTGCCGGGACCA	12	11	1	91.67
6	B22	GGTGACTGGTGG	11	8	3	72.73
7	B23	GGTGCCGGAGCA	14	12	2	85.71
8	B32	ATCGCGGCTTAT	11	10	1	90.91
9	C21	GGAGAGCGGACG	20	20	-	100.00
10	C22	GGTCACCGATCC	12	10	2	83.33
11	C28	GTCGACGCATCA	10	7	3	70.00
12	C31	TCTGCTGACCGG	10	8	2	80.00
13	D31	GGAGGTGACCA	13	9	4	69.23
14	E22	GGAATGGAACCG	9	7	2	77.78
15	E23	AGGTACGCCGCA	17	17	-	100.00
16	E24	CCGGAGTGATG	17	17	-	100.00
17	E26	CTGCCTGTACCA	9	9	-	100.00
18	E31	GAGGACAGCAA	10	9	1	90.00
19	E32	CAGGAACAGCAA	10	7	3	70.00
20	F31	ATCGTGACGCCG	14	13	1	92.86
รวม			240	205	33	

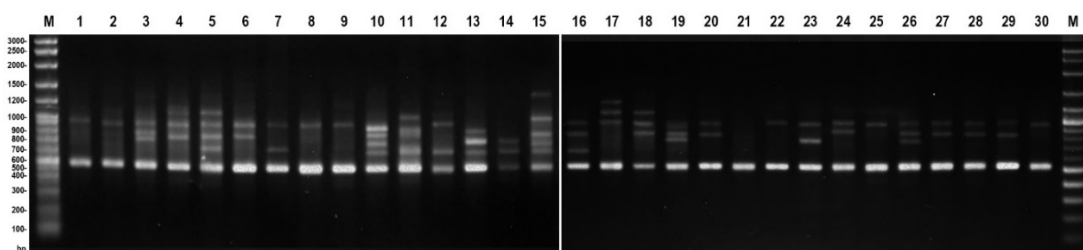
2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน นำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนทั้ง 30 พันธุ์ โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™)

2.4 การวิเคราะห์ผล

ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของ

แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนทั้ง 30 พันธุ์ ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 0 และนำผลรวมที่ได้มาวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) แล้วสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e (Rohlf, 2002) โดยเลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean)



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนที่ได้จากแฮตดาร์เอฟดีโดยใช้ไพรเมอร์ F31 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™), หมายเลข 1-30 คือ พันธุ์ทุเรียนต่าง ๆ ได้แก่ (1) กบวัดกล้วย (2) กบเจ้าคุณ (3) หัวลูกไม้ถึงผิว (4) ลวงทอง (5) นกหยิบ (6) กำปันเหลือง (7) กำปันเดิม (8) ทองแดง (9) ทองย้อยฉัตร (10) พวงมณี (11) หลงลับแล (12) ทองสุก (13) ต้นใหญ่ (14) ก้านยาว (15) ชะนี (16) ชะนีน้ำตาลทราย (17) หลินลับแล (18) ฉัตรสีทอง (19) ชมพูพวน (20) กะเทยเนื้อขาว (21) ชมพูศรี (22) กำปันพวง (23) ธรณีไหว (24) อีลีนายทิพย์ (25) กบพิกุล (26) ทับทิม (27) กบรัสมิ์ (28) เม็ดในก้านยาว (29) ก้านสั้น และ (30) กบสุวรรณ]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลการวิจัย

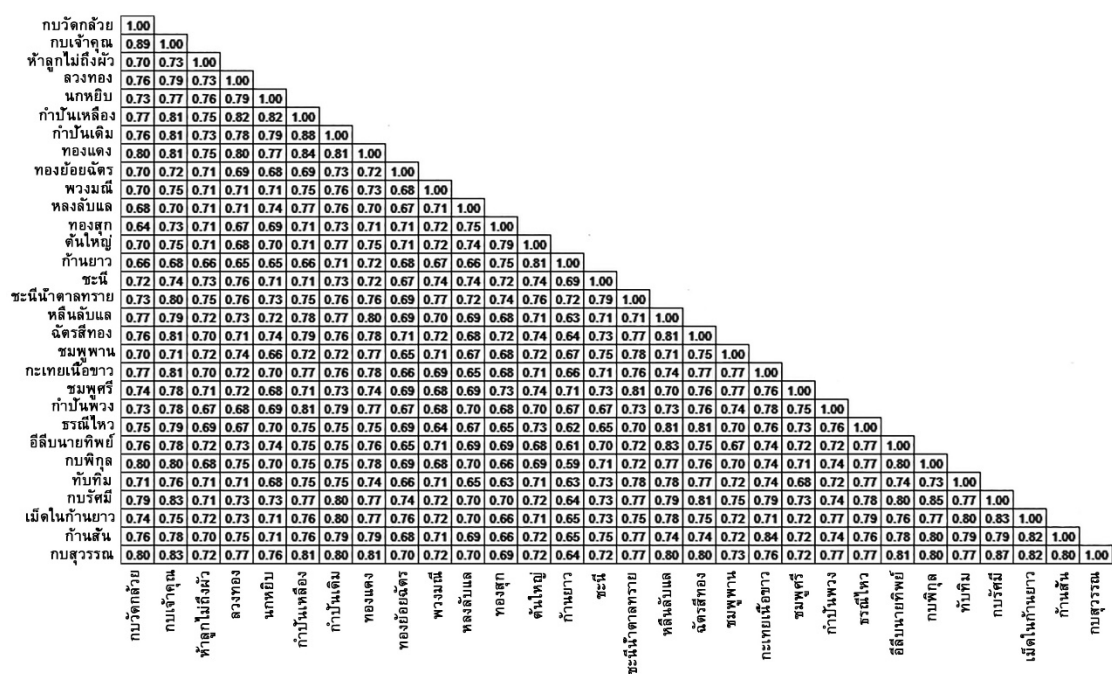
เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทุเรียนทั้ง 30 พันธุ์ ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์แบบสั้น 72 ชนิด พบไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิต 26 ชนิด คิดเป็น 36.11 เปอร์เซ็นต์

เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจน 20 ชนิด ได้แก่ A22, A24, A30, A31, A32, B22, B23, B32, C21, C22, C28, C31, D31, E22, E23, E24, E26, E31, E32 และ

F31 นำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนทั้ง 30 พันธุ์ พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอรวม 240 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 205 แถบ (85.42 เปอร์เซ็นต์) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความหลากหลาย 33 แถบ (14.58 เปอร์เซ็นต์) มีขนาดประมาณ 300-2,500 คู่เบส (ตารางที่ 1) โดยใช้ไพรเมอร์ C21 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 20 แถบ และไพรเมอร์ A30 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 1 แถบ โดยตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนที่ได้จากไพรเมอร์ F31 แสดงในรูปที่ 1

เมื่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.59-0.89 (รูปที่ 2) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 3 ซึ่งเมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.69 สามารถแบ่งทุเรียนเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มเล็ก ประกอบด้วยทุเรียน 4 พันธุ์ ได้แก่ หลงลับแล ทองสุก ต้นใหญ่ และก้านยาว ส่วนกลุ่มสองเป็นกลุ่มใหญ่ ประกอบด้วยทุเรียน 26 พันธุ์ ได้แก่ กบวัดกล้วย

กบเจ้าคุณ กบพิกุล กบรัสมิ์ กบสุวรรณ หลินลับแล อีลีนายทิพย์ จัตรสีทอง ธรณีไหว ทับทิม เม็ดใน ก้านยาว ก้านสั้น ลวงทอง กำปั่นเหลือง กำปั่นเดิม ทองแดง นกหยิบ กะเทยเนื้อขาว กำปั่นพวง ชะนี ชะนีน้ำตาลทราย ชมพูศรี ชมพูบาน ห้าลูกไม่ถึงฝั้ว พวงมณี และทองย้อยฉัตร โดยทุเรียนที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด คือ กบเจ้าคุณกับกบวัดกล้วย มีค่าดัชนีความเหมือน 0.89 ส่วนทุเรียนที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด คือ ก้านยาวกับกบพิกุล มีค่าดัชนีความเหมือน 0.59



รูปที่ 2 ค่าดัชนีความเหมือนของทุเรียน 30 พันธุ์ ที่ได้จากแอตอาร์เอฟอี

3.2 การอภิปรายผล

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนด้วยเทคนิคแอตอาร์เอฟอีและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.69 พบว่าสามารถแบ่งทุเรียนเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มเล็ก (ได้แก่ หลงลับแล ทองสุก ต้นใหญ่ และก้านยาว) และกลุ่มสองเป็นกลุ่มใหญ่ ซึ่ง

ภายในกลุ่มใหญ่สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย โดยมีทุเรียนบางพันธุ์แยกอยู่เดี่ยว ๆ ไม่มีความใกล้ชิดกับทุเรียนพันธุ์อื่นเลย

เมื่อเปรียบเทียบกับการจัดแบ่งกลุ่มทุเรียนด้วยลักษณะสัณฐาน ซึ่งแบ่งเป็น 5 กลุ่ม พบว่ากลุ่มแรกที่เป็นกลุ่มเล็กนั้น ประกอบด้วยทุเรียนพันธุ์หลงลับแลซึ่งอยู่ในกลุ่มเบ็ดเตล็ด ส่วน

ทุเรียนพันธุ์ทองสุก ต้นใหญ่ และก้านยาวจัดอยู่ในกลุ่มก้านยาว มีค่าดัชนีความเหมือนภายในกลุ่ม 0.75-0.79 โดยทุเรียนกลุ่มเบ็ดเตล็ดนั้นจะมีลักษณะของทรงใบบริเวณปลายใบ ฐานใบ ทรงผล และหนามผลไม่ชัดเจน บางลักษณะอาจเหมือนทุเรียนในกลุ่มอื่น และมักมีลักษณะที่ผันแปรออกไป (หิรัญ และคณะ, 2530) โดยการจัดกลุ่มของกลุ่มเล็กนี้แสดงให้เห็นว่าทุเรียนพันธุ์หลงลับแลมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับทุเรียนกลุ่มก้านยาว

กลุ่มสองเป็นกลุ่มใหญ่ แบ่งได้หลายกลุ่มย่อย และบางพันธุ์ไม่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์อื่นเลย ในกลุ่มย่อย เช่น กลุ่มย่อยของกลุ่มกบ ได้แก่ กบวัดกล้วย กบเจ้าคุณ กบพิกุล กบรัศมี และ กบสุวรรณ มีค่าดัชนีความเหมือนภายในกลุ่ม 0.79-0.89 กลุ่มย่อยของกลุ่มหลวง ได้แก่ ชมพูศรี ชะนี ชะนีน้ำตาลทราย และชมพูบาน มีค่าดัชนีความเหมือนภายในกลุ่ม 0.73-0.81 ส่วนพันธุ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับพันธุ์อื่นเลย เช่น พันธุ์ห้าลูกไม่ถึงฝั้ว ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเบ็ดเตล็ด

ในแผนภูมิความสัมพันธ์จะเห็นว่าทุเรียนที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีลักษณะพื้นฐานเดียวกัน ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน แต่มีบางพันธุ์ที่ไม่เป็นไปตามการจัดกลุ่มด้วยลักษณะพื้นฐาน เช่น หลวงทอง ที่อยู่ในกลุ่มหลวง ซึ่งอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับกลุ่มก้านยาว จากงานวิจัยก่อนหน้าเรื่องการศึกษาความสัมพันธ์ทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี 14 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี สามารถแบ่งกลุ่มเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรก คือ กลุ่มกบทั้งหมด และกลุ่มสอง ประกอบด้วยกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มย่อยแรก มีกลุ่มหลวงและกลุ่มทองย้อย ส่วนกลุ่มย่อยที่สอง มีกลุ่มก้านยาว กลุ่มทองย้อย และกลุ่มก้าน ซึ่งพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มหลวงกับกลุ่มก้านเป็นกลุ่มย่อยที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (Vanijajiva, 2011) โดยผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ คือ กลุ่มหลวง กลุ่มก้าน และกลุ่มทองย้อยจัดอยู่ในกลุ่มใหญ่

เดียวกัน แต่ที่ไม่สอดคล้องกัน คือ ทุเรียนในจังหวัดนนทบุรีที่อยู่ในกลุ่มกบ จะจัดอยู่กับคนละกลุ่มกับกลุ่มหลวง กลุ่มทองย้อย และกลุ่มก้าน ซึ่งต่างจากผลงานวิจัยนี้ที่กลุ่มก้านยาวทั้งหมดเป็นกลุ่มเล็กที่แยกออกจากกลุ่มใหญ่

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียน 30 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี ในครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ วิธาทพร และคณะ (2549) ที่จำแนกทุเรียนในศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี จำนวน 130 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มทุเรียนเป็น 2 กลุ่ม และทั้ง 2 กลุ่ม สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม และบางพันธุ์ไม่มีไม่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์อื่นเลย โดยการจัดกลุ่มย่อยนั้นไม่ได้จัดตามลักษณะสัณฐาน อย่างไรก็ตาม แม้ว่าแผนภูมิความสัมพันธ์แสดงให้เห็นว่าทุเรียนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แต่ก็ยังคงมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงเช่นกัน นอกจากนั้น มีรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นกับทุเรียน เช่น ดีเอเอฟ (DAF, DNA amplification fingerprinting) (ทรงพล และคณะ, 2548) เอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence repeat) หรือไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) (เอมอร และคณะ, 2556; สุดา และคณะ, 2557)

งานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีพบมีทั้งในสัตว์และพืช ตัวอย่างการศึกษาในสัตว์ เช่น การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมของพยาธิจากกระเพาะอาหารในกระบือโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 4 ชนิด ซึ่งผลการวิจัยแสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพยาธิแต่ละชนิด ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างกันของพยาธิในกระเพาะอาหารและเป็นประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยโรค (Puttalakshamma *et al.*, 2014) การตรวจหาพยาธิใบไม้วงศ์ *Heterophyidae* บางชนิดในระยะตัวเต็มวัยและระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria)

ในประเทศไทยด้วยไฟรเมอร์ 9 ชนิด พบว่าไฟรเมอร์ 8 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 180 แถบ ขนาดประมาณ 160-2,865 คู่เบส โดยผลการวิจัยนี้สามารถจำแนกสายพันธุ์พยาธิใบไม้ได้ทั้ง 2 ระยะ และเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ใช้ตรวจสอบได้ทุกสายพันธุ์ แม้ว่าในแต่ละระยะของพยาธิใบไม้ั้นเจริญเติบโตในโฮสต์ (host) ต่างกัน แต่รูปแบบของดีเอ็นเอสามารถยืนยันได้ว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกัน (Wongsawad and Wongsawad, 2007)

ส่วนตัวอย่างการศึกษาในพืช ได้แก่ การตรวจสอบพันธุ์ลินจี่ลูกผสมโดยใช้ไฟรเมอร์ 10 ชนิด ซึ่งมีการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อแม่กับลูกผสม เพื่อศึกษาว่าลินจี่ลูกผสมสายพันธุ์ใดได้รับการถ่ายทอดลักษณะที่ดีที่สุดจากทั้งพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ (Chundet *et al.*, 2007) การศึกษารูปแบบของ DNA methylation ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ในลำไยและผักขม (Anuntalabhochai *et al.*, 2009) เป็นต้น

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีสามารถใช้ประโยชน์ในด้านการระบุชนิด/พันธุ์ของสิ่งมีชีวิต และใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตให้ชัดเจนยิ่งขึ้น รวมถึงใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เพื่อประโยชน์ในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์ปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสม และคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะดีเพื่อให้ได้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพดีกว่าเดิม และตรงตามความต้องการของตลาด ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการค้าในอนาคต

4. สรุป

เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทุเรียนด้วยไฟรเมอร์ 20 ชนิด ที่ได้จากการคัดเลือก โดยพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 240 แถบ ขนาด 300-2,500 คู่เบส ซึ่งเป็น

แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 205 แถบ เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และเลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA สามารถแบ่งทุเรียนเป็น 2 กลุ่ม มีค่าดัชนีความเหมือน 0.59-0.89 อย่างไรก็ตาม ผลการจัดกลุ่มไม่ได้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มทุเรียนในประเทศไทยด้วยลักษณะสัณฐาน เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยผลการวิจัยนี้สามารถใช้ประโยชน์ในทางการค้าและการปรับปรุงพันธุ์ทุเรียน

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณชจร พงษ์สุขนิรันดร์ เจ้าของสวนบ้านเรา ตำบลกระแสบน อำเภอกาหลง จังหวัดระยอง ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบทุเรียนสำหรับการวิจัยครั้งนี้

6. รายการอ้างอิง

- จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, เปรมณัช ขุนปักษ์, ชีระชัย ธนนันต์ และณฤมล ธนนันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกผักกาดด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 3: 23-28.
- จุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว, ชีระชัย ธนนันต์ และณฤมล ธนนันต์, 2559, การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมูในไกรเซอร์ซูเร และลูกผสมด้วยแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 5: 77-87.
- จิตาพร มณีเนตร, ชีระชัย ธนนันต์ และณฤมล ธนนันต์, 2560, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมูแคลิสตาด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 6: 316-323.
- ทรงพล สมศรี, 2551, ทุเรียนไทยและการปรับปรุงพันธุ์ : กรณีศึกษาพันธุ์จันทบุรี 1 จันทบุรี 2

- จันทบุรี 3, สำนักพิมพ์กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- ทรงพล สมศรี, ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, วนิดา งามเงิน และธีระวุฒิ วงศ์วรรัตน์, 2548, การจำแนกชนิด พันธุ์ สายต้นทุเรียน (*Durio spp.*) ด้วยเทคนิค DNA amplification fingerprinting (DAF), ว.วิชาการเกษตร. 23(2): 188-210.
- ปิยดา บุสดี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcl* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 983-993.
- นฤมล ธนานันต์, จิตติพร ไท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.
- นฤมล ธนานันต์, ภัทรา หงษ์ทองดี และธีระชัย ธนานันต์, 2559, การจำแนกชนิดและการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟพีดี, Thai J. Sci. Technol. 5: 88-97.
- พิทักษ์ ใจคง, 2550, ปฏิบัติการพืชเศรษฐกิจ (Economic Botany Laboratory) : พืชผลไม้, มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ. 437 น.
- วริสรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 102-112.
- สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544, ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์ทุเรียน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- หิรัญ หิรัญประดิษฐ์, สุขวัฒน์ จันทรปารานิก และเสริมสุข สลักเพ็ชร์, 2541, เทคโนโลยีการผลิตทุเรียน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- หิรัญ หิรัญประดิษฐ์ และทรงพล สมศรี, 2530, การคัด clone ทุเรียนพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน, รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2530, สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- เอมอร รุ่งแจ้งสุวรรณ, ปิยรัชฎ์ เจริญทรัพย์, วิษุวัต สงวนวล, อุษณีย์ พิชกรรม, และศศิวิมล แสงผล, 2556, การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์ทุเรียน (*Durio zibethinus* L.) ในจังหวัดนนทบุรีโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์, น. 45., การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 7, มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.
- ฮุดา แก้วศรีสม, กรกช นาคคอง, และจรัสศรี นวลศรี, 2557, การวิเคราะห์พันธุกรรมของทุเรียนพื้นบ้านในภาคใต้โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์, ว.แก่นเกษตร 42: 271-276.
- Anuntalabhochai, S., Chandet, R., Chiangda, J. and Apavatjirut, P., 2000, Genetic diversity within Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis, Acta Hort. 575: 253-259.
- Anuntalabhochai, S., Chundet, R., Buapong, N. and Cutler, R.W., 2009, Detection of DNA hypomethylation mediated floral induction in Longan and Spinach using the HAT-RAPD technique, Am. J. Appl. Sci. 6: 361-367.
- Chundet, R., Cutler, R.W., Tasanon, M. and Anuntalabhochai, S., 2007, Hybrid detection in Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars using HAT-RAPD markers, Sci. Asia. 33: 307-311.

- Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J., 2009, Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants, *Plant Mol. Biol. Rep.* 27: 86-93.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Lim, T.K., 1990, *Durian: Diseases and disorders*, Tropical Press Sdn. Bhd., Kuala Lumpur, Malaysia.
- Macmillan, H.F., 1949, *Tropical planting and gardening*, 5th Ed., Macmillan, London.
- Mendoza, D.R., 1941, Natural distribution of durians in the Philippines, *Phil. J. Forest.* 4: 27-35.
- Rohlf, F.J., 2002, *NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Applied Biostatistics, Inc., New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Vanijajiva, O., 2011, Genetic variability among durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand detected by RAPD analysis, *J. Agri. Tech.* 7: 1107-1116.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zebeau, M., 1995, AFLP: A new technique for DNA fingerprintings, *Nucleic. Acids. Res.* 23: 4407-4414.
- Weising, K., Nybom, H., Wolf, K. and Kahl, G., 2005, *DNA Finger Printing in Plants*, 2nd Ed., CRS Press, Boca Raton, F.L.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wongsawad, P. and Wongsawad, C., 2007, DNA fingerprints of some heterophyid trematodes from adult and metacercarial stages in Thailand, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 38: 110-114.