การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยจีโนม AAA ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

Genetic Relationship Assessment among *Musa* AAA Genome Using HAT-RAPD

ศิริญยา คาชิมา, ธีระชัย ธนานันต์ และยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Sirinya Kashima, Theerachai Thanananta and Yongsak Kachonpadungkitti*

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

Received: April 10, 2019; Accepted: April 26, 2019

บทคัดย่อ

กล้วยหอมเป็นพืชเศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรไทยเป็นอย่างมาก ปัจจุบันมีการขยายพื้นที่เพาะปลูกเพิ่มมากขึ้นและมีการปรับปรุงพันธุ์อย่างแพร่หลาย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยหอมจีโนม AAA 13 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ 18 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจน เมื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอรวม 240 แถบ ขนาดประมาณ 250-3,000 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความหลากรูป 199 แถบ (82.92 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.65 ถึง 0.91 และสามารถแบ่งกล้วยหอมเป็น 3 กลุ่ม โดยผลการวิจัยนี้สามารถใช้ประโยชน์ในการวางแผนอนุรักษ์พันธุ์และปรับปรุงพันธุ์กล้วยต่อไป

คำสำคัญ : กล้วยหอม; สกุลมิวซา; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; แฮตอาร์เอพีดี

Abstract

Musa (AAA group) ‘Kluai Hom’ is an economic crop that generates a lot of income for Thai farmers. Nowadays, the area for growing bananas has been expanded with widespread breeding. This study, the high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to estimate the genetic relationship among 13 cultivars of Kluai Hom, using 72 random primers. The 18 primers with clear amplified products were selected to use for DNA fingerprinting, resulting in

**Corresponding author: yongsakk@hotmail.com* DOI: 10.14456/tjst.2019.38

240 DNA bands ranging from 250 to 3,000 bp. The number of polymorphic bands was 199 (82.92 %). Furthermore, a dendogram was constructed based on similarity coefficients using UPGMA together with the NTSYS-pc version 2.01e. The dendrograms showed three major groups which similarity coefficients ranging from 0.65 to 0.91. The result of this research could further be useful for planning conservation and breeding program.

Keywords: Kluai Hom; *Musa*; genetic relationship; DNA marker; HAT-RAPD

1. คำนำ

กล้วยหอม (Kluai Hom, *Musa acuminata*) เป็นพืชเศรษฐกิจหลักชนิดหนึ่งของเกษตรกร ซึ่งปลูกได้แทบทุกภูมิภาคของประเทศไทย ลักษณะทั่วไป คือ มีลำต้นแท้อยู่ใต้ดิน (rhizome) มีลำต้นเทียม (psuedostem) สูงประมาณ 3-5 เมตร กาบลำต้นเทียม (leaf sheath) ด้านนอกมีแถบดำ ใบเดี่ยวเป็นแบบขนาน ก้านใบมีร่องค่อนข้างกว้าง ดอกหรือปลีเมื่อแทงออกในช่วงแรกจะตั้งตรงและค่อย ๆ โค้งงอลงด้านล่าง ปลีรูปไข่ ค่อนข้างแหลมยาว ผลดิบมีสีเขียว เมื่อสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เนื้อมีสีเหลืองเข้ม กลิ่นหอม (ราชันย์ และสมราน, 2557) กล้วยหอมแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กล้วยหอมเขียวคาเวนดิช (*Musa acuminata* ‘Cavendish’) กล้วยหอมทองกรอสมิเชล (*Musa acuminata* ‘Gros Michel’) และกล้วยนาก (*Musa acuminata* ‘Red Dacca’) แต่ละพันธุ์จะมีรสชาติที่ต่างกัน (เบญจมาศ, 2558)

การจำแนกกล้วยด้วยลักษณะภายนอกร่วมกับการนับจำนวนโครโมโซม สามารถจำแนกกล้วยเป็นเพียงแค่กลุ่มใหญ่ ๆ เท่านั้น และกล้วยหอมที่ปลูกกันทั่วไปก็มีลักษณะภายนอกที่ไม่ค่อยต่างกัน จึงอาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ง่าย นอกจากนั้นในการจำแนกกล้วยหอมด้วยลักษณะภายนอกต้องใช้ระยะเวลานานเท่ากับการเจริญเติบโตของกล้วยจนกระทั่งออกปลีและผล จึงจะสามารถระบุเป็นเพียงกลุ่มกล้วยหอม แต่ไม่สามารถยืนยันพันธุ์ที่แน่ชัด

ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงมีความจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจากดีเอ็นเอในการจำแนกกล้วยหอมออกจากกันให้อย่างชัดเจนและถูกต้อง ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้กันอย่างแพร่ หลาย โดยใช้บ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิต เป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างทั้งระหว่างและภายในพันธุ์ (variety) หรือสายพันธุ์ (breeding line) (สุรีพร, 2546) นอกจากนี้มีรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) และตรวจสอบการกลายแบบ somaclonal variation ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอต่าง ๆ ได้แก่ ไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) (Rahman *et al*., 2001) ไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter simple sequence repeat) (Hu *et al*., 2011; Bello-Bello *et al*., 2014) อาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) (Jayanthi *et al*., 2018)

ด้วยความสำคัญดังกล่าว ผู้วิจัยจึงประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยหอมจีโนม AAA ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - random amplified polymorphic DNA) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR, polymerase chain reaction) เป็นพื้นฐาน สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างขึ้น โดยไม่ต้อง

ทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ และมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น (สุรกฤษฎิ์ และคณะ, 2561)

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกล้วยหอมจีโนม AAA

กล้วยหอมที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เก็บตัวอย่างใบจากสวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติต์ พระบรมราชินีนาถ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร จำนวน 13 พันธุ์ ได้แก่ (1) กล้วยหอมศรีษะเกษ (2) กล้วยหอมแกรนด์แนน (3) กล้วยไข่ (4) กล้วยหอมมาแนงค์ (5) กล้วยหอมทองโฮะ (6) กล้วยมัน (7) กล้วยหอมค่อม (8) กล้วยหอมทองอยุธยา (9) กล้วยมาฮอย (10) กล้วยหอมเขียวค่อมดิเอ็มเมอรัล (11) กล้วยหอมเขียวค่อม (12) กล้วยหอมทองกาบดำ และ (13) กล้วยทูม็อค

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยหอมจีโนม AAA ด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) จากนั้นตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เพื่อตรวจดูแถบดีเอ็นเอ (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

2.3.1 ตรวจหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

รวมดีเอ็นเอกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ โดยผสมลงในหลอดเดียวกันในปริมาณเท่า ๆ กัน แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์ชุด A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 ซึ่งมีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ (Wako company, Japan)

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (นฤมล และคณะ, 2556)

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์

โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของกล้วยทั้งหมด จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีสิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและถ่ายภาพ

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ โดยพันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งให้สัญลักษณ์เป็น 1 ส่วนพันธุ์ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันให้สัญลักษณ์เป็น 0 แล้วคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendogram) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic Mean) (Rohlf, 2002)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

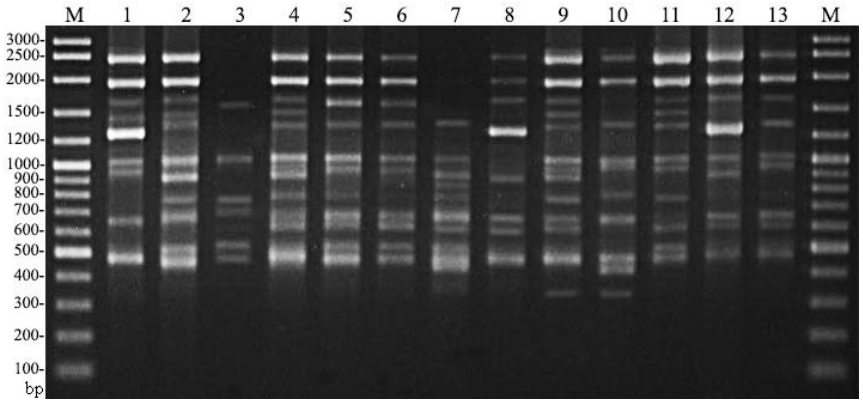
3.1 ผลการวิจัย

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยมี 30 ชนิด คิดเป็น 41.67 เปอร์เซ็นต์ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนได้ 18 ชนิด ได้แก่ A24, A29, A30, A31, A32, B22, B23, C21, C22, C28, C29, E22, E23, E31, E32, F23, F25 และ F31 เมื่อนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ พบว่าปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 240 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 250-3,000 คู่เบส (ตารางที่ 1) พบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูป (polymorphism) จำนวน 199 แถบ (คิดเป็น 82.92 เปอร์เซ็นต์) แถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความหลากรูป 41 แถบ (คิดเป็น 17.08 เปอร์เซ็นต์)

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แฮตอาร์เอพีดีทั้ง 18 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ E32, F23 และ F25 สามารถแยกกล้วยหอมจีโนม AAA

ตารางที่ 1 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มของแฮตอาร์เอพีดี 18 ชนิด

ลำดับ	ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′→3′)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			เปอร์เซ็นต์ความหลากรูป
			ทั้งหมด	ที่มีความหลากรูป	ที่ไม่มีความหลากรูป	
1	A24	CTCCTGCTGTTG	10	8	2	80.00
2	A29	GGTTCGGGAATG	11	8	3	72.73
3	A30	GACCTGCGATCT	9	8	1	88.89
4	A31	AAGGCGCGAACG	16	12	4	75.00
5	A32	TTGCCGGGACCA	11	10	1	90.91
6	B22	GGTGACTGGTGG	9	6	3	66.67
7	B23	GGTGCCGGAGCA	9	8	1	88.89
8	C21	GGAGAGCGGACG	11	8	3	72.73
9	C22	GGTCACCGATCC	20	19	1	95.00
10	C28	GTCGACGCATCA	14	9	5	64.29
11	C29	GTCGCCTTACCA	10	7	3	70.00
12	E22	GGAATGGAACCG	10	6	4	60.00
13	E23	AGGTACGCCGCA	14	12	2	85.71
14	E31	GAGGACAGCAA	18	15	3	83.88
15	E32	CAGGAACAGCAA	15	13	2	86.67
16	F23	CCATCCGCACGA	18	16	2	88.89
17	F25	CCAGATCCGAAT	17	17	0	100.00
18	F31	ATCGTGACGCCG	18	17	1	94.44
		รวม	240	199	41	82.92



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ F25 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler^{TM} 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific); 1-13 คือ พันธุ์กล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ ได้แก่ (1) กล้วยหอมศรีษะเกษ (2) กล้วยหอมแกรนด์แนน (3) กล้วยไข้ (4) กล้วยหอมมาแนงค์ (5) กล้วยหอมทองโฮะ (6) กล้วยมัน (7) กล้วยหอมค่อม (8) กล้วยหอมทองอยุธยา (9) กล้วยมาฮอย (10) กล้วยหอมเขียวค่อมดิเอ็มเมอรัล (11) กล้วยหอมเขียวค่อม (12) กล้วยหอมทองกาบดำ และ (13) กล้วยทูม็อค]

ทั้ง 13 พันธุ์ โดยไพรเมอร์ C22 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 20 แถบ และไพรเมอร์ A30, B22 และ B23 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 9 แถบ โดยตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยหอมจีโนม AAA ที่ได้จากไพรเมอร์ F25 แสดงในรูปที่ 1

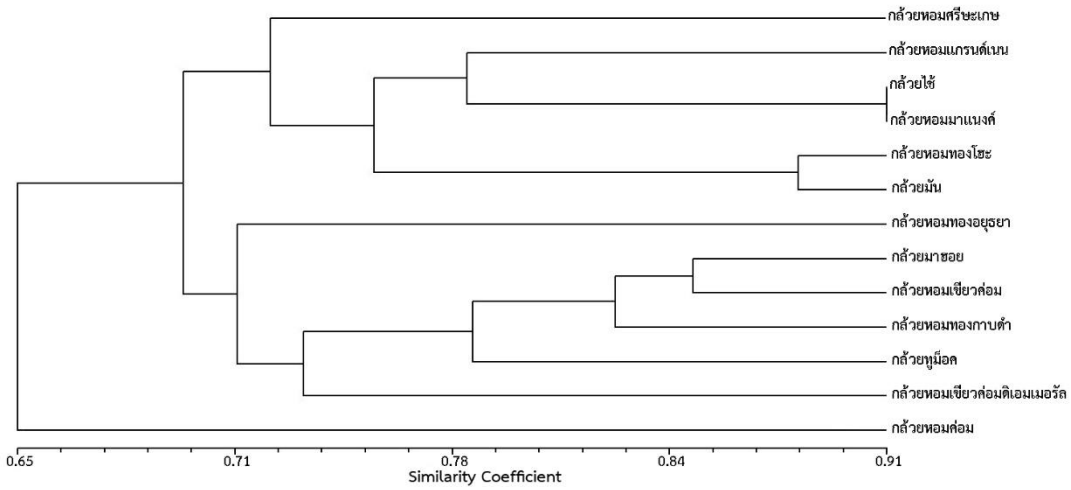
วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.65 ถึง 0.91 แสดงดังรูปที่ 2 เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 3 และเมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.69 สามารถแบ่งกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ เป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกล้วย 6 พันธุ์ ได้แก่ กล้วยหอมศรีษะเกษ กล้วยหอมแกรนด์แนน กล้วยไข้ กล้วยหอมมาแนงค์ กล้วยหอมทองโฮะ และกล้วยมัน กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยกล้วย 6 พันธุ์ ได้แก่ กล้วยหอมทองอยุธยา กล้วยมาฮอย กล้วยหอมเขียวค่อม กล้วยหอมทองกาบดำ กล้วยหอมทูม็อค และกล้วยหอมเขียวค่อมดิเอ็มเมอรัล กลุ่ม 3 ประกอบด้วยกล้วย 1 พันธุ์ ได้แก่ กล้วยหอมค่อม โดยกล้วยหอมที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากที่สุด คือ กล้วยไข้และกล้วยหอมมาแนงค์ มีค่าดัชนีความเหมือน 0.91 ส่วนกล้วยหอมที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดน้อยที่สุด คือ กล้วยหอมเขียวค่อมและกล้วยหอมค่อม มีค่าดัชนีความเหมือน 0.60

3.2 อภิปรายผล

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.69 แบ่งกล้วยหอมเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วยสมาชิก 6 พันธุ์ โดยกล้วยไข้และกล้วยมาแนงค์มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงมาก ซึ่งเมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานพบว่ากล้วยทั้ง 2 พันธุ์ คล้ายคลึงกันมาก ยกเว้นลักษณะผล โดยกล้วยไข้มีผลขนาดเล็กสั้นป้อม แต่กล้วยมาแนงค์มีผลค้ายกล้วยเล็บมือนาง แต่มีเปลือกหนากว่า (สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ, 2554)

	กล้วยหอมศรีษะเกษ	กล้วยหอมแกรนด์เนน	กล้วยไข่	กล้วยหอมมาแนงค์	กล้วยหอมทองโฮะ	กล้วยมัน	กล้วยหอมค่อม	กล้วยหอมทองอยุธยา	กล้วยมาฮอย	กล้วยหอมเขียวค่อมดิเอมเมอรัล	กล้วยหอมเขียวค่อม	กล้วยหอมทองกาบดำ	กล้วยหูม็อค
กล้วยหอมศรีษะเกษ	1.00												
กล้วยหอมแกรนด์เนน	0.76	1.00											
กล้วยไข่	0.73	0.78	1.00										
กล้วยหอมมาแนงค์	0.73	0.78	0.91	1.00									
กล้วยหอมทองโฮะ	0.72	0.78	0.76	0.82	1.00								
กล้วยมัน	0.67	0.71	0.70	0.75	0.88	1.00							
กล้วยหอมค่อม	0.62	0.64	0.69	0.69	0.67	0.65	1.00						
กล้วยหอมทองอยุธยา	0.65	0.68	0.65	0.67	0.71	0.70	0.71	1.00					
กล้วยมาฮอย	0.71	0.72	0.77	0.80	0.74	0.71	0.61	0.70	1.00				
กล้วยหอมเขียวค่อมดิเอมเมอรัล	0.62	0.64	0.70	0.71	0.65	0.64	0.65	0.69	0.74	1.00			
กล้วยหอมเขียวค่อม	0.64	0.66	0.71	0.74	0.71	0.72	0.60	0.69	0.85	0.75	1.00		
กล้วยหอมทองกาบดำ	0.69	0.72	0.75	0.75	0.71	0.68	0.62	0.75	0.84	0.69	0.81	1.00	
กล้วยหูม็อค	0.67	0.64	0.69	0.69	0.69	0.74	0.61	0.72	0.79	0.74	0.81	0.75	1.00

รูปที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ ที่สร้างจากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

กลุ่มที่สองประกอบด้วยสมาชิก 6 พันธุ์ เมื่อพิจารณาจากแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่ากล้วยมาฮอย กล้วยหอมเขียวค่อม กล้วยหอมทองกาบดำ กล้วยทูม็อค และกล้วยหอมเขียวค่อมดิเอมเมอรัล มีค่าดัชนีความเหมือนภายในกลุ่ม 0.74-0.85 โดยกล้วยทั้ง 5 พันธุ์ นี้จัดอยู่ในกลุ่มกล้วยหอมเขียวคาเวนดิช (Cavendish) ลักษณะโดยทั่วไป คือ มีลำต้นเทียมสูงประมาณ 1-4 เมตร มีจุดประดำมากติดต่อกันเป็นปื้นใหญ่ ส่วนผลมีขนาดใกล้เคียงกับกล้วยหอมทอง เนื้อมีสีขาวรสหวาน แต่เละเร็ว เมื่อสุกมีกลิ่นหอมฉุนค่อนข้างรุนแรง เมื่อสุกสีผิวจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง แต่ถ้าบ่มในอุณหภูมิต่ำประมาณ 15-22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ผิวจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทอง (เบญจมาศ, 2558)

กลุ่มที่สาม ได้แก่ กล้วยหอมค่อม เป็นพันธุ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์อื่นเลย เมื่อพิจารณาลักษณะสัณฐานพบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับกลุ่มที่สอง โดยมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.60-0.65

แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ ที่สร้างจากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี พบว่ากล้วยที่มีลักษณะสัณฐานคล้ายคลึงกันจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ พรประภา และคณะ (2560) ที่ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกกล้วยด้วยเครื่องหมายสก็อต (SCoT, start codon targeted) พบว่าสามารถจำแนกกล้วยทั้ง 25 พันธุ์ เป็น 2 กลุ่ม โดยกล้วยมาฮอยและกล้วยหอมทองกาบดำจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่กล้วยมาฮอยและกล้วยหอมทองกาบดำจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้พบว่ากล้วยหอมค่อมน่าจะจัดเป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (out group) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ พรประภา และคณะ (2560) งานวิจัยของ ฐิติพร และคณะ (2556) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุล *Musa* ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD) พบว่าสามารถจำแนกกล้วยทั้ง 10 พันธุ์ ออกจากกัน โดยกล้วยหอมเขียวและกล้วยหอมทองจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่กล้วยหอมเขียวค่อมและกล้วยหอมทองอยุธยาจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้มีรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นกับกล้วย เช่น เอสอาร์เอพี (SRAP, sequence related amplified polymorphism) (Pinar *et al*., 2015) ไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter simple sequence repeat) (Lu *et al.*, 2011) เอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence repeat) (Tarafdar *et al.*, 2017) เอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) (Opara *et al.,* 2010)

4. สรุป

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยหอมจีโนม AAA ทั้ง 13 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 18 ไพรเมอร์ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.65-0.91 เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA สามารถจัดกลุ่มกล้วยหอมเป็น 3 กลุ่ม สอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน ดังนั้นเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีจึงถือเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยหอมเช่นเดียวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น และผลการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการวางแผนอนุรักษ์พันธุ์และปรับปรุงพันธุ์กล้วยต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างใบกล้วยจากสวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ และขอขอบคุณทุนวิจัยจากกองทุนวิจัย

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ประจำปี 2561

6. รายการอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร, 2561, กล้วยกินได้ของกรมวิชาการเกษตร, เกินคุ้ม มีเดีย, นนทบุรี.

ฐิตาพร มณีเนตร, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายหมู่แคลิสตาด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 6: 316-323.

ฐิติพร โท้มโสภา, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวซาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. S1: 201-205.

นฤมล ธนานันต์, สุรีย์พร พุ่มเอี่ยม และธีระชัย ธนานันต์, 2556, การจำแนกพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21: 360-370.

เบญจมาศ ศิลาย้อย, 2558, กล้วย, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรประภา ศิริเทพทวี, ฐิตาพร มณีเนตร, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 271-278.

ราชันย์ ภู่มา และสมราน สุดดี, 2557, ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557, สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช, กรุงเทพฯ.

สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน), 2554, บัญชีรายการทรัพย์สินชีวภาพกล้วย, สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน), กรุงเทพฯ.

สุรกฤษฎิ์ สุขสกุล, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2561, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกบัวสายและลูกผสมด้วยแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 7: 418-426.

สุรีพร เกตุงาม, 2546, เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช, ว.วิชาการ ม.อบ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5(2): 37-59.

Bello-Bello, J.J., Iglesias-Andreu, L.G., Aviles-vinas, S.A., Gomez-Uc, E., Canto-Flick, A. and Santana-Buzzy, N., 2014, Somaclonal variation in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as assessed ISSR molecular markers, Hort. Sci. 49: 481-485.

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.

Hu J.B., Li Q. and Li J., 2011, ISSR analysis of somaclonal variation in callus-derived plants of *Amorphophallus rivieri* Durieu, Acta Biol. Cracov. Bot. 53/1: 120-124.

Jayanthi, M., Gupta, R., Mandal, P.K. and Singh, K.B.M., 2018, Analysis of somaclonal variation using molecular markers in *in vitro* regenerated *Chrysanthemum* cv. Pusa centenary, Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 7: 1642-1655.

Lu, Y., Zhang, X., Pu, J., Qi, Y. and Xie, Y., 2011, Molecular assessment of genetic identity and genetic stability in banana cultivars (*Musa* spp.) from China using

ISSR markers, Aust. J. Crop Sci. 1: 25-31.

Opara, U.L., Jacobson, D. and Al-Saady, N.A., 2010, Analysis of genetic diversity in banana cultivars (*Musa* cvs.) from the South of Oman using AFLP markers and classification by phylogenetic, hierarchical clustering and principal component analyses, J. Zhejiang Univ-Sci. (Biomed. & Biotech.), 11: 332-341.

Pinar, H., Unlu, M., Bircan, M., Baysal, F., Tuna, G.S., Tuna, M. and Ercisli, S, 2015, Genetic characterization of banana clones grown in Turkey based on nuclear DNA content and SRAP markers, J. Appl. Bot. Food Qual. 88: 222-227.

Rahman, M.H. and Rajora, O.P., 2001, Micro satellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*), Plant Cell Rep. 20: 531-536.

Rohlf, F.J., 2002, NTSYSpc 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.

Tarafdar, S., Gupta, K.S., Banerjee, S. and Shailja, D., 2017, Identification of SSR and ISSR markers associated to off-type somaclonal variants in micro-propagated banana, J. Biotech. Biochem, 3(2): 18-22.