

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระต้อน ด้วยเครื่องหมายสก็อต Genetic Relationship Assessment of Santol Using SCoT Markers

ธีระชัย ธนानันต์* และทีปกา มีเสงี่ยม

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

Theerachai Thanananta* and Teepaka Meesangiem

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Supattra Poeaim

Department of Biology, Faculty of science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang,

Chalongkrung Road, Ladkrabang, Bangkok 10520

บทคัดย่อ

กระต้อนเป็นผลไม้ไทยที่มีความสำคัญและได้รับความนิยม แต่การระบุพันธุ์ด้วยลักษณะสัณฐานยังมีความยุ่งยากและเกิดความสับสนได้ง่าย เนื่องจากมีพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมพันธุ์และการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้เครื่องหมายสก็อตมาตรวจสอบกระต้อน 22 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์สก็อต 80 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 13 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อตรวจสอบกับดีเอ็นเอของกระต้อนแต่ละตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.55 ถึง 0.93 (เฉลี่ย 0.715) โดยผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากระต้อนในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง มีพันธุ์จำนวนมาก และในแต่ละพันธุ์มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง

คำสำคัญ : กระต้อน; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; เครื่องหมายสก็อต

Abstract

Santol [*Sandoricum koetjape* (Burm. f.) Merr.] is one of the important and popular fruits in Thailand. Identification based on morphology is difficult and easily confused because of the occurrence of new varieties from breeding and asexual propagation. Start codon targeted (SCoT) markers were used to identify 22 samples of santol. The total 80 SCoT primers were screened, then 13 primers could be used for DNA amplification to analyze all samples. The result showed differences among 22 samples with specific DNA bands. A dendrogram based on polymorphic bands showed genetic similarities among santol with similarity coefficients ranging from 0.55 to 0.93. Finally, these results indicated that genetic diversity of santol in Thailand is quite high, there are many varieties, and each varieties has a high genetic variability.

Keywords: santol; genetic relationship; DNA marker, SCoT marker

1. บทนำ

กระท้อน (santol) เป็นไม้ผลยืนต้นที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน ทนต่อลมและความแห้งแล้งได้ดี เจริญเติบโตด้วยการแตกกิ่งก้านสาขาออกเป็นพุ่ม ถ้าเจริญเติบโตจากเมล็ดจะมีลำต้นและทรงพุ่มที่ใหญ่มาก [1] กระท้อนจัดอยู่ในวงศ์กระท้อน (Meliaceae) ซึ่งสมาชิกของพืชในวงศ์นี้ทั่วโลกประกอบด้วย 50-52 สกุล (genus) ประมาณ 650 ชนิด (species) พบการกระจายพันธุ์ในเขตร้อนชื้น [2]

ประเทศไทยพบพืชในวงศ์กระท้อน 18 สกุล 84 ชนิด 3 ชนิดย่อย (subspecies) และ 4 พันธุ์ (variety) พืชในวงศ์นี้ที่พบในประเทศไทยส่วนมากเป็นไม้ต้น ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจ 2 สกุล คือ สกุลกระท้อน (*Sandoricum*) และสกุลกลางสาด (*Lansium*) โดยพืชสกุลกระท้อนในประเทศไทยแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ (1) *Sandoricum beccarianum* Baill. มีชื่อพ้อง คือ *S. emarginatum* มีชื่อท้องถิ่นว่า สะท้อนนก (sathon nok) สะท้อนพรุ (sathon phru) และสะโตบุง (sato burong) กระจายพันธุ์ในป่าดิบชื้นที่ลุ่มต่ำ น้ำขัง และในป่าพรุทางภาคใต้ของประเทศไทย ผลสุกใช้รับประทาน มีรสหวานอมเปรี้ยว เนื้อไม้ใช้ก่อสร้างและ

ตกแต่งภายในอาคารบ้านเรือน และ (2) *Sandoricum koetjape* (Burm. f.) Merr. มีชื่อพ้อง คือ *Melia koetjape*, *S. indicum*, *S. nervosum*, *S. maingayi* มีชื่อสามัญว่า sentul, santol, red sentol, yellow sentol ส่วนชื่อท้องถิ่นเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละภาค เช่น กระท้อน (ภาคกลาง) กะท้อน (นครราชสีมา) เตียน ล้อน สะท้อน (ภาคใต้) มะต๋อง (ภาคเหนือ อุดรธานี) มะตั้น (ภาคเหนือ) สติยา สะตุ (นราธิวาส) สะโต (ปัตตานี) [3] โดยกระท้อนสามารถปลูกได้ดีแทบทุกแห่งในประเทศไทย แต่กระท้อนที่ปลูกกันทั่วไปเป็นชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งลักษณะของปุยและรสชาติจะแตกต่างกันออกไปในแต่ละพันธุ์ [1]

ปี พ.ศ. 2554 มีรายงานการผลิตกระท้อนในพื้นที่ภาคกลาง 5 จังหวัด คือ ลพบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี นนทบุรี และชัยนาท พบว่าจังหวัดลพบุรีมีผลผลิตสูงสุดรวมมูลค่า 17.52 ล้านบาท ผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมซื้อกระท้อนรับประทานแบบผลไม้ ซึ่งกระท้อนพันธุ์ปุยฝ้ายได้รับความนิยมสูงสุด เนื่องจากมีรสหวาน เปลือกนํม และเมล็ดมีปุยเหมือนปุยฝ้าย โดยมีการปรับปรุงคุณภาพผลผลิตให้ได้คุณภาพตรงความต้องการของตลาด มีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมพันธุ์

และขยายพันธุ์ที่เกิดการกลายพันธุ์ไปจากเดิม ซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายของพันธุ์ตามความนิยมสามารถจำแนกด้วยลักษณะสัณฐาน (morphology) ตามเนื้อสัมผัส รสชาติ ลักษณะของรูปร่าง และขนาดของผล รวมทั้งมีการตั้งชื่อขึ้นใหม่อีกหลายชื่อ [1]

ปัจจุบันมีพันธุ์กระท้อนหลากหลายพันธุ์ ได้แก่ ผอบทอง เขียวหวาน ชันทอง ตาอยู่ เทพรส เทพสำราญ อีโหว่อีเปือก อีเมฆ อีท้ายครัว อีแป้น อีจืด หลังห่อ บัวขาว ทองหยิบ ทองหยอด อินทรชิต ทองใบใหญ่ ไกรทอง บางกร่าง นวลจันทร์ และตาอยู่ เป็นต้น โดยพันธุ์ที่เกษตรกรชาวสวนนิยมปลูกและเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ได้แก่ ปุยฝ้าย อีลา นิ่มนวล และทับทิม และบางพันธุ์ใกล้สูญพันธุ์ เช่น ทองก้ามหอย [1] อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานการศึกษาความแตกต่างของพันธุ์กระท้อน ทั้งลักษณะสัณฐานที่มีความแตกต่างกันและความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ดังนั้นจึงเป็นเรื่องเร่งด่วนและจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาพืชสกุลนี้ในประเทศไทย รวมทั้งการหาหลักฐานและเครื่องมือที่น่าเชื่อถือชนิดต่าง ๆ เข้ามาใช้ร่วมกับการศึกษาที่จะช่วยในการจัดจำแนกพืชสกุลกระท้อนให้เป็นระบบ และส่งผลให้ข้อมูลการจำแนกและการจัดกลุ่มที่ได้มีความน่าเชื่อถือ สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการระบุพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ได้ในอนาคต

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นอีกเครื่องมือหนึ่งที่ช่วยในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วในการจำแนกสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้เพื่อสร้างข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาพืชสกุลกระท้อนให้เป็นพืชทางเศรษฐกิจที่ยั่งยืนต่อไป ด้วยความสำคัญดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเครื่องหมายสก็อต (SCoT marker, start codon targeted marker) [4,5] โดย

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์หรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ (primer) ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพียงชนิดเดียวเพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ ประหยัดค่าใช้จ่าย และให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแต่ละพันธุ์

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกระท้อน

เก็บตัวอย่างใบกระท้อน จำนวน 22 ตัวอย่าง จากสวนเกษตรในจังหวัดต่าง ๆ ของประเทศไทย (ตารางที่ 1)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอกระท้อน

สกัดดีเอ็นเอจากใบกระท้อนด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [16] โดยบดใบกระท้อน 2-3 กรัม ใน extraction buffer [4x CTAB; 4 % cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), 0.6 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M NaCl, 20 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium metabisulfite] 20 มิลลิลิตร ซึ่งมี 2-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร และ polyvinylpyrrolidone (PVP) 0.3 กรัม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงแยกสารละลายใสส่วนบนมาเติม linear polyacrylamide 140 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

ตารางที่ 1 รหัสตัวอย่าง ชื่อพันธุ์ แหล่งที่มา ขนาดผล และความหวานของกระท้อน 22 ตัวอย่าง ที่ใช้ในการวิจัย

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ชื่อพันธุ์	แหล่งที่มา	ขนาดผล ¹	ความหวาน ²
1	KT14	ทองกำมะหยี่	ลพบุรี	เล็ก	น้อย
2	KT20	ถมทอง	ลพบุรี	เล็ก	ปานกลาง
3	KT22	ปุยฝ้าย	นนทบุรี	กลาง	มาก
4	KT23	ปุยฝ้าย	นนทบุรี	กลาง	ปานกลาง
5	KT27	ชั้นทอง	นนทบุรี	เล็ก	น้อย
6	KT29	ทับทิม	นนทบุรี	ND	ND
7	KT30	ทับทิม	นนทบุรี	ND	ND
8	KT32	ปุยฝ้าย	นนทบุรี	เล็ก	ปานกลาง
9	KT34	ปุยฝ้าย	นนทบุรี	ใหญ่	มาก
10	KT35	เทพรส	นนทบุรี	ND	ND
11	KT36	นิมνωล	นนทบุรี	ND	ND
12	KT38	อีล่า	นครนายก	กลาง	ปานกลาง
13	KT39	อีล่า	นครนายก	กลาง	ปานกลาง
14	KT40	ทองกำมะหยี่	นครนายก	เล็ก	ปานกลาง
15	KT42	ทับทิม	นครนายก	เล็ก	ปานกลาง
16	KT43	ปุยฝ้าย	นครนายก	กลาง	ปานกลาง
17	KT45	คานหาม	นครนายก	กลาง	มาก
18	KT46	ทองกำมะหยี่	ปราจีนบุรี	กลาง	ปานกลาง
19	KT47	ปุยฝ้าย	ปราจีนบุรี	ใหญ่	ปานกลาง
20	KT49	ปุยฝ้าย	ปราจีนบุรี	ใหญ่	น้อย
21	KT50	ทับทิม	ปราจีนบุรี	ND	ND
22	KT52	เขียวหวาน	ปราจีนบุรี	ND	ND

¹ขนาดผลกระท้อน : ผลเล็ก (น้อยกว่า 250 กรัม) ผลกลาง (250-400 กรัม) และผลใหญ่ (มากกว่า 400 กรัม);

²ความหวานของผลกระท้อน : หวานน้อย (น้อยกว่า 13 บริกซ์) หวานปานกลาง (13-15 บริกซ์) และหวานมาก (มากกว่า 15 บริกซ์)

30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย washing buffer (10 mM sodium acetate pH 5.2 และ 70 % ethanol) ปลอ่ยให้แห้ง และละลายตะกอนใน RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติม

เอนไซม์ RNase A (10 mg/ml) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลากัดด้วยฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้น

จึงย้ายสารละลายใส่ส่วนบนมาเติม linear polyacrylamide 70 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร และไอโซโพรพานอลให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร [7]

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ และการคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 กับ 280 นาโนเมตร [8]

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระทอนด้วยเครื่องหมายสก็อต

2.3.1 การตรวจหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

รวมดีเอ็นเอกระทอนทั้ง 22 ตัวอย่าง (ในปริมาณที่เท่า ๆ กัน) เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 80 ชนิด (SCoT1-SCoT80) [4,5] ซึ่งมีขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.1, 0.1 % TritonTM X-100 และ 2.5 mM MgCl₂) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์แบบสุ่ม 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Vivantis, Vivantis

Technologies Sdn Bhd, Malaysia) 1 ยูนิต (unit) [9,10]

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ [11,12]

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระทอน

นำไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกระทอนทั้ง 22 ตัวอย่าง โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระทอนทั้ง 22 ตัวอย่าง ที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.01e และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) [13]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

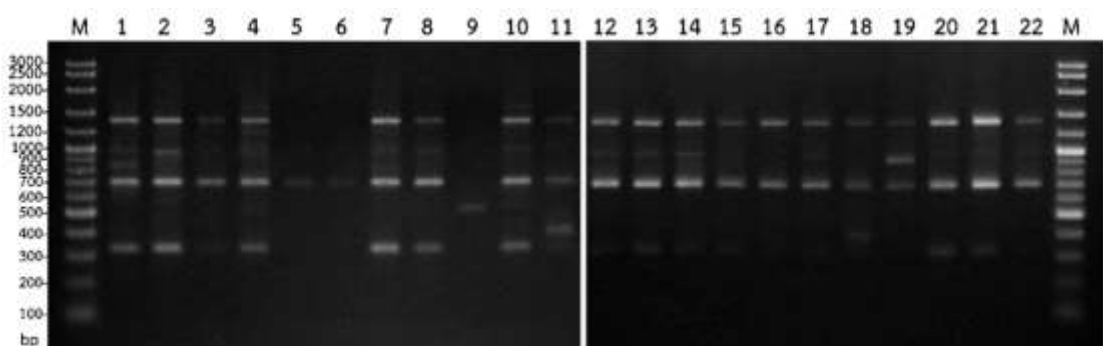
3.1 ไพรเมอร์สก็อตที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกระทอนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของกระทอน 22 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 13

ชนิด (หรือคิดเป็น 16.30 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ได้แก่ SCoT15, SCoT35, SCoT47, SCoT52, SCoT54, SCoT63, SCoT65, SCoT66, SCoT67, SCoT71, SCoT73, SCoT74 และ SCoT77 3.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระทอนที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต

เมื่อนำไพรเมอร์สก็อต 13 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระทอนทั้ง 22 ตัวอย่าง ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 159

แถบ ขนาดประมาณ 220-2,600 คู่เบส (base pairs, bp) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกพันธุ์ (monomorphic band) 14 แถบ (หรือคิดเป็น 8.80 เปอร์เซ็นต์) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบต่างกันในแต่ละพันธุ์ (polymorphic band) 145 แถบ (หรือคิดเป็น 91.20 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตนั้นมีรูปแบบจำเพาะต่อกระทอน (รูปที่ 1) และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับระบุพันธุ์กระทอนได้



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT74 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™), 1-22 คือ ตัวอย่างกระทอนตามลำดับในตารางที่ 1]

3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่ากระทอนที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทั้ง 22 ตัวอย่าง มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.55 ถึง 0.93 เฉลี่ย 0.715 เมื่อพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.65 พบว่าแบ่งกระทอนเป็น 4 กลุ่ม คือ (1) กลุ่ม 1 ได้แก่ KT23 (2) กลุ่ม 2 ได้แก่ KT20, KT30 และ KT32 (3) กลุ่ม 3 ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อย 3.1 ได้แก่ KT35 กลุ่มย่อย 3.2 ได้แก่ KT38,

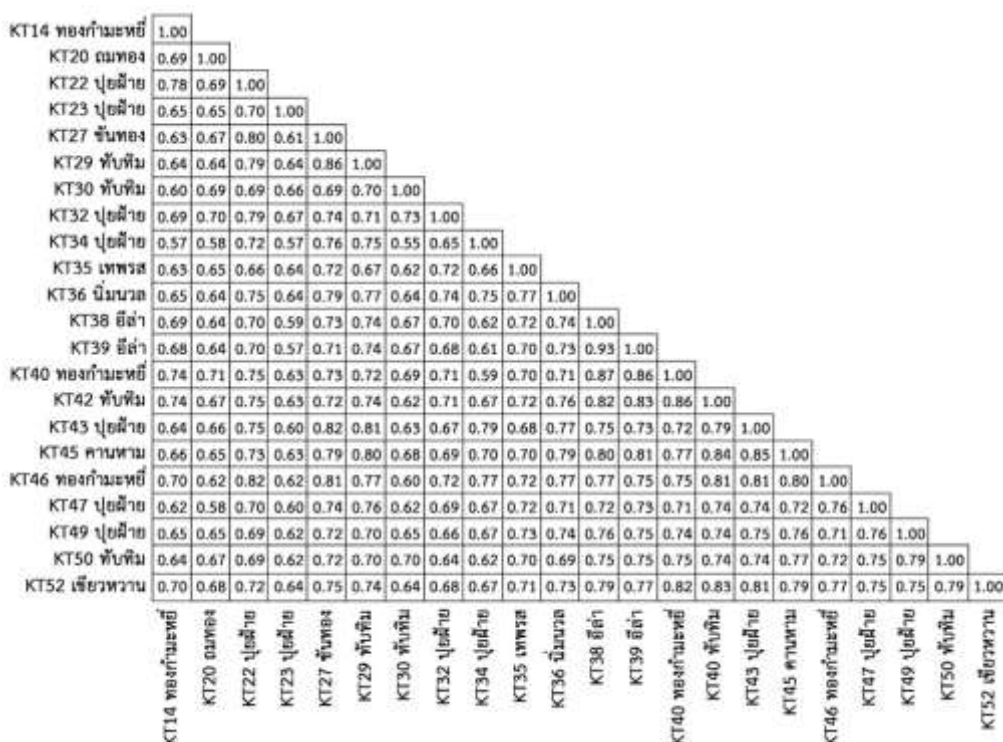
KT39, KT40, KT42, KT47, KT49, KT50 และ KT52 และกลุ่มย่อย 3.3 ได้แก่ KT22, KT27, KT29, KT34, KT36, KT43, KT45 และ KT46 และ (4) กลุ่ม 4 ได้แก่ KT14 (รูปที่ 3)

3.4 อภิปรายผล

กระทอนทั้ง 22 ตัวอย่าง ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นกระทอนที่เกษตรกรปลูกเพื่อจำหน่ายผลผลิตเป็นการค้า ซึ่งมี 10 พันธุ์ ได้แก่ ทองก้ามะหยี่ ถมทอง ปุยฝ้าย ชันทอง หับทิม เทพรส นิ่มนวล อีล่า คานหาม และเขียวหวาน เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ของกระทอนทั้ง 22 ตัวอย่าง ที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต โดยใช้ไพรเมอร์ 13 ชนิด (รูปที่ 3)

พบว่ากระถ่อนพันธุ์อีล่า KT38 กับกระถ่อนพันธุ์อีล่า KT39 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.93 (รูปที่ 2) เนื่องจากตัวอย่างทั้งสองเป็นกระถ่อนพันธุ์เดียวกันและเก็บมาจากจังหวัดนครนายกเช่นเดียวกัน กระถ่อนพันธุ์ปุย

ฝ้าย KT34 กับกระถ่อนพันธุ์ทับทิม KT30 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.55 (รูปที่ 2) เนื่องจากตัวอย่างทั้งสองเป็นกระถ่อนต่างพันธุ์กัน แม้จะเก็บมาจากจังหวัดนนทบุรีเหมือนกันก็ตาม

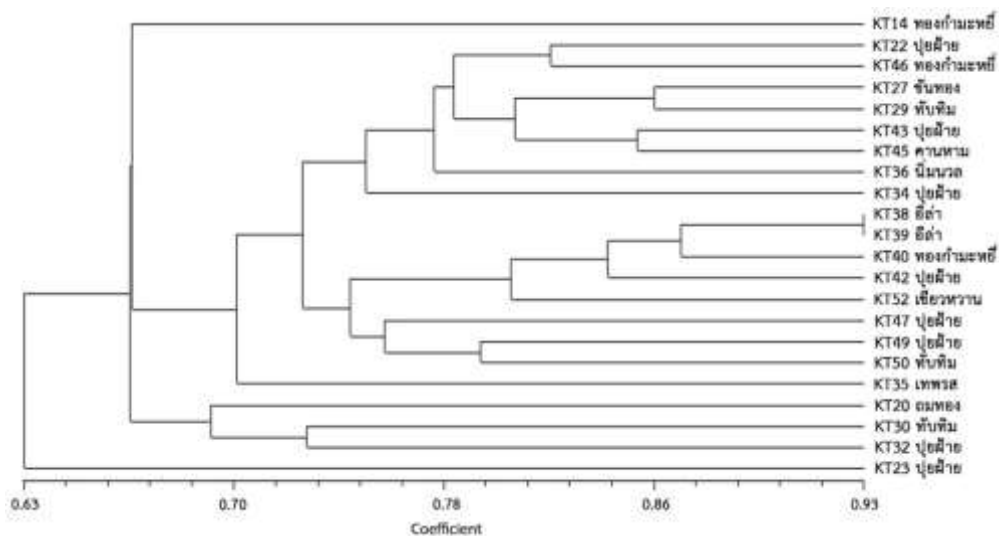


รูปที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของกระถ่อนทั้ง 22 ตัวอย่าง ที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต

การวิจัยครั้งนี้ พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ของกระถ่อนทั้ง 22 ตัวอย่าง ที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตนั้น มีการแบ่งกลุ่มกระถ่อนที่ไม่สอดคล้องกับพันธุ์ ขนาดผล และความหวานของผลแต่อย่างใด ทั้งนี้เนื่องจากกระถ่อนมีอายุยืนนับ 100 ปี และเป็นพืชผสมข้าม สามารถขยายพันธุ์ได้หลายวิธี ได้แก่ การทาบกิ่ง การติดตา การเสียบยอด การเสียบข้าง และการเพาะเมล็ด แต่ดั้งเดิมนั้นนิยมขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ด เพราะทำได้ง่าย [1] ดังนั้นจึงทำให้กระถ่อนมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) สูง มี

พันธุ์มากมาย และภายในพันธุ์เดียวกันก็มีความต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) สูง

เครื่องหมายสก็อตอาจไม่เหมาะสมสำหรับการระบุพันธุ์กระถ่อน เนื่องจากใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งเริ่มต้นการแปลรหัส (transcription) [4,5] ของยีนกำหนดการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ซึ่งมีจำนวนน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับจีโนมทั้งหมดของกระถ่อน ดังนั้นในการวิจัยครั้งต่อไปควรเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่กระจายทั่วทั้งจีโนม เช่น อาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) [14]



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกระถ่อนทั้ง 22 ตัวอย่าง ที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต

อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยมีงานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายสก็อตในพืชหลายชนิด ได้แก่ การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ของต้นรักแกนมอ [15] การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ [16] การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* [17] การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขียว [18] การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกข้าวปลุกบ่างพันธุ์ด้วยเครื่องหมาย สก็อต [19] การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพริกด้วยเครื่องหมายสก็อต [20] การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยด้วยเครื่องหมายสก็อต [21] เป็นต้น

4. สรุป

การตรวจสอบดีเอ็นเอกระถ่อนทั้ง 22 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด พบว่า

สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแต่ละตัวอย่างได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีความสัมพันธ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.55 ถึง 0.93 (เฉลี่ย 0.715) และแผนภูมิความสัมพันธ์ของกระถ่อนซึ่งได้จากเครื่องหมายสก็อตที่ค่าสัมพันธ์ความเหมือน 0.65 สามารถแยกกระถ่อนเป็น 4 กลุ่ม

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน) สัญญารับทุนวิจัยส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยที่มุ่งเป้า ประจำปี 2558 สัญญาเลขที่ สพท.-วช. 17/2558

6. รายการอ้างอิง

- [1] กลุ่มส่งเสริมและพัฒนาการผลิต, 2554, การผลิตกระถ่อนในพื้นที่ภาคกลาง, สำนักส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1, ชัยนาท.
- [2] Pennington, T.D. and Styles, B.T., 1975, A generic monograph of the Meliaceae,

- Blumea 22: 419-540.
- [3] Wongprasert, T., Phengkklai, C. and Boonthavikoon, T., 2011, A synoptic account of the Meliaceae of Thailand, Thai Forest Bull. (Bot.) 39: 210-266.
- [4] Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J., 2009, Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating Gene-targeted marker in plants, Plant Mol. Biol. Rep. 27: 86-93.
- [5] Luo, C., He, X.H., Chen, H., Ou, S.J. and Gao, M.P., 2010, Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using start codon targeted (SCoT) markers, Biochem. Syst. Ecol. 38: 1176-1184.
- [6] 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.
- [7] นฤมล ธนานันต์, สุริพร พุ่มเอี่ยม และธีระชัย ธนานันต์, 2556, การจำแนกพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21: 360-370.
- [8] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- [9] นฤมล ธนานันต์, เมธิณี เจริญไชย และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Tech. 1: 127-133.
- [10] นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกกล้วยไม้ช้างและลูกผสมพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.
- [11] รุติพร ไท้มโสภา, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 82-91.
- [12] เกียรติชัย แซ่โต๋, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 92-101.
- [13] Rohlf, F.J., 2002, NTSYpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.
- [14] 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.
- [15] กรองทอง ใจแก้วแดง, วิชาญ เอียดทอง และสุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2557, การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของต้นรักแกนมอในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมาย Start Codon Targeted (SCoT), Thai J. Forest. 33: 19-27.
- [16] นฤมล ธนานันต์, จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์ และธีระชัย ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของ

- กล้วยไม้สกุลก้านก่อด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 152-160.
- [17] อีระชัย ธนानันต์, ทิปกา มีเสงี่ยม และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 161-170.
- [18] อีระชัย ธนานันต์, พรประภา ศิริเทพทวี, ภัทรพร คุ่มภัย และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขียวด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 171-178.
- [19] ทศนีย์ สิงห์ศิลารักษ์, จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์, เปรมณัช ขุนปักษี, อีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกข้าวปลุกบางพันธุ์ด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 247-256.
- [20] ทิปกา มีเสงี่ยม, เปรมณัช ขุนปักษี, อีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพริกด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 257-265.
- [21] พรประภา ศิริเทพทวี, ฐิตาพร มณีเนตร, เปรมณัช ขุนปักษี, อีระชัย ธนานันต์, และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 266-273.