

การจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

Identification of Sugar Apple Cultivars Nua and Nang

Using RAPD Markers

ธีระชัย ชนานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12121

บทคัดย่อ

ได้นำเทคนิคอาร์เอพีดีมาตรวจสอบน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนัง โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 192 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 160 ชนิด หรือคิดเป็นประมาณ 83 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และไพรเมอร์ OPU-10 (5'-ACCTCGGCAC-3') ให้เครื่องหมายอาร์เอพีดีขนาด 440 คู่เบส ที่สามารถจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังออกจากกันได้

คำสำคัญ: การจำแนกพันธุ์ น้อยหน่า อาร์เอพีดี

Abstract

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to identify sugar apple (*Annona squamosa* L.) cultivars Nua and Nang. The total of 192 random primers were screened and 160 primers or about 83 percent of them could be used for sugar apple DNA amplification. The primer OPU-10 (5'-ACCTCGGCAC-3') gave clearly 440 bp DNA fragment which was capable to distinguish the sugar apple variety between Nua and Nang.

Keywords: Sugar apple, *Annona squamosa* L., RAPD

1. คำนำ

น้อยหน่า (*Annona squamosa* L.) เป็นผลไม้เมืองร้อนขนาดกลาง ลำต้นสูงประมาณ 3-6 เมตร มีแหล่งกำเนิดบริเวณแถบร้อนและแห้งแล้งที่สุดของทวีปอเมริกากลางและที่ราบสูงของประเทศเปรูและอิตาลี [1,2] สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินแทบทุกชนิดที่ไม่มีน้ำขัง จึงมีการปลูกแพร่หลายในเขตร้อนและเขตอบอุ่นทั่วโลก ในอดีตนักเดินเรือชาวโปรตุเกสและอังกฤษเป็นผู้นำไปปลูกในประเทศต่างๆ ที่เดินเรือไปถึง จากหลักฐานพบว่ามีการนำน้อยหน่าพันธุ์เนื้อหรือฝ้ายเข้ามาปลูกครั้งแรก

ในประเทศไทยที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยาและลพบุรี ในพุทธศตวรรษที่ 21-22 และในปี พ.ศ. 2475 มีการนำน้อยหน่าพันธุ์หนังจากประเทศเวียดนามเข้ามาปลูกครั้งแรกที่จังหวัดอุบลราชธานี [3] ปัจจุบันมีแหล่งเพาะปลูกน้อยหน่าเพื่อเป็นการค้าที่สำคัญ ได้แก่ นครราชสีมา อุบลราชธานี สระบุรี ลพบุรี นครปฐม ราชบุรี เป็นต้น

น้อยหน่าเป็นผลไม้ที่มีรสชาติดี หวาน กลิ่นหอม และให้พลังงานสูง จึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั่วไป โดยรับประทานในรูปผลสุกหรือทำเป็นของหวาน อาหารว่าง ไอศกรีม และผสมเครื่องดื่ม นอกจากนี้ส่วนต่างๆ ของ

น้อยหน้า เช่น ใบ ราก เมล็ด และผลดิบ ยังมีสรรพคุณในด้านการเป็นยารักษาโรคและยามาเมลง ได้แก่ ยาแก้ อักเสบ ยาถ่ายพยาธิ ยาม่าเหา เป็นต้น

น้อยหน้าเป็นพืชที่ปลูกและขยายพันธุ์ได้ง่ายเพราะมีเมล็ดมาก ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี ไม่ค่อยมีปัญหาเกี่ยวกับโรคและแมลงศัตรูพืช จึงพบปลูกกระจายแทบทุก จังหวัดของประเทศไทย แม้ว่าน้อยหน้าจะมีดอกสมบูรณ์เพศ แต่เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียภายในดอกเดียวกันจะไม่สามารถผสมพันธุ์กันเนื่องจากเจริญเติบโตไม่พร้อมกัน ดังนั้นจึงผสมพันธุ์ข้ามดอกเสมอ และอาจมีการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์หนึ่งกับพันธุ์หนึ่งได้ถ้าปลูกไว้ใกล้กัน ซึ่งทำให้เกิดน้อยหน้าลูกผสมมากมาย ปัจจุบันเริ่มมีผู้สนใจการปรับปรุงพันธุ์น้อยหน้ามากขึ้นเนื่องจากน้อยหน้ามีราคาสูงเมื่อเทียบกับผลไม้อื่น และกำลังจะกลายเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งเพราะมีมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี นอกจากนี้ยังมีสู่ทางในการขยายตลาดออกไปได้อีกมาก ซึ่งถ้ามีการปรับปรุงพันธุ์หรือผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีขึ้นและเป็นที่ต้องการของตลาดก็จะได้เปรียบในการแข่งขันกับประเทศผู้ผลิตอื่น เช่น เม็กซิโก บราซิล คิวบา ฟิลิปปินส์ อินเดีย จีน โพลินีเซีย สหรัฐอเมริกา เป็นต้น โดยน้อยหน้าลูกผสมที่ปรับปรุงพันธุ์หรือผสมพันธุ์มาได้จำเป็นต้องมีการจดทะเบียนพันธุ์พืชเพื่อป้องกันการแอบอ้างหรือขโมย

เทคนิคอาร์เอฟดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) เป็นเทคนิคการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ที่สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งในคราวเดียวกัน [4] โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) และตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว และใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้อาจมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) สำหรับจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ มีรายงานการนำเครื่องหมายอาร์เอฟดี (RAPD

marker) มาใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตมากมายหลายชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ ข้าวโพด แตงโม หอม และยูคาลิปตัส เป็นต้น [5,6,7,8,9] นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำเครื่องหมายอาร์เอฟดีมาใช้จำแนกพันธุ์ทุเรียนเทศ (*Annona muricata* L.) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Anonaceae เช่นเดียวกับน้อยหน้า พบว่าเทคนิคอาร์เอฟดีสามารถจำแนกพันธุ์ทุเรียนเทศทั้ง 9 พันธุ์ได้ดี [10]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของน้อยหน้าด้วยเทคนิคอาร์เอฟดีและตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถใช้จำแนกน้อยหน้าพันธุ์หนึ่งและพันธุ์หนึ่งได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากน้อยหน้า

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบน้อยหน้าพันธุ์เนื้อ 10 ต้น และพันธุ์หนัง 10 ต้น ที่รวบรวมจากแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญของประเทศไทย 6 จังหวัด คือ อุบลราชธานี นครราชสีมา สระบุรี ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา และลพบุรี ด้วยวิธีประยุกต์จาก Agrawal และคณะ [11] แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ [12]

2.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี

มี 2 ขั้นตอน คือ (1) ตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยรวมดีเอ็นเอน้อยหน้าพันธุ์เนื้อ 10 ต้น เป็นตัวอย่างเดียวกัน และรวมดีเอ็นเอน้อยหน้าพันธุ์หนัง 10 ต้น เป็นตัวอย่างเดียวกัน

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอน้อยหน้า 100 ng ด้วยเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Invitrogen™ Life Technologies, Brazil) 1 unit ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 2.5 mM MgCl₂) ที่มี dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 μM และไพรเมอร์ 250 nM ปฏิกริยามี 3 ขั้นตอน คือ (1) 94°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน

1 รอบ (2) 94°C เป็นเวลา 1 นาที, 35°C เป็นเวลา 1 นาที และ 72°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ใช้ 192 ชนิด เป็นโปรแกรมแบบสุ่มขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 48 ชนิด (Operon Technology, USA) และโปรแกรมแบบสุ่มขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 144 ชนิด (Wako Company, Japan) หลังจากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

(2) เลือกโปรแกรมที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างนัยหน้าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอนัยหน้าพันธุ์เนื้อ 10 ตัวอย่าง และดีเอ็นเอนัยหน้าพันธุ์หนัง 10 ตัวอย่าง

2.3 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของนัยหน้าที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีและตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถใช้จำแนกนัยหน้าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังได้

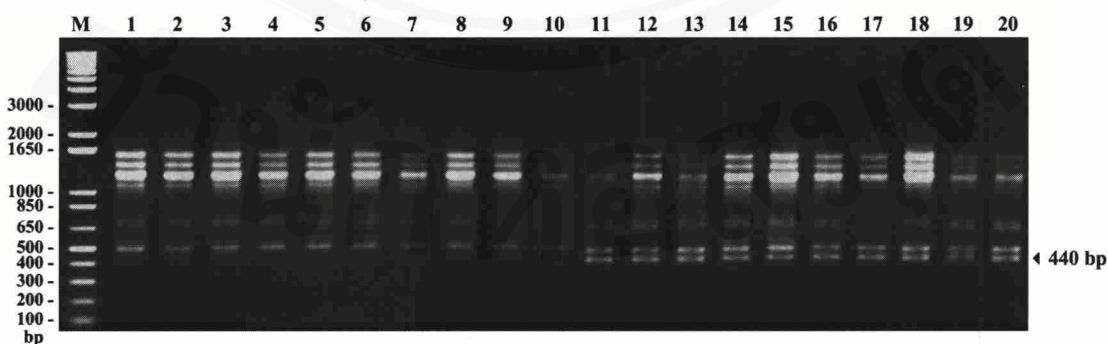
3. ผลและวิจารณ์

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของนัยหน้าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้โปรแกรม 192 ชนิด พบว่าโปรแกรม 160 ชนิด หรือคิดเป็น 83.33 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หรือให้การตอบสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยโปรแกรม 159 ชนิด ให้

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบดีเอ็นเอ 1-11 แถบ ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากนัยหน้าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังจะเหมือนกัน แต่โปรแกรม OPU-10 (5'-ACCTCGGCAC-3') เพียงชนิดเดียวที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน 6 แถบ และแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน 1 แถบ ซึ่งมีขนาด 440 คู่เบส โดยพบเฉพาะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากนัยหน้าพันธุ์หนังเท่านั้น

เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอนัยหน้าพันธุ์เนื้อ 10 ตัวอย่าง และดีเอ็นเอนัยหน้าพันธุ์หนัง 10 ตัวอย่าง ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม OPU-10 พบว่าดีเอ็นเอนัยหน้าพันธุ์หนังทั้ง 10 ตัวอย่าง ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 440 คู่เบส อยู่ด้วย แต่ดีเอ็นเอนัยหน้าพันธุ์เนื้อทั้ง 10 ตัวอย่าง ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่มีแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (ภาพที่ 1)

แถบดีเอ็นเอขนาด 440 คู่เบส เป็นเครื่องหมายอาร์เอพีดีที่สามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์นัยหน้าในการทดลองนี้ได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์นัยหน้าได้เช่นเดียวกับส้มโอ พริก หรือพืชชนิดอื่นๆ [13,14] และสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ในการระบุพันธุ์นัยหน้า ซึ่งมีรูปร่างลักษณะภายนอก เช่น ใบ ลำต้น และดอกที่เหมือนกัน โดยไม่ต้องรอให้ออกผลได้เช่นเดียวกับการจำแนกส้มโอพันธุ์สายน้ำผึ้งและชาวน้ำผึ้ง [15]



ภาพที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPU-10 ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอขนาด 440 คู่เบส ในน้อยหน่าพันธุ์หนัง แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวในน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA), 1-10 คือดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์เนื้อ, 11-20 คือดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์หนัง]

4. สรุป

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ถึง 192 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 1 ชนิด เท่านั้นที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน 1 แถบ และได้เครื่องหมายอาร์เอพีดีเพียงชนิดเดียว แสดงว่าน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังมีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมายอาร์เอพีดีนี้ก็สามารถจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังออกจากกันได้

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้ทุนสนับสนุนจากโครงการวิจัยเสริมหลักสูตร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี พ.ศ. 2547 และได้รับความช่วยเหลือจาก อ.ดร. นฤมล ธนानันต์ ประธานหลักสูตรชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Morton, J.F., Sugar apple: *Annona squamosa*, pp. 69-72, In J.F. Morton and F.L. Miami, Fruits of Warm Climates, http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/sugar_apple.html, 1987.
- [2] Phillip, R.L. and Campbell, C.W., Fact Sheet HS-38: The Sugar Apple, University of Florida, Florida, 1994.
- [3] เกศินี รมมิ่งวงศ์, ไม้ผลเมืองร้อน, ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 2530.
- [4] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers, *Nucl. Acids Res.* Vol. 18; pp. 6531-6535, 1990.
- [5] Klein-Lankhorst, R.M., Vermunt, A., Weide, R., Liharska, T. and Zabel, P., Isolation of Molecular Markers for Tomato (*L. esculentum*) Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), *Theor. Appl. Genet.* Vol. 83; pp. 108-114, 1991.
- [6] Welsh, J., Honeycutt, R.J., McClell, M. and Sobral, B.W.S., Parentage Determination in Maize Hybrids Using Arbitrariness Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR), *Theor. Appl. Genet.* Vol. 82; pp. 473-476, 1991.
- [7] Hashizume, T., Sato, T. and Hirai, M., Determination of Genetic Purity of Hybrid Seed in Watermelon (*Citrullus lanatus*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), *Japan J. Breed.* Vol. 43; pp. 367-375, 1993.
- [8] Wilkie, S.E., Isaac, P.G. and Slater, R.J., Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers for Genetic Analysis in *Allium*, *Theor. Appl. Genet.* Vol. 86; pp. 479-504, 1993.
- [9] Nebitt, K.A., Potts, B.M., Vaillancourt, R.E., West, A.K. and Reid, J.B., Partitioning and Distribution of RAPD Variation in a Forest Tree Species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Heredity* Vol. 74; pp. 628-637, 1995.

- [10] Brown, J., Laurentín, H. and Dávila, M., Genetics Relationships between Nine *Annona muricata* L. Accessions Using RAPD markers, *Fruits* Vol. 58; pp. 255-259, 2003.
- [11] Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P., Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* Leaves, *Biotech. Biodiv. Lett.* Vol. 2; pp. 19-24, 1992.
- [12] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- [13] ชีระชัย ชนานันต์ และ นฤมล ชนานันต์, เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์ส้มโอ, น. 215-219, ใน การสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 11 : พันธุศาสตร์ช่วยชาติแก้วิกฤติ, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา, 2542.
- [14] ชีระชัย ชนานันต์ และ นฤมล ชนานันต์, เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์พริก, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 8 (1) ; น. 6-10, 2543.
- [15] ชีระชัย ชนานันต์ และ นฤมล ชนานันต์, การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบส้มโอพันธุ์สายน้ำผึ้งและชาวน้ำผึ้ง, น. 172-175, ใน การสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12 : พันธุศาสตร์ยุคปฏิวัติขึ้น, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2544.