การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระท้อน ด้วยเครื่องหมายสก๊อต

Genetic Relationship Assessment of Santol Using SCoT Markers

ธีระชัย ธนานันต์* 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

กระท้อนเป็นผลไม้ไทยที่มีความสำคัญและได้รับความนิยม แต่การระบุพันธุ์ด้วยลักษณะสัณฐานยังมีความยุ่งยากและเกิดความสับสนได้ง่าย เนื่องจากมีพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมพันธุ์และการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้เครื่องหมายสก๊อตมาตรวจสอบกระท้อน 22 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์สก๊อต 80 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 13 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อตรวจสอบกับดีเอ็นเอของกระท้อนแต่ละตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.55 ถึง 0.93 (เฉลี่ย 0.715) โดยผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากระท้อนในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง มีพันธุ์จำนวนมาก และในแต่ละพันธุ์มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง

คำสำคัญ : กระท้อน; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; เครื่องหมายสก๊อต

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** thana@tu.ac.th

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*) และสกุลลางสาด (*Lansium*) โดยพืชสกุลกระท้อนในประเทศไทยแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ (1) *Sandoricum beccarianum* Baill. มีชื่อพ้อง คือ *S. emarginatum* มีชื่อท้องถิ่นว่าสะท้อนนก (sathon nok) สะท้อนพรุ (sathon phru) และสะโตบุรง (sato burong) กระจายพันธุ์ในป่าดิบชื้นที่ลุ่มต่ำ น้ำขัง และในป่าพรุทางภาคใต้ของประเทศไทย ผลสุกใช้รับประทาน มีรสหวานอมเปรี้ยว เนื้อไม้ใช้ก่อสร้างและตกแต่งภายในอาคารบ้านเรือน 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) มะต้อง (ภาคเหนือ อุดรธานี) มะติ๋น (ภาคเหนือ) สตียา สะตู (นราธิวาส) สะโต (ปัตตานี) [3] โดยกระท้อนสามารถปลูกได้ดีแทบทุกแห่งในประเทศไทย แต่กระท้อนที่ปลูกกันทั่วไปเป็นชนิดที่มีความ สำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งลักษณะของปุยและรสชาติจะแตกต่างกันออกไปในแต่ละพันธุ์ [1]

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

และขยายพันธุ์ดีที่เกิดการกลายพันธุ์ไปจากเดิม ซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายของพันธุ์ตามความนิยม สามารถจำแนกด้วยลักษณะสัณฐาน (morphology) ตามเนื้อสัมผัส รสชาติ ลักษณะของรูปร่าง และขนาดของผล รวมทั้งมีการตั้งชื่อขึ้นใหม่อีกหลายชื่อ [1]

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

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นอีกเครื่องมือหนึ่งที่ช่วยในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วในการจำแนกสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้เพื่อสร้างข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาพืชสกุลกระท้อนให้เป็นพืชทางเศรษฐกิจที่ยั่งยืนต่อไป ด้วยความสำคัญดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเครื่องหมายสก๊อต (SCoT marker, start codon targeted marker) [4,5] โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (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 % cethyltrimethyl 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 metabisufite] 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 ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -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	ขันทอง	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	นิ่มนวล	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

[1]ขนาดผลกระท้อน : ผลเล็ก (น้อยกว่า 250 กรัม) ผลกลาง (250-400 กรัม) และผลใหญ่ (มากกว่า 400 กรัม); [2]ความหวานของผลกระท้อน : 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) ปล่อยให้แห้ง และละลายตะกอนใน RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNase A (10 mg/ml) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาสกัดด้วยฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้น

จึงย้ายสารละลายใสส่วนบนมาเติม 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 หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วผึ่งตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร [7]

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

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระท้อนด้วยเครื่องหมายสก๊อต

2.3.1 การตรวจหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

รวมดีเอ็นเอกระท้อนทั้ง 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 % Triton^{TM} X-100 และ 0.25 mM $MgCl_2$) 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 แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ [11,12]

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระท้อน

นำไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกระท้อนทั้ง 22 ตัวอย่าง โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะทำซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

2.4 การวิเคราะห์ผล

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

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

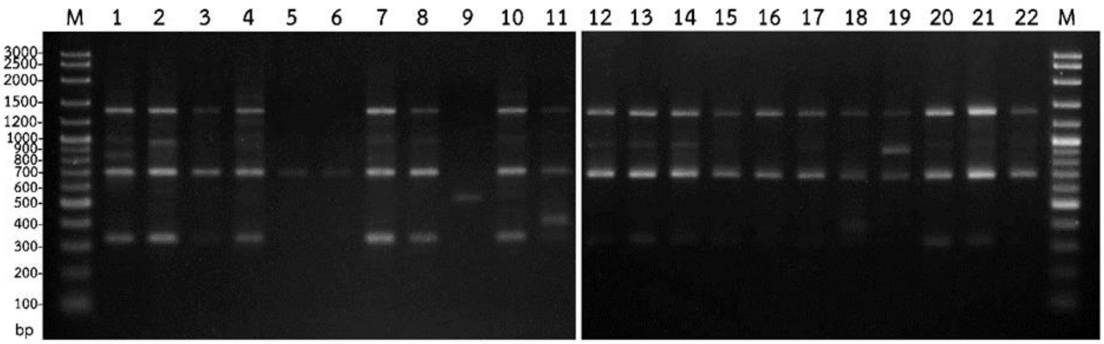
3.1 ไพรเมอร์สก๊อตที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกระท้อนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของกระท้อน 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 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระท้อนที่ได้จากเครื่องหมายสก๊อต

เมื่อนำไพรเมอร์สก๊อต 13 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระท้อนทั้ง 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) ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก๊อตนั้นมีรูปแบบจำเพาะต่อกระท้อน (รูปที่ 1) และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับระบุพันธุ์กระท้อนได้



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก๊อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT74 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-22 คือ ตัวอย่างกระท้อนตามลำดับในตารางที่ 1]

3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก๊อตด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่ากระท้อนที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทั้ง 22 ตัวอย่าง มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.55 ถึง 0.93 เฉลี่ย 0.715 เมื่อพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.65 พบว่าแบ่งกระท้อนเป็น 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

กระท้อนทั้ง 22 ตัวอย่าง ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นกระท้อนที่เกษตรกรปลูกเพื่อจำหน่ายผลผลิตเป็นการค้า ซึ่งมี 10 พันธุ์ ได้แก่ ทองกำมะหยี่ ถมทอง ปุยฝ้าย ขันทอง ทับทิม เทพรส นิ่มนวล อีล่า คานหาม และเขียวหวาน เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ของกระท้อนทั้ง 22 ตัวอย่าง ที่ได้จากเครื่องหมายสก๊อต โดยใช้ไพรเมอร์ 13 ชนิด (รูปที่ 3)

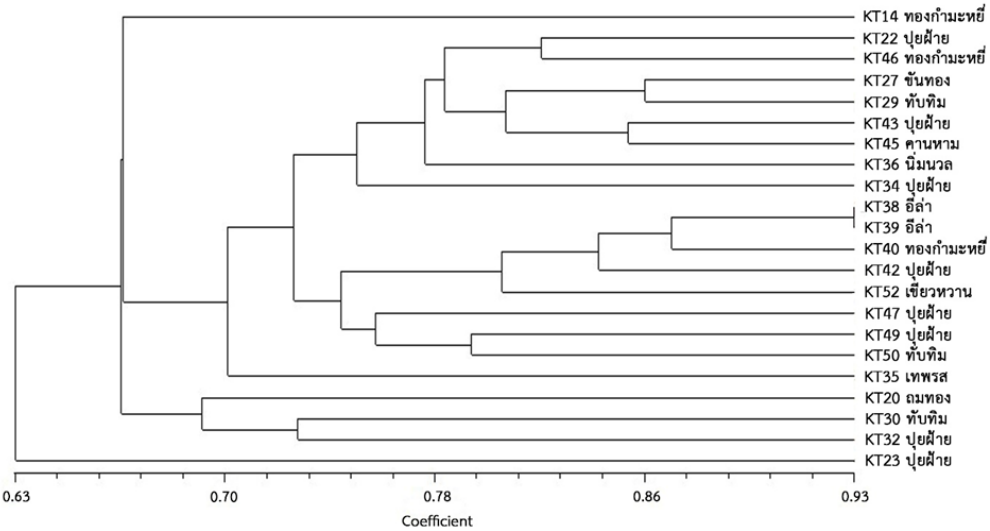
พบว่ากระท้อนพันธุ์อีล่า KT38 กับกระท้อนพันธุ์อีล่า KT39 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.93 (รูปที่ 2) เนื่องจากตัวอย่างทั้งสองเป็นกระท้อนพันธุ์เดียวกันและเก็บมาจากจังหวัดนครนายกเช่นเดียวกัน กระท้อนพันธุ์ปุยฝ้าย KT34 กับกระท้อนพันธุ์ทับทิม KT30 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.55 (รูปที่ 2) เนื่องจากตัวอย่างทั้งสองเป็นกระท้อนต่างพันธุ์กัน แม้จะเก็บมาจากจังหวัดนนทบุรีเหมือนกันก็ตาม

	KT14 ทองกำมะหยี่	KT20 ถมทอง	KT22 ปุยฝ้าย	KT23 ปุยฝ้าย	KT27 ขันทอง	KT29 ทับทิม	KT30 ทับทิม	KT32 ปุยฝ้าย	KT34 ปุยฝ้าย	KT35 เทพรส	KT36 นิ่มนวล	KT38 อีล่า	KT39 อีล่า	KT40 ทองกำมะหยี่	KT42 ทับทิม	KT43 ปุยฝ้าย	KT45 คานหาม	KT46 ทองกำมะหยี่	KT47 ปุยฝ้าย	KT49 ปุยฝ้าย	KT50 ทับทิม	KT52 เขียวหวาน
KT14 ทองกำมะหยี่	1.00																					
KT20 ถมทอง	0.69	1.00																				
KT22 ปุยฝ้าย	0.78	0.69	1.00																			
KT23 ปุยฝ้าย	0.65	0.65	0.70	1.00																		
KT27 ขันทอง	0.63	0.67	0.80	0.61	1.00																	
KT29 ทับทิม	0.64	0.64	0.79	0.64	0.86	1.00																
KT30 ทับทิม	0.60	0.69	0.69	0.66	0.69	0.70	1.00															
KT32 ปุยฝ้าย	0.69	0.70	0.79	0.67	0.74	0.71	0.73	1.00														
KT34 ปุยฝ้าย	0.57	0.58	0.72	0.57	0.76	0.75	0.55	0.65	1.00													
KT35 เทพรส	0.63	0.65	0.66	0.64	0.72	0.67	0.62	0.72	0.66	1.00												
KT36 นิ่มนวล	0.65	0.64	0.75	0.64	0.79	0.77	0.64	0.74	0.75	0.77	1.00											
KT38 อีล่า	0.69	0.64	0.70	0.59	0.73	0.74	0.67	0.70	0.62	0.72	0.74	1.00										
KT39 อีล่า	0.68	0.64	0.70	0.57	0.71	0.74	0.67	0.68	0.61	0.70	0.73	0.93	1.00									
KT40 ทองกำมะหยี่	0.74	0.71	0.75	0.63	0.73	0.72	0.69	0.71	0.59	0.70	0.71	0.87	0.86	1.00								
KT42 ทับทิม	0.74	0.67	0.75	0.63	0.72	0.74	0.62	0.71	0.67	0.72	0.76	0.82	0.83	0.86	1.00							
KT43 ปุยฝ้าย	0.64	0.66	0.75	0.60	0.82	0.81	0.63	0.67	0.79	0.68	0.77	0.75	0.73	0.72	0.79	1.00						
KT45 คานหาม	0.66	0.65	0.73	0.63	0.79	0.80	0.68	0.69	0.70	0.70	0.79	0.80	0.81	0.77	0.84	0.85	1.00					
KT46 ทองกำมะหยี่	0.70	0.62	0.82	0.62	0.81	0.77	0.60	0.72	0.77	0.72	0.77	0.77	0.75	0.75	0.81	0.81	0.80	1.00				
KT47 ปุยฝ้าย	0.62	0.58	0.70	0.60	0.74	0.76	0.62	0.69	0.67	0.72	0.71	0.72	0.73	0.71	0.74	0.74	0.72	0.76	1.00			
KT49 ปุยฝ้าย	0.65	0.65	0.69	0.62	0.72	0.70	0.65	0.66	0.67	0.73	0.74	0.76	0.75	0.74	0.74	0.75	0.76	0.71	0.76	1.00		
KT50 ทับทิม	0.64	0.67	0.69	0.62	0.72	0.70	0.70	0.64	0.62	0.70	0.69	0.75	0.75	0.75	0.74	0.74	0.77	0.72	0.75	0.79	1.00	
KT52 เขียวหวาน	0.70	0.68	0.72	0.64	0.75	0.74	0.64	0.68	0.67	0.71	0.73	0.79	0.77	0.82	0.83	0.81	0.79	0.77	0.75	0.75	0.79	1.00

รูปที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของกระท้อนทั้ง 22 ตัวอย่าง ที่ได้จากเครื่องหมายสก๊อต

การวิจัยครั้งนี้ พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ของกระท้อนทั้ง 22 ตัวอย่าง ที่ได้จากเครื่องหมายสก๊อตนั้น มีการแบ่งกลุ่มกระท้อนที่ไม่สอดคล้องกับพันธุ์ ขนาดผล และความหวานของผลแต่อย่างใด ทั้งนี้เนื่องจากกระท้อนมีอายุยืนนับ 100 ปี และเป็นพืชผสมข้าม สามารถขยายพันธุ์ได้หลายวิธี ได้แก่ การทาบกิ่ง การติดตา การเสียบยอด การเสียบข้าง และการเพาะเมล็ด แต่ดั้งเดิมนั้นนิยมขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ดเพราะทำได้ง่าย [1] ดังนั้นจึงทำให้กระท้อนมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) สูง มีพันธุ์มากมาย และภายในพันธุ์เดียวกันก็มีความต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) สูง

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



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกระท้อนทั้ง 22 ตัวอย่าง ที่ได้จากเครื่องหมายสก๊อต

อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยมีงานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายสก๊อตในพืชหลายชนิด ได้แก่ การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ของต้นรักแกนมอ [15] การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ [16] การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ Brachypetalum [17] การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขียว [18] การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกข้าวปลูกบางพันธุ์ด้วยเครื่องหมาย สก๊อต [19] การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพริกด้วยเครื่องหมายสก๊อต [20] การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยด้วยเครื่องหมายสก๊อต [21] เป็นต้น

4. สรุป

การตรวจสอบดีเอ็นเอกระท้อนทั้ง 22 ตัวอย่างด้วยเครื่องหมายสก๊อตโดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างแต่ละตัวอย่างได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.55 ถึง 0.93 (เฉลี่ย 0.715) และแผนภูมิความสัมพันธ์ของกระท้อนซึ่งได้จากเครื่องหมายสก๊อตที่ค่าสัมประสิทธ์ความเหมือน 0.65 สามารถแยกกระท้อนเป็น 4 กลุ่ม

5. กิตติกรรมประกาศ

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

6. รายการอ้างอิง

[1] กลุ่มส่งเสรมและพัฒนาการผลิต, 2554, การผลิตกระท้อนในพื้นที่ภาคกลาง, 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., Phengklai, 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, สุรีพร พุ่มเอี่ยม และธีระชัย ธนานันต์, 2556, การจำแนกพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, 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, เมธินี เจริญไชย และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี , Thai J. Sci. Tech. 1: 127-133.

[10] นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกกล้วยไม้ช้างและลูกผสมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.

[11] ฐิติพร โท้มโสภา, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 82-91.

[12] เกียรติชัย แซ่ไต่, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, 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

กล้วยไม้สกุลก้านก่อด้วยเครื่องหมายสก๊อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 152-160.

[17] ธีระชัย ธนานันต์, ทีปกา มีเสงี่ยม และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ Brachypetalum ด้วยเครื่องหมายสก๊อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 161-170.

[18] ธีระชัย ธนานันต์, พรประภา ศิริเทพทวี, ภัทรพร คุ้มภัย และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขียวด้วยเครื่องหมายสก๊อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 171-178.

[19] ทัศนีย์ สิงห์ศิลารักษ์, จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกข้าวปลูกบางพันธุ์ด้วยเครื่องหมายสก๊อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 247-256.

[20] ทีปกา มีเสงี่ยม, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพริกด้วยเครื่องหมายสก๊อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 257-265.

[21] พรประภา ศิริเทพทวี, ฐิตาพร มณีเนตร, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์, และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยด้วยเครื่องหมายสก๊อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 266-273.