บทความวิจัย

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจและการระบุเพศของสละหม้อจากจังหวัดจันทบุรี

วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์[1] เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์[2] อรอนงค์ พริ้งศุลกะ[1] และ อัจฉริยา รังษิรุจิ[1*]

บทคัดย่อ

พืชสกุลระกำ *(Salacca)* จัดเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในจังหวัดจันทบุรี โดยพันธุ์เศรษฐกิจที่นิยมปลูกมี 3 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ แต่เนื่องจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลนี้ ทำให้เกษตรกรไม่สามารถจำแนกพันธุ์ในระยะต้นกล้าได้ และมักถูกหลอกลวงโดยการปลอมปนต้นกล้าของพืชในสกุลเดียวกันที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจต่ำกว่า งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจในจังหวัดจันทบุรี โดยเริ่มจากการใช้เทคนิค RAPD เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ที่มีความแตกต่างกันระหว่างพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ กับพืชสกุลระกำที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจ 2 พันธุ์ (สละไร้หนาม และระกำ) ผลการวิเคราะห์โดยใช้ RAPD primer จำนวน 187 ชนิด พบว่ามี primer 5 ชนิด ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ของพืชสกุลระกำ ซึ่งในจำนวน 5 ชนิด นี้พบว่ามีเพียง 1 ชนิด (NAPS062) ที่แสดงรูปแบบของแถบ DNA (ขนาดประมาณ 750 คู่เบส) ที่มีความจำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ ดังนั้นจึงทำการ clone หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ที่จำเพาะนี้ และออกแบบ SCAR primer 1 คู่ จากนั้นนำ SCAR primer คู่นี้ไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ร่วมกับ genomic DNA ของพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ซึ่งให้ผลที่น่าสนใจเป็น repetitive SCAR ที่ให้แถบ DNA ที่สำคัญ 2 แถบ ดังนี้ (i) แถบ DNA ขนาดประมาณ 220 คู่เบส ที่มีความจำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ และ (ii) แถบ DNA ขนาดประมาณ 410 คู่เบส ที่มีความจำเพาะต่อสละหม้อเพศเมียเท่านั้น เมื่อนำ SCAR primer คู่นี้ไปทดสอบกับตัวอย่างพืชสกุลระกำในภาคสนามทั้ง 5 พันธุ์ จำนวน 80 ต้น พบรูปแบบของแถบ DNA ที่แสดงความจำเพาะ 100% ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจและระบุเพศของสละหม้อได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการยืนยันต้นกล้าของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากเรือนเพาะชำที่จำหน่ายต้นพันธุ์ได้

คำสำคัญ: พืชสกุลระกำ RAPD SCAR

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: achariya@swu.ac.th

Development of Molecular Markers for Identification of Economic Cultivars of *Salacca* and Sex Determination of Sala-Mho from Chanthaburi Province

Walailak Hattaboon[1], Jessada Denduangboripant[2], Onanong Pringsulaka[1] and Achariya Rangsiruji[1*]

ABSTRACT

Salacca is one of important economic plants in Chanthaburi Province. There are three economic cultivars, namely Sala-Sumalee, Sala-Nernwong and Sala-Mho. Due to morphological similarities of plants belonging to the genus *Salacca,* agriculturalists are not able to identify the cultivars at seedling stage. They are often deceived by a substitution of seedlings of other plants in the same genus but with lower economic value. This research therefore, aimed to develop molecular markers for identification of economic cultivars of *Salacca* in Chanthaburi Province. First, RAPD technique was used to examine DNA fingerprints which showed polymorphisms among the three economic cultivars of *Salacca* and two non-economic cultivars (Sala-Rainam and Rakam). Results based on 187 RAPD primers used revealed that five primers generated polymorphic bands among the cultivars. Of these five primers, only one primer (NAPS062) produced a DNA band (ca. 750 base pairs) specific to all three economic cultivars of *Salacca.* This DNA fragment was cloned, sequenced and a pair of SCAR primers was designed. PCR reactions employing this pair of SCAR primers with genomic DNA from all five cultivars of *Salacca* yielded interesting results with repetitive SCARs of two important DNA bands as follows: (i) a DNA band of ca. 220 base pairs specific to the three economic cultivars of *Salacca* and (ii) a DNA band of ca. 410 base pairs specific to female Sala-Mho only.

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

[2]Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

[*]Corresponding author, e-mail: achariya@swu.ac.th

When this pair of SCAR primers was tested against field samples of all five *Salacca* cultivars with 80 individuals, resulting DNA patterns showed 100% specificity. This study therefore, has led to a success in distinguishing the economic cultivars of *Salacca* as well as determining the sex of Sala-Mho. This is certainly helpful in verifying the seedlings of economic cultivars of *Salacca* from retail nurseries.

Keywords: Salacca, RAPD, SCAR

บทนำ

พืชสกุลระกำ *(Salacca)* เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Arecaceae (วงศ์ย่อย Calamoideae) พบทั้งหมดประมาณ 21 ชนิด [1] มีการกระจายพันธุ์อยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบทั่วไปทางตอนใต้ของมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน ทางตอนใต้ของประเทศพม่า ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ สำหรับประเทศไทยพืชในสกุลนี้ที่รู้จักเป็นอย่างดี ได้แก่ ระกำ สละเนินวง และสละหม้อ ซึ่งในปัจจุบันล้วนได้มาจากการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตดีและมีรสชาติเป็นที่ต้องการของตลาด ทำให้ได้รับความนิยมในการบริโภคและมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย [2]

ในประเทศไทยพื้นที่ปลูกพืชสกุลระกำส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดระยอง จันทบุรี และตราด โดยเฉพาะจังหวัดจันทบุรีที่มีการเพาะปลูกมากที่สุด และพืชสกุลระกำที่นิยมปลูกเป็นพันธุ์เศรษฐกิจ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ พืชในสกุลนี้เป็นพืชที่มีต้นเพศผู้และเพศเมียอยู่แยกต้น เกษตรกรนิยมปลูกเฉพาะต้นเพศเมียซึ่งให้ผลผลิตได้ และมักขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศโดยการตัดชำลำต้นจากต้นพันธุ์เพศเมีย เพื่อให้ได้ต้นใหม่ที่มีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการ อย่างไรก็ตาม การตัดชำลำต้นนั้นจำเป็นต้องล้มต้นแม่ จึงเป็นเหตุให้ต้นพันธุ์ของพืชสกุลระกำมีราคาแพง นอกจากนี้เกษตรกรยังประสบปัญหาในการจำแนกพันธุ์และเพศของพืชในสกุลนี้ เนื่องจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยา และมักจะถูกเอาเปรียบเรื่องการปลอมปนต้นพันธุ์ของพืชในสกุลเดียวกันที่มีราคาต่ำกว่า หรือต้นพันธุ์ที่ไม่ใช่เพศที่ต้องการ เกษตรกรจะทราบพันธุ์และเพศที่ถูกต้องภายหลังจากการเพาะปลูกประมาณ 3 ปี เมื่อพืชออกดอกและผลแล้ว ทำให้เสียค่าใช้จ่ายและเสียเวลาในการดูแลรักษาเป็นอย่างมาก

การศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกพันธุ์พืชสกุลระกำในช่วงที่ผ่านมานั้นมีการใช้ biochemical marker เช่น isozyme พบว่าสามารถแยกได้เพียง 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มสละและกลุ่มระกำ แต่ไม่สามารถจำแนกถึงระดับพันธุ์ได้ [3] การศึกษา karyotype พบว่าในพันธุ์ที่ได้จากประเทศอินโดนีเซียพบโครโมโซมที่มี satellite จำนวน 1 คู่ ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการจำแนกพันธุ์พืชสกุลระกำในประเทศไทยออกจากอินโดนีเซียได้ [4] การศึกษาวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของพืชสกุลระกำจำนวน 12 taxa จากประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer ของ nuclear ribosomal DNA พบว่าสามารถแยกพืชสกุลระกำจากทั้ง 3 ประเทศออกจากกันได้อย่างชัดเจน และสามารถจำแนกพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทยได้เป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย ระกำ สละไร้หนาม สละสายน้ำผึ้ง และสละหม้อ และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สละเนินวง และสละสุมาลี [5]

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคที่อาศัยพื้นฐานของ Polymerase Chain Reaction (PCR-based technique) ทำให้ผลที่ได้มีความเสถียรกว่าการใช้ isozyme marker [6] และสามารถตรวจสอบตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยได้ โดยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอาจมีผลต่อการศึกษาเพียงเล็กน้อย เทคนิค RAPD เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ของสิ่งมีชีวิต โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ล่วงหน้า เนื่องจาก primer ที่ใช้มีขนาดสั้น (ความยาวประมาณ 8-12 นิวคลีโอไทด์) และอุณหภูมิที่ให้ primer เข้าจับกับ DNA template ต่ำ (ประมาณ 37-40°C) จึงสามารถเพิ่มโอกาสการเกิด PCR product ขนาดต่างๆ ที่ใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นสำหรับพืชหลายชนิดจึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกพันธุ์ เช่น แอปเปิ้ล [7] แพร์ [8] และมะกอก [9] เป็นต้น

Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความผันแปรของแถบ DNA ที่ประยุกต์มาจากเทคนิค RAPD หรือเทคนิคอื่นที่เพิ่มปริมาณ DNA แบบสุ่มหลายตำแหน่ง โดยการ clone และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ที่มีความแตกต่างเพื่อออกแบบ primer ที่จำเพาะสำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ที่มีความแตกต่างนั้นโดยเทคนิค PCR ดังนั้นผลที่ได้จึงมีความแม่นยำกว่าผลของ RAPD พร้อมทั้งมีความคงที่สม่ำเสมอ สามารถตรวจสอบได้เมื่อทำการทดลองซ้ำ สำหรับพืชหลายชนิดมีตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค SCAR ในการจำแนกพันธุ์ ได้แก่ มะกอก [10] และแอพริคอต [11] เป็นต้น

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ที่แม่นยำและมีความจำเพาะในการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี โดยอาศัยเทคนิค PCR เป็นพื้นฐาน เพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบต้นกล้าพันธุ์เศรษฐกิจของพืชสกุลนี้

วิธีการทดลอง

การเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลระกำที่นำมาศึกษา

เก็บรวบรวมตัวอย่างใบพืชสกุลระกำจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อ จากแหล่งเพาะปลูกในจังหวัดจันทบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างแต่ละพันธุ์ แบ่งเป็นพันธุ์ที่มีปลูกเฉพาะเพศเมีย (สละสุมาลี และสละเนินวง) พันธุ์ละ 5 ต้น และพันธุ์ที่มีปลูกทั้งเพศผู้และเพศเมีย (สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อ) พันธุ์ละ 10 ต้น โดยแบ่งเป็นเพศผู้ 5 ต้น และเพศเมีย 5 ต้น

การสกัด DNA

สกัด total genomic DNA จากพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ด้วยวิธีการ CTAB โดยดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle [12] การสกัด DNA เริ่มจากการบดใบพืชให้ละเอียดโดยเร็ว โดยใช้ liquid nitrogen จากนั้นเติม CTAB buffer แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที เติม RNase A ตามด้วย “wet” chloroform (chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ดูดของเหลวใสส่วนบนไว้และสกัดซ้ำด้วย “wet” chloroform อีกครั้งหนึ่ง เติม isopropanol ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดของเหลวใสส่วนบนทิ้ง เติม wash buffer (76% ethanol และ 10 mM ammonium acetate) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงและดูดของเหลวใสส่วนบนทิ้ง จากนั้นทำให้ DNA pellet แห้งโดยไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 10 นาที ละลาย DNA pellet ที่ได้ใน nuclease-free water และเก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป ในการปั่นเหวี่ยงแต่ละครั้งใช้ความเร็ว 13,800 x*g* เป็นเวลา 2 นาที

สำหรับพืชสกุลระกำที่มีปลูกเฉพาะเพศเมีย (สละสุมาลี และสละเนินวง) รวม DNA ที่สกัดได้จากพันธุ์ละ 5 ต้น เป็น 1 ตัวอย่าง ส่วนพืชสกุลระกำที่มีปลูกทั้งเพศผู้และเพศเมีย (สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อ) รวม DNA ที่สกัดได้จากเพศละ 5 ต้น เป็น 1 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีตัวอย่าง DNA ที่ศึกษาทั้งหมด 8 ตัวอย่าง

การตรวจสอบรูปแบบของ DNA ด้วยเทคนิค RAPD

การตรวจสอบรูปแบบของแถบ DNA ของพืชสกุลระกำพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค RAPD เริ่มต้นโดยการเตรียม PCR reaction ปริมาตร 15 μL ซึ่งมีองค์ประกอบต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 2 ng/μL DNA template, 1x PCR buffer, 0.25 mM dNTP แต่ละชนิด, 2.5 mM $MgCl_2$, 1x Q-solution, 1 μM RAPD primer และ 0.03 U/μL *Taq* DNA polymerase นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง thermal cycler (Eppendorf) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้

Initial heating	94°C	1.5	นาที	
Denaturation	94°C	1	นาที	40 รอบ
Annealing	37°C	1	นาที	
Extension	72°C	2	นาที	
Final extension	72°C	5	นาที	

ในการวิจัยนี้ใช้ RAPD primer ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 187 ชนิด เพื่อทดสอบว่ามี primer ใด ที่ให้ผลแถบ DNA ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) อย่างชัดเจนในพืชสกุลระกำที่ศึกษา ตรวจสอบผลที่ได้จากการทำ PCR ด้วยวิธี electrophoresis (1% (w/v) agarose gel) และเทียบขนาดของแถบ DNA ที่เกิดขึ้นกับ DNA มาตรฐาน

การ clone และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ที่จำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ

ตัดเฉพาะแถบ DNA ที่จำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ ทำ DNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN) นำไปเชื่อมต่อกับ pGEM®-T Easy Vector System I (Promega) แล้วนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue เลือกโคโลนีที่มีสีขาว 2 โคโลนี จากพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจแต่ละพันธุ์ จากนั้นสกัด plasmid โดยใช้วิธี alkaline lysis ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) [13] และตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA insert ที่ถูกต้องโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI สกัด plasmid โดยใช้ QIAGEN® Plasmid Mini Kit (QIAGEN) และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer 2 ชนิด คือ SP6 promoter primer และ T7 promoter primer

การออกแบบ SCAR primer และการตรวจสอบโดย PCR เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการ clone ชิ้น DNA ของสละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ มาวิเคราะห์หาตำแหน่งของ universal primer (SP6 promoter primer และ T7 promoter primer) และตัดส่วนนี้ออกเพื่อระบุขอบเขตที่ชัดเจนของชิ้น DNA insert จากนั้นใช้โปรแกรม Primer Design Ver. 2.0 [14] เพื่อออกแบบคู่ของ forward primer และ reverse primer ที่จำเพาะ เรียกว่า SCAR primer

ใช้คู่ของ SCAR primer ในขั้นตอน PCR เพื่อจำแนกสละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อออกจากสละไร้หนามและระกำ โดยใช้ total genomic DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างในขั้นตอนแรก เตรียม PCR reaction ปริมาตร 25 μL ซึ่งมีองค์ประกอบต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 2 ng/μL DNA template, 1x PCR buffer, 0.15 mM dNTP แต่ละชนิด, 1.5 mM $MgCl_2$, 1x Q-solution, 1.32 μM

forward primer, 1.32 μM reverse primer และ 0.04 U/μL *Taq* DNA polymerase นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง thermal cycler (Eppendorf) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้

Initial heating	94°C	1.5 นาที	
Denaturation	94°C	1 นาที	30 รอบ
Annealing	55°C	1 นาที	
Extension	72°C	1.5 นาที	
Final extension	72°C	1 นาที	

จากนั้นขยายผลการวิจัยโดยนำคู่ของ SCAR primer ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปทดสอบกับตัวอย่างพืชสกุลระกำในภาคสนามทั้ง 5 พันธุ์ โดยแบ่งเป็นสละสุมาลี และสละเนินวง พันธุ์ละ 10 ต้น (เพศเมียทั้งหมด) สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อ พันธุ์ละ 20 ต้น (เพศผู้พันธุ์ละ 10 ต้น และเพศเมียพันธุ์ละ 10 ต้น) ผ่านขั้นตอน PCR ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ตรวจสอบผลที่ได้จากการทำ PCR ทุกครั้งด้วยวิธี electrophoresis (1% (w/v) agarose gel)

ผลการทดลอง

การตรวจสอบรูปแบบของ DNA ด้วยเทคนิค RAPD

การตรวจสอบรูปแบบของ DNA จากตัวอย่างของพืชสกุลระกำ 5 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง สละหม้อ สละไร้หนาม และระกำ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ primer จำนวน 187 ชนิด พบว่ามี primer จำนวน 158 ชนิด ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างกัน (polymorphic band) และในจำนวนนี้พบ primer ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของพืชสกุลระกำจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ primer NAPS062, NAPS759, NAPS760, NAPS764 และ NAPS766 ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 RAPD primer 5 ชนิด ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของพืชสกุลระกำ โดย ✓ หมายถึง การมีแถบ DNA ปรากฏ และ × หมายถึง การไม่มีแถบ DNA ปรากฏ

RAPD primer [ขนาดของแถบ DNA (คู่เบส)]	พืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ				พืชสกุลระกำที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจ			
	สละสุมาลี	สละเนินวง	สละหม้อ		สละไร้หนาม		ระกำ	
	(เพศเมีย)	(เพศเมีย)	(เพศผู้)	(เพศเมีย)	(เพศผู้)	(เพศเมีย)	(เพศผู้)	(เพศเมีย)
NAPS062 [~750]	✓	✓	✓	✓	×	×	×	×
NAPS759 [~600]	×	✓	×	×	×	×	×	×
NAPS760 [~380]	×	✓	×	×	×	×	×	×
NAPS764 [~380]	✓	✓	×	×	×	×	×	×
NAPS766 [~800]	✓	✓	×	×	×	×	×	×

การ clone และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ที่จำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ

จากการตรวจสอบรูปแบบ DNA ของพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ด้วยเทคนิค RAPD พบว่า primer NAPS062 ให้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส ซึ่งสามารถใช้จำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อได้ เมื่อทำการ clone ชิ้น DNA ที่เป็น PCR product ของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจแต่ละพันธุ์ แล้วสกัด plasmid และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พร้อมทั้งตัดส่วนของ universal primer ออก จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA insert

การออกแบบ SCAR primer และการตรวจสอบโดย PCR เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA insert ของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ ทำให้สามารถออกแบบ SCAR primer ได้ 1 คู่ (forward primer และ reverse primer)

Forward primer : SCAR62F 5'- GTC CCA CCG TCT TCA TAT CCA GCC ACG TG -3'

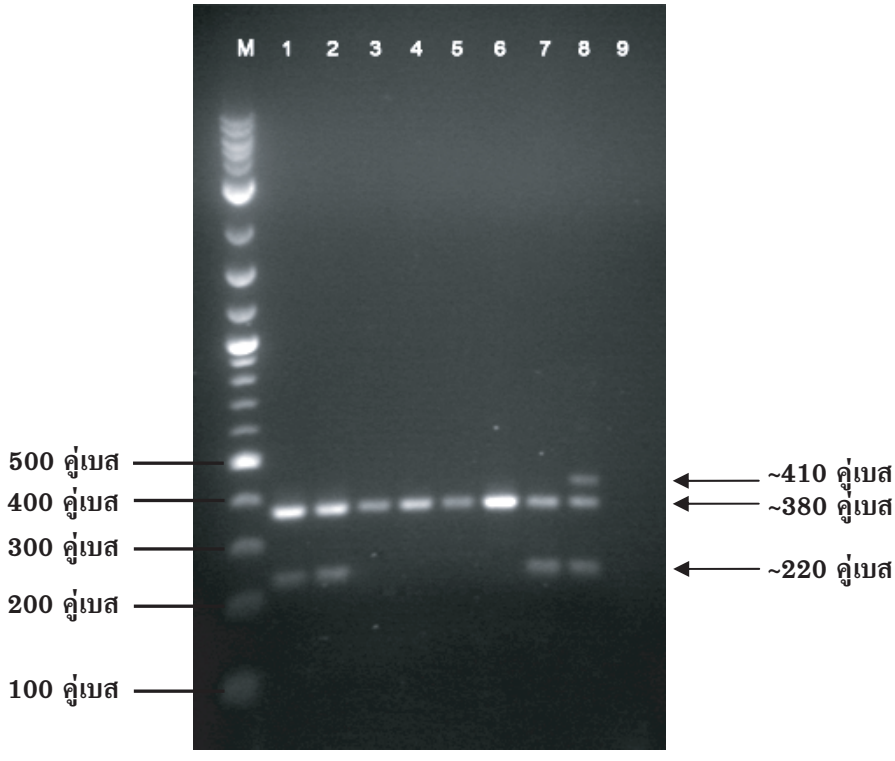
Reverse primer : SCAR62AR 5'- TGG AGG TAC AGG ACA TCT TGC -3'

เมื่อนำคู่ของ SCAR primer นี้มาใช้ในการเพิ่มขยายปริมาณ DNA ในขั้นตอนการทำ PCR เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจออกจากพันธุ์อื่นๆ การตรวจสอบรูปแบบของ DNA ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 1)

(1) พืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ จาก DNA จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง สละไร้หนามเพศผู้ สละไร้หนามเพศเมีย ระกำเพศผู้ ระกำเพศเมีย สละหม้อเพศผู้ และสละหม้อเพศเมีย มีการปรากฏของแถบ DNA ขนาดประมาณ 380 คู่เบส

(2) เฉพาะพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ 3 พันธุ์ จาก DNA จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง สละหม้อเพศผู้ และสละหม้อเพศเมีย มีการปรากฏของแถบ DNA ขนาดประมาณ 220 คู่เบส

(3) เฉพาะสละหม้อเพศเมีย มีการปรากฏของแถบ DNA ขนาดประมาณ 410 คู่เบส

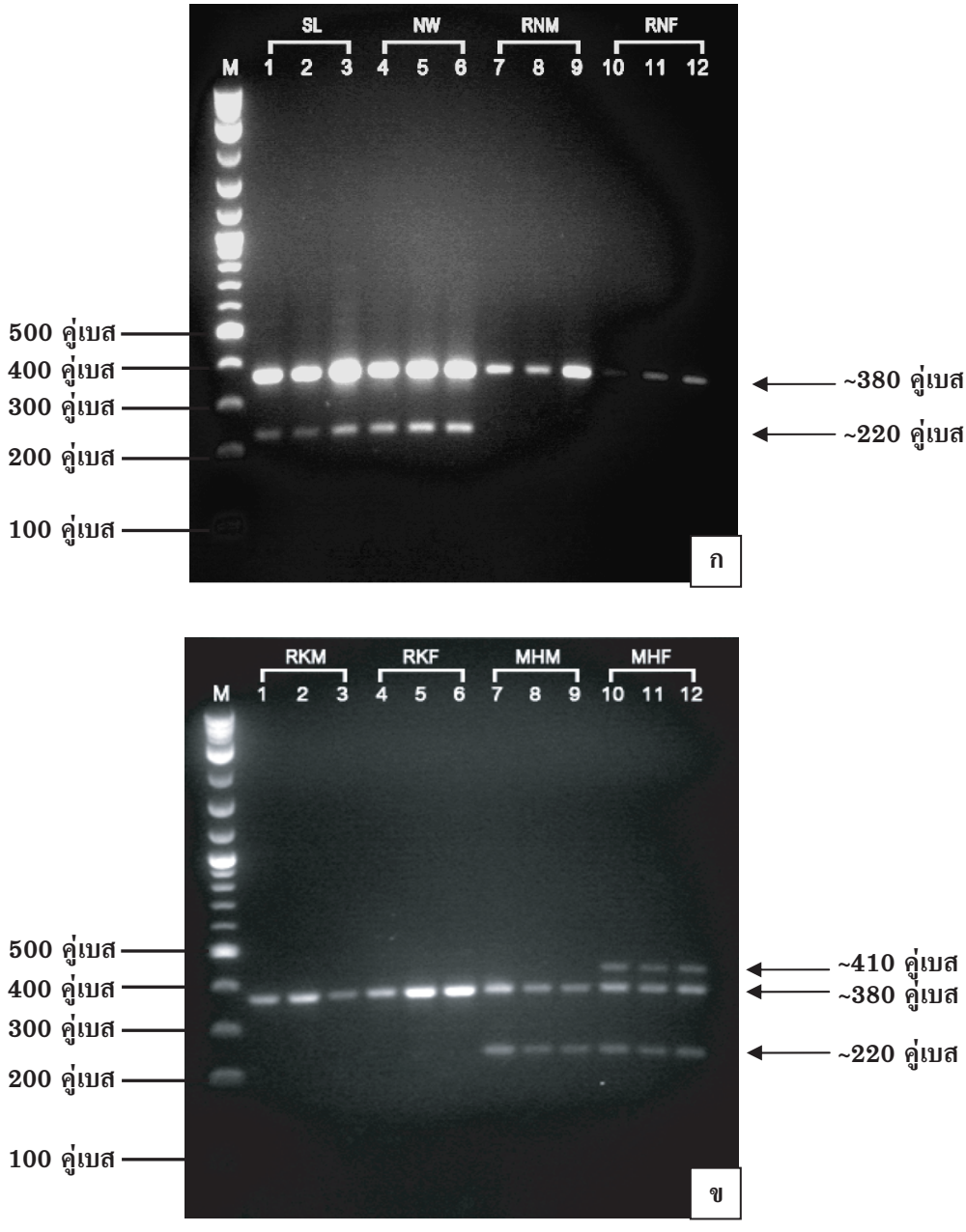


รูปที่ 1 ผลของ PCR ที่ใช้คู่ของ SCAR primer เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ

Lane M: 2-Log DNA marker
Lane 1: สละสุมาลี (SL)
Lane 2: สละเนินวง (NW)
Lane 3: สละไร้หนามเพศผู้ (RNM)
Lane 4: สละไร้หนามเพศเมีย (RNF)
Lane 5: ระกำเพศผู้ (RKM)
Lane 6: ระกำเพศเมีย (RKF)
Lane 7: สละหม้อเพศผู้ (MHM)
Lane 8: สละหม้อเพศเมีย (MHF)
Lane 9: Negative control

การประยุกต์ใช้ SCAR marker

จากการขยายผลการวิจัย โดยนำคู่ของ SCAR primer คือ primer SCAR62F และ SCAR62AR ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปทดสอบโดยเทคนิค PCR กับตัวอย่างพืชสกุลระกำในภาคสนามทั้ง 5 พันธุ์ โดยแบ่งเป็นสละสุมาลี และสละเนินวง พันธุ์ละ 10 ต้น (เพศเมียทั้งหมด) สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อพันธุ์ละ 20 ต้น (เพศผู้พันธุ์ละ 10 ต้น และเพศเมียพันธุ์ละ 10 ต้น) พบว่าผลของรูปแบบของแถบ DNA ที่ได้ตรงกับผลการศึกษาในข้างต้นทุกประการ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลของ PCR ที่ใช้คู่ของ SCAR primer กับตัวอย่างพืชสกุลระกำในภาคสนามทั้ง 5 พันธุ์ โดยแบ่งเป็น สละสุมาลี และสละเนินวง พันธุ์ละ 10 ต้น (เพศเมียทั้งหมด) สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อพันธุ์ละ 20 ต้น (เพศผู้พันธุ์ละ 10 ต้น และเพศเมียพันธุ์ละ 10 ต้น) โดยจากภาพแสดงเพียงอย่างละ 3 ต้น

ก. Lane M: 2-Log DNA marker, lanes 1-3 SL: สละสุมาลี, lanes 4-6 NW: สละเนินวง, lanes 7-9 RNM: สละไร้หนามเพศผู้, lanes 10-12 RNF: สละไร้หนามเพศเมีย

ข. Lane M: 2-Log DNA marker, lanes 1-3 RKM: ระกำเพศผู้, lanes 4-6 RKF: ระกำเพศเมีย, lanes 7-9 MHM: สละหม้อเพศผู้, lanes 10-12 MHF: สละหม้อเพศเมีย

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจสอบรูปแบบของ DNA ของพืชสกุลระกำด้วยเทคนิค RAPD พบ primer ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ primer NAPS062, NAPS759, NAPS760, NAPS764 และ NAPS766 ในจำนวนนี้พบ primer เพียง 1 ชนิด คือ primer NAPS062 ที่แสดงรูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างระหว่างพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจและพืชสกุลระกำที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจ โดยให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 750 คู่เบส เฉพาะในพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจเท่านั้น

จากการ clone และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ที่จำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ (แถบ DNA ขนาดประมาณ 750 คู่เบส) ทำให้สามารถออกแบบ SCAR primer ได้ 1 คู่ (SCAR62F และ SCAR62AR) ซึ่งควรให้ผล PCR product ขนาดประมาณ 380 คู่เบส เพียง 1 แถบที่จำเพาะกับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ 3 พันธุ์ จาก DNA จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง สละหม้อเพศผู้ และสละหม้อเพศเมียเท่านั้น แต่ผลจากการวิจัยนี้พบว่า PCR product ขนาดประมาณ 380 คู่เบส นี้ปรากฏในพืชสกุลระกำทั้งที่เป็นพันธุ์เศรษฐกิจ และที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 5 พันธุ์ ดังนั้นแถบ DNA ดังกล่าวนี้จึงไม่สามารถใช้จำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจออกจากพันธุ์อื่นๆ ได้

อย่างไรก็ดี การวิจัยนี้ยังให้ผลที่น่าสนใจเป็น repetitive SCAR ซึ่งเกิดจากการที่คู่ของ SCAR primer เข้าจับในบริเวณอื่นของจีโนม ซึ่งไม่ใช่บริเวณที่มีการออกแบบ SCAR primer ตั้งแต่เริ่มแรก แต่ผลของ repetitive SCAR ซึ่งให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 220 คู่เบสนั้นมีความจำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ ดังนั้นแถบ DNA ดังกล่าวนี้สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจออกจากพันธุ์อื่นๆ ได้

นอกจากนี้ยังได้ผล repetitive SCAR อีก 1 ตำแหน่ง ซึ่งให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 410 คู่เบสที่มีความจำเพาะต่อสละหม้อเพศเมียเท่านั้น จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกสละหม้อเพศเมียออกจากสละหม้อเพศผู้ และในเชิงมูลค่าทางเศรษฐกิจ เครื่องหมายโมเลกุลนี้ยังสามารถใช้จำแนกสละหม้อเพศเมียออกจากพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจเพศเมียอื่นๆ ได้แก่ สละสุมาลีที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงสุด และสละเนินวงที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจต่ำสุดได้

จากการประยุกต์ใช้ SCAR marker กับพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ในภาคสนาม พบว่า ได้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำกับตัวอย่างในภาคสนามทั้งหมด 80 ตัวอย่าง จึงสามารถยืนยันได้ว่า SCAR marker ที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้มีความจำเพาะสูงถึง 100%

นอกจากนี้ผลของการศึกษาเพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรีในครั้งนี้ยังได้ให้ข้อมูลเบื้องต้นจากผลของ RAPD primer ที่แสดงแถบ DNA ที่แตกต่างกันระหว่างสละสุมาลีและสละเนินวง ซึ่งควรมีการพัฒนา SCAR marker ต่อไป และนอกจากความพยายามในการจำแนกพันธุ์ของพืชในสกุลนี้ ผู้วิจัยยังได้ดำเนินการทดลองอย่างต่อเนื่องเพื่อค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อเพศของพืชสกุลระกำพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสุธีวรรณ บินชัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านเทคนิคและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2553 ทุนเงินรายได้บัณฑิตวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2554 และทุนส่งเสริมการผลิตครูวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) จากสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่ได้สนับสนุนการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Govaerts, R., Dransfield, J., Zona, S. F., Hodel, D. R., and Henderson, A. 2006. World Checklist of Arecaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. Available from URL: http://www.kew.org/wcsp. 26 November 2010.
2. คณะกรรมการชมรมผู้ปลูกสะละจันทบุรี. 2544. สาระของสะละ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. หจก. มิตรเกษตรการตลาดและโฆษณาฯ. หน้า 9-32.
3. ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล สุภาพ สุนทรนนท์ อัมพิกา ปุนนจิต และ สุขวัฒน์ จันทรปรรณิก. 2539. การศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์ไอโซไซม์ในการจำแนกพืชสกุลระกำ. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการประจำปี 2539. กรุงเทพฯ. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.
4. Rangsiruji, A., Pongpawe, T., and Donsakul, T. 2006. Karyotypes of Some *Salacca* in Thailand and Indonesia. *Srinakharinwirot Science Journal* 22(2): 48-61. (in thai).
5. Rangsiruji, A., Pongpawe, T., and Donsakul, T. 2006. Molecular Phylogenetic Relationships of Some *Salacca* in Thailand, Malaysia and Indonesia. Proceedings of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand. 10-12 October 2006. Bangkok, Thailand. p. 98
6. Micales, J. A., and Bonde, M. R. 1995. Isozymes: Methods and Applications. In: Singh, R. P., and Singh, U. S., Editors. Molecular Methods in Plant Pathology. London. CRC Press, Inc., p. 115-130.
7. Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J. M., and Gessler, C. 1993. Identification of Apple Cultivars Using RAPD Markers. *Journal of Theoretical and Applied Genetics* 85: 901-904.
8. Monte-Corvo, L., Cabrita, L., Oliveira, C., and Leitão, J. 2000. Assessment of Genetic Relationships among *Pyrus* Species and Cultivars Using AFLP and RAPD Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 257-265.
9. Sanz-Cortés, F., Badenes, M. L., Paz, S., Iñiguez, A., and Llácer, G. 2001. Molecular Characterization of Olive Cultivars Using RAPD Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126: 7-12.

10. Hernández, P., de la Rosa, R., Rallo, L., Dorado, G., and Martín, A. 2001. Development of SCAR Markers in Olive *(Olea europaea). Journal of Theoretical and Applied Genetics* 103: 788-791.
11. Mariniello, L., Sommella, M., Sorrentino, A., Forlani, M., and Porta, R. 2002. Identification of *Prunus armeniaca* Cultivars by RAPD and SCAR Markers. *Biotechnology Letters* 24(10): 749-755.
12. Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
13. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. 2nd Edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
14. Primer, 1990. Primer Design Ver. 2.0. Copyright 1990-1991. Scientific & Educational Software.

ได้รับบทความวันที่ 12 เมษายน 2554
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 9 พฤษภาคม 2554