รายงานวิจัย

การศึกษาจำนวนโครโมโซม การแยกพันธุ์โดยเทคนิค RAPD และความเป็นไปได้ในการผสมข้ามระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู

ภาควิชาพืชศาสตร์

คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

2545

ลำดับ

เลขหมู่ SB379.L6

Bib Key 229348

การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมของพืชสกุลลางสาด (*Lansium domesticum* Corr.)

Study on Ploidy Levels of *Lansium domesticum* Corr.

บทคัดย่อ

จากการศึกษาชุดจำนวนโครโมโซมของพืชสกุลลางสาดได้แก่ ลองกอง ลางสาดและดูกู โดยการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก การนับจำนวนปากใบ/พื้นที่ วัดขนาดปากใบและปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่าโครโมโซมของพืชกลุ่มนี้มีขนาดเล็กและมีจำนวนมากทำให้ยากต่อการตรวจนับ อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนโครโมโซมของลองกองและดูกูมีจำนวนไกล้เคียงกัน ในขณะมี่ลางสาดมีจำนวนโครโมโซมมากกว่าพืชทั้งสองชนิด และเมื่อทำการวัดขนาดและนับจำนวนปากใบ พบว่าขนาดปากใบลองกองใหญ่ที่สุดและจำนวนปากใบมากที่สุดคือ 167.83 ไมโครเมตร และ27.83/ ตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือลางสาด (158.14 ไมโครเมตร และ27.83/ ตารางมิลลิเมตร) และดูกู (158.14 ไมโครเมตร และ 22.12/ ตารางมิลลิเมตร) ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับปริมาณคลอโรฟิลล์นั้นแม้ว่าลางสาดจะมีปริมาณสูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับพืชอีกสองชนิด

Abstract

The chromosome number from root tips of longkong, langsat and duku was investicated and ploidy levels was determined by comparison of stomatal density and size and cholophyll content measurement. Results from this study indicated that langsat has higher in chromosme number those of llongkong and duku. The size and stomatal density of longkong leaves were 167.83 um and 27.83/mm^2, repectively,which are significantly larger than of langsat.(158.14 um and 22.84/ mm^2) and duku (137.54 um and 22.12 mm^2). Eventhogh, nosignificantly different in cholophyll content was found, langsat tended to have the highest cholophyll content.

คำหลัก ลองกอง ลางสาด ดูกู โครโมโซม ปากใบ คลอโรฟิลล์

การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการทำ RAPD-PCR ในพืชสกุลลางสาด

Experimental Conditions of RAPD-PCR in *Lansium domesticum* Corr.

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยเทคนิค RAPD สำหรับพืชสกุลลางสาด (*Lansium domesticum* Corr.) โดยตรวจสอบความเข้มข้นขององค์ประกอบของสารต่างๆในการทำพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ OPT-07.ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร คือ ปริมาณจีโนมิคดีเอ็นเอ 40 นาโนกรัม นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเข้มข้นชนิดละ 100 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และ เอ็นไซม์ Taq polymerase 1.5 ยูนิต สำหรับอุณหภูมิและเวลาสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ คืออุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 39 รอบและรอบสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

Abstract

Optimal condition of RAPD-PCR in *Lansium domesticum* Corr. was determined using primer OPT-07. In total volume of 25 μl, the best suit concentration of PCR components are as followings: genomic DNA 40 ng, 100 μM each of nucleotidetriphosphate (dNTP) , 0.3 μM primer, 2.5 mM $MgCl_2$ and 1.5 units of Taq polymerase. The temperature profiles for PCR are 39 cycles of 95°C 1 min, 37°C 1 min. and 72° C 2 min. follow by 1 cycle of 95 °C 1 min., 37 °C 1 min. and 72 °C for 10 min.

คำหลัก: RAPD, PCR ลองกอง ลางสาด ดูกู

ORIGINAL ARTICLE

Establishment of experimental conditions on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lansium domesticum* Corr. II. primer screening and identification of longkong, langsat and duku

Suvimon Konlasuk[1], Charassri Nualsri[2] and Sompong Te-chato[3]

Abstract

Konlasuk, S., Nualsri, C. and Te-chato, S.

Establishment of experimental conditions on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lansium domesticum* Corr. II. primer screening and identification of longkong, langsat and duku

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2001, 23(3) : 325-334

RAPD patterns of *Lansium domesticum* Corr. were analyzed. Total genomic DNA was extracted from 12 plants each of longkong, langsat and duku from the department of Plant Science, Prince of Songkla University, Songkhla, Pattani and Narathiwat provinces. One of each was sampled for primer screening. Of 100 decamer oligonucleotide primers screened, 47 primers generated polymorphic DNA fragments but only 10 primers (OPA-01, OPB-04, OPB-07, OPC-04, OPC-05, OPC0-08, OPD-01, OPD-03, OPT-01 and OPT-08)

[1]M.S. (Plant Science), [2]Ph.D. (Agronomy), Asst. Prof., [3]Ph.D. (Plant Cell Technology), Assoc. Prof., Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

Corresponding e-mail : ncharass@ratree.psu.ac.th

Received, 29 March 2000 Accepted, 31 May 2001

showed clear and intense polymorphic bands between longkong, langsat and duku. These 10 primers were then used to identify and detect genetic variation in these 36 plants. No variation in RAPD pattern was observed in the longkong population, indicated its genetic uniformity. There were some differences in RAPD patterns within both the langsat and duku populations indicating their genetic variability. Based on the DNA fingerprint obtained from this study, longkong could clearly be distinguished from langsat and duku.

Key words : *Lansium domesticum*, RAPD, primer, genetic variation

บทคัดย่อ

สุวิมล กลศึก จรัสศรี นวลศรี และ สมปอง เตชะโต

การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA) ในพืชสกุลลางสาด II. การคัดเลือกไพรเมอร์และการแยกความแตกต่างระหว่างของลองกอง ลางสาด และดูกู

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2544 23(3) : 325-334

ศึกษาการแยกความแตกต่างระหว่างพืชสกุลลางสาด โดยการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี โดยสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบของต้นลองกอง ลางสาด และดูกู ชนิดละ 12 ต้น ซึ่งสุ่มจากสวนเกษตรกร จังหวัดปัตตานี นราธิวาส และแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ในเบื้องต้นทำการคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างพืชทั้งสามชนิด จากไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 100 ชนิดที่ทำการศึกษาพบว่า มีไพรเมอร์ 47 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน และในจำนวนนี้เลือกใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิดซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู ได้อย่างชัดเจน คือ OPA-01, OPB-04, OPB-07, OPC-04, OPC05, OPC-08, OPD-01, OPD-03, OPT-01 และ OPT-08 จากตัวอย่างต้นที่สุ่มมาชนิดละ 12 ต้น พบว่าลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกต้น ไม่ว่าจะทดสอบกับไพรเมอร์ใดก็ตาม แสดงว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรลองกอง ในขณะที่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในกลุ่มประชากรลางสาดและดูกู แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรทั้งสอง นอกจากนี้ยังพบว่า แถบดีเอ็นเอของลองกองทั้งหมดมีความจำเพาะกับลองกอง และแตกต่างจากแถบดีเอ็นเอของลางสาดและดูกู ซึ่งสามารถใช้แยกลองกองออกจากพืชอีกสองชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

ความมีชีวิต ลักษณะสัณฐานของละอองเกสรดูกูและการศึกษาความเป็นไปได้ในการผสมข้าม ระหว่างดูกู ลองกอง และลางสาด

Viability and Morphology of Duku Pollen and Crossing Ability between Duku , Longkong and Langsat

บทคัดย่อ

ทำการตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเกสรดูกูโดยการย้อมสีอะซีโตคาร์มีน 2 เปอร์เซนต์และการทดสอบความงอกในห้องปฏิบัติการก่อนที่จะใช้ในการผสมเกสร นอกจากนี้ยังทำการศึกษาขนาดและรูปร่างของละอองเกสร รวมถึงการพัฒนาของไมโครสปอร์ด้วย พบว่าละอองเกสรดูกูจาก 4 ต้นที่สุ่มมาศึกษาสามารถย้อมติดสี อะซีโตคาร์มีนในเปอร์เซนต์ที่ค่อนข้างสูง (50-97%) ในขณะที่ความงอกของละอองเกสรในอาหารวุ้นอยู่ระหว่าง 0- 4 % เท่านั้น บางต้นมีละอองเกสรที่ผิดปกติ เนื่องจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสของเซลล์แม่ไมโครสปอร์ผิดปกติ และเมื่อทำการทดสอบการผสมข้ามพบว่าละอองเกสรดูกูไม่สามารถงอกได้ในส่วนของตัวเมียของทั้งลองกองและลางสาด

Abstract

Viability of duku pollen was determined by stainnig with 2% acetocarmine and in vitro germination before crossing. Pollen morphology and pollen size including differentiation of microspore were also studied. High percentage of stained pollen was observed (50-97%), while pollen germination in vitro varied from 0- 4%. Some plants produced abnormal pollen based on irregular meiosis of pollen mother cells. Crossing between duku and longkong or langsat was not success since duku pollen could not germinate in the styles of both longkong and langsat.

คำหลัก ลองกอง ลางสาด ดูกู การผสมข้าม ความมีชีวิตของละอองเกสร ไมโครสปอร์

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	
การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมของพืชสกุลลางสาด	1
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
วัสดุและอุปกรณ์	4
วิธีการ	4
ผลและวิจารณ์	6
เอกสารอ้างอิง	11
การศึกษาสถานที่เหมาะสมในการทำ RAPD-PCRในพืชสกุลลางสาด	13
บทคัดย่อ	13
บทนำ	14
วัสดุและอุปกรณ์	17
วิธีการ	18
ผลและวิจารณ์	19
เอกสารอ้างอิง	26
Establishment of Experimental conditions on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lansium domesticum* Corr. II. Primer screening and identification of longkong. langsat and duku	29
Abstract	29
Materials and Methods	31
Results and Discussion	32
References	38
ความมีชีวิต ลักษณะสัณฐานของละอองเกสรดูกูและการศึกษาความเป็นไปได้ในการผสมข้ามระหว่างดูกู ลองกองและลางสาด	39
บทคัดย่อ	39
วัสดุและอุปกรณ์	40
วิธีการ	41
ผลและวิจารณ์	43
เอกสารอ้างอิง	52

การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมของพืชสกุลลางสาด (*Lansium domesticum* Corr.)

Study on Ploidy Levels of *Lansium domesticum* Corr.

บทคัดย่อ

จากการศึกษาชุดจำนวนโครโมโซมของพืชสกุลลางสาดได้แก่ ลองกอง ลางสาดและดูกู โดยการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก การนับจำนวนปากใบ/พื้นที่ วัดขนาดปากใบและปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่าโครโมโซมของพืชกลุ่มนี้มีขนาดเล็กและมีจำนวนมากทำให้ยากต่อการตรวจนับ อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนโครโมโซมของลองกองและดูกูมีจำนวนไกล้เคียงกัน ในขณะมี่ลางสาดมีจำนวนโครโมโซมมากกว่าพืชทั้งสองชนิด และเมื่อทำการวัดขนาดและนับจำนวนปากใบ พบว่าขนาดปากใบลองกองใหญ่ที่สุดและจำนวนปากใบมากที่สุดคือ 167.83 ไมโครเมตร และ27.83/ ตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือลางสาด (158.14 ไมโครเมตร และ27.83/ ตารางมิลลิเมตร) และดูกู (158.14 ไมโครเมตร และ 22.12/ ตารางมิลลิเมตร) ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับปริมาณคลอโรฟิลล์นั้นแม้ว่าลางสาดจะมีปริมาณสูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับพืชอีกสองชนิด

Abstract

The chromosome number from root tips of longkong, langsat and duku was investicated and ploidy levels was determined by comparison of stomatal density and size and cholophyll content measurement. Results from this study indicated that langsat has higher in chromosme number those of llongkong and duku. The size and stomatal density of longkong leaves were 167.83 um and 27.83/mm^2, repectively,which are significantly larger than of langsat.(158.14 um and 22.84/ mm^2) and duku (137.54 um and 22.12 mm^2). Eventhogh, nosignificantly different in cholophyll content was found, langsat tended to have the highest cholophyll content.

คำหลัก ลองกอง ลางสาด ดูกู โครโมโซม ปากใบ คลอโรฟิลล์

บทนำ

พืชสกุลลางสาดประกอบด้วยลองกอง ลางสาด และดูกู มีดอกเป็นแบบสมบูรณ์เพศ แต่พบว่าละอองเกสรมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นหมันสูง โดยเฉพาะลองกอง สันนิษฐานว่าน่าจะเกิดจากการที่พืชดังกล่าวนี้มีจำนวนชุดโครโมโซมหลายชุด มีรายงานว่าลางสาดมีจำนวนโครโมโซมถึง 8 ชุด (Bernado and Ramerez, 1959) ส่วนลองกองยังไม่มีการศึกษา การพัฒนาของผลส่วนใหญ่เกิดขึ้นโดยไม่มีการปฏิสนธิ (parthenocarpic fruit) ผลลองกองจึงมีเมล็ดน้อยหรือไม่มีเมล็ดเลย เมล็ดที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการพัฒนาของเซลล์นิวเซลลัส (nucellus) ซึ่งเรียกลักษณะนี้ว่า Apomixis จึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์น้อยมาก แต่ปัจจุบันพบว่าลองกองกลับมีเมล็ดต่อผลมากขึ้น รวมทั้งพบความแตกต่างในลักษณะทางสัณฐานและรสชาติแตกต่างกันในหลายพื้นที่ปลูก ความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมหรือพันธุกรรม ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด หรืออาจเป็นไปได้ว่าเกิดการผสมข้ามระหว่างพืชในกลุ่มนี้ เนื่องจากอุไรวรรณ นามศรี (2541) รายงานว่าดูกูพื้นเมืองมีการสร้างละอองเกสรที่ปกติและสามารถงอกได้เมื่อมีการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของพืชสกุลลางสาด ยังมีน้อยมากเมื่อเทียบกับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ ข้อมูลทางพันธุกรรมดังกล่าวจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนา และปรับปรุงพันธุ์พืชกลุ่มนี้ในอนาคต ดังนั้นจึงทำการศึกษาถึงจำนวนชุดโครโมโซมโดยวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซม จำนวนและขนาดของปากใบ หรือปริมาณคลอโรฟิลล์ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างในระดับเซลล์ของลองกอง ลางสาด และดูกู

จีโนม (genome) หมายถึง จำนวนโครโมโซมหรือยีนที่ครบถ้วนหนึ่งชุดถ่ายทอดมาจากพ่อหรือแม่ให้กับลูก ซึ่งก็คือโครโมโซมหรือยีนที่มีในแกมีทของพ่อหรือแม่ (อมรา คัมภิรานนท์, 2540) สิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปมีจำนวนชุดของโครโมโซมสองชุดเรียกว่า ดิพลอยด์ (diploid) แต่พบว่าพืชหลายชนิดมีโครโมโซมมากกว่าสองชุดซึ่งเรียกว่า โพลีพลอยด์ (polyploid) โดยพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะที่มีการแบ่งเซลล์สามารถบ่งชี้ระดับพลอยดี (ploidy level) หรือจำนวนชุดของโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตได้ การเกิดโพลีพลอยด์นับว่าเป็นกระบวนการสำคัญที่มีผลต่อการวิวัฒนาการของพืช พืชเศรษฐกิจสำคัญหลายชนิดที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันมีจำนวนชุดโครโมโซมมากกว่าสองชุด เช่น กล้วยหอมมีโครโมโซม 3 ชุด (Vandenhout *et al.*, 1995) หรือมันฝรั่งมีโครโมโซม 4 ชุด (Yamada *et al.*, 1998) ส่วนลางสาดนั้น Bernado และ Ramirez (1959) รายงานว่ามีจำนวนโครโมโซมถึง 8 ชุด (octoploid) สำหรับลองกองและดูกูยังไม่มีรายงาน อย่างไรก็ตามพืชทั้งสามชนิดนี้อาจมีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันเนื่องจากความมีชีวิตของละอองเกสรแตกต่างกัน ซึ่งอุไรวรรณ นามศรี และคณะ (2543) รายงานว่า ดูกูมีการสร้างละอองเกสรเป็นจำนวนมาก และละอองเกสรเหล่านี้สามารถงอกได้เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่ละอองเกสรของลองกองและลางสาดมีจำนวนน้อยมากและเกือบทั้งหมดเป็นหมัน

การตรวจสอบจำนวนชุดของโครโมโซมพืชสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การนับจำนวนโครโมโซม ซึ่งส่วนของพืชที่นำมาศึกษาเป็นบริเวณที่เนื้อเยื่อมีเซลล์รวมกันไม่หนาแน่นและเซลล์มีการแบ่งตัวสูง ที่นิยมใช้ คือ บริเวณปลายรากเป็นตัวอย่างในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส และส่วน

ของอับละอองเกสรตัวผู้ในดอกตูมเป็นตัวอย่างในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสเพื่อสร้างละอองเกสร นอกจากนี้การตรวจสอบจำนวนโครโมโซมอาจใช้ส่วนของปลายยอด หรือเอนโด
สเปิร์ม (endosperm) ในเมล็ดที่กำลังเจริญก็ได้

การตรวจนับจำนวนโครโมโซมโดยวิธีกดเซลล์บนแผ่นสไลด์ (squash preparation) เป็นการขยี้หรือกดเซลล์ให้กระจายเพื่อใช้ศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซม อาจเป็นการนับจำนวนหรือศึกษาลักษณะของโครโมโซมในระยะเมตาเฟสซึ่งมีขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน

1. การทำพรีทรีตเมนต์ (pre-treatment) เป็นการทำให้เซลล์พืชหยุดการแบ่งไมโตซีสในระยะเมตาเฟส ซึ่งเป็นระยะที่โครโมโซมมีการหดตัวและมองเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด

2. การหยุดวงชีพเซลล์ (fixative) เป็นการทำให้เซลล์พืชคงสภาพเดิมโดยแช่เซลล์ในน้ำยาคาร์นอย (carnoy's solution) ซึ่งประกอบด้วย แอลกอฮอล์ชนิดเข้มข้น และ กรดอะซีติกเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 3:1 น้ำยาดังกล่าวนี้รักษาสภาพเซลล์ เพื่อให้โปรโตพลาสซึมภายในเซลล์หยุดกระบวนการต่างๆ และให้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด สามารถซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เร็ว และคงสภาพของเนื้อเยื่อได้ใกล้เคียงกับสภาพปกติมากที่สุดด้วย (ภูวดล บุตรรัตน์, 2528)

3. การย้อมสี (staining) เป็นการย้อมสีเนื้อเยื่อ และส่วนต่างๆ ช่วยให้เห็นความแตกต่างของรายละเอียดภายในได้ชัดเจน สีที่ใช้ย้อมมีคุณสมบัติในการติดเนื้อเยื่อต่างกันไป ตัวอย่างสีที่ใช้ย้อม เช่น อะซีโตคาร์มีน (Chen and Palmer, 1985; Hopkins *et al.*, 1996) คาร์มีนเป็นสีที่ได้จากธรรมชาติ มีสีแดง ได้จากการรวมตัวของอะลัม (alum) และสารสีแดงของกรดคาร์มินิก (carminic acid) จากแมลงคอชินีล (cochineal) นอกจากนี้ยังมีสีที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น เช่น ฟุสชีน (fushin) (Song *et al.*, 1997) เป็นต้น

4. การขยี้เซลล์ (squashing) เป็นขั้นตอนการขยี้เซลล์ให้แบน และกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ในขณะเดียวกันก็เป็นการกดให้โครโมโซมกระจายตัวออกเพื่อให้ง่ายต่อการนับจำนวนโครโมโซม

ในกรณีที่พืชชนิดนั้นมีโครโมโซมขนาดเล็กและมีจำนวนมาก การนับจำนวนโครโมโซมทำได้ยาก ดังนั้นการตรวจสอบระดับพลอยดีอาจต้องใช้วิธีการอื่นควบคู่กันไปด้วย เช่น ขนาดและจำนวนปากใบ หากขนาดใหญ่จำนวนปากใบน้อยมีพลอยดีสูง ในขณะที่มีระดับพลอยดีต่ำจะมีขนาดปากใบเล็กแต่มีจำนวนปากใบมาก (Vandenhout *et al.*, 1995) และการเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยราตรี สุจารีย์ (2540) พบว่ามังคุดที่ได้รับการทรีตโคลชิซินมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่าต้นที่ไม่ได้ทรีต นอกจากนี้ยังสามารถหาระดับพลอยดีได้จากการวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโทเมทรี (Awoleye *et al*, 1994 ; Zonneveld and van-Iren, 2000) เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมของพืชสกุลลางสาดซึ่งได้แก่ ลองกอง ลางสาด และดูกู

วัสดุและอุปกรณ์

1. **วัสดุ**

1.1 วัสดุพืช

- ต้นกล้าลองกอง ลางสาด และดูกูชนิดละ 5 ต้น

1.2 สารเคมี

- ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของต้นพืช สำหรับการเลี้ยงต้นกล้าในสารละลายเพื่อชักนำรากเช่น NH_4NO_3, KCl, K_2PO_4 Ca_2SO_4 เป็นต้น
- สารเคมีสำหรับย้อมสีโครโมโซมพืชได้แก่ ไฮดรอกซีควิโนลีน (Hydroxy quinoline), กรดไฮโดรคลอริค (HCl), กรดอะซิติก (Acetic acid), อะซีโตคาร์มีน (Acetocarmine), และเอทานอล (Ethanol) เป็นต้น

2. **อุปกรณ์**

- กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์
- สไลด์และแผ่นปิดสไลด์
- Ocular micrometer
- Stage micrometer

วิธีการ

1.1 การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก

นำต้นกล้าลองกอง ลางสาด และดูกู ที่ได้จากการเพาะเมล็ดมาเลี้ยงในสารละลายที่ประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เพื่อกระตุ้นการสร้างรากใหม่ที่สมบูรณ์และสะอาด ตัดปลายรากลองกอง ลางสาด และดูกูที่เลี้ยงในสารละลายยาวประมาณ 0.5 เซ็นติเมตรใส่ในหลอดแก้วซึ่งบรรจุสารละลายพรีทรีตเมนต์ คือ ไฮดรอกซีควิโนลีนเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำรากออกจากสารละลายพรีทรีตเมนต์ใส่ลงในอะซีติกอัลกอฮอล์ (เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และ กรดอะซีติก 100 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 3:1) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำรากใส่ในหลอดแก้วที่มีกรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เอาออกจากกรดไฮโดรคลอริคมาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ใส่ลงในหลอดแก้วซึ่งมีอะซิโตคาร์มีน เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ที่เย็น 30 นาที เพื่อให้รากติดสีดีขึ้น ตัดปลายรากส่วนที่ติดสีแดงเข้มมาวางบนสไลด์ หยดกรดอะซิติก เข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ 1-2 หยด ใช้ปากคีบขยี้เนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นเล็กๆ ปิด coverglass ลงบนแผ่นสไลด์บริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้ปลายดินสอด้านที่มียางลบเคาะเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัว ใช้นิ้วหัวแม่มือกดให้เซลล์อยู่บนระนาบเดียวกัน นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อตรวจหาเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะเมตาเฟส ตรวจนับจำนวนโครโมโซม ในกรณีที่ต้องการเก็บรักษารากในระยะเวลานาน หลังจากแช่รากในอะซี

ติกอัลกอฮอล์แล้วเก็บรักษารากไว้ในเอทธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืดซึ่งสามารถเก็บได้นาน 6-12 เดือน (ทำการตรวจนับจากปลายรากของแต่ละต้นจำนวนชนิดละ 5 ต้นๆละ 10 เซลล์)

1.2. การศึกษาเปรียบเทียบจำนวน และขนาดของปากใบ

นับจำนวนและวัดขนาดปากใบโดยการนำใบลองกอง ลางสาด และดูกู มาลอกเอาเนื้อเยื่อบางๆ บริเวณผิวชั้นนอกของหลังใบ วางเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ พร้อมกับหยดอะซิโตคาร์มีน เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงบนสไลด์ 1-2 หยด ปิดด้วยแผ่นปดสไสด์ นับจำนวนและวัดขนาดปากใบโดยใช้ ocular micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์กำลังขยาย 40 เท่า วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) ทำการทดลองโดยใช้ตัวอย่างละ 3 ต้นๆ ละ 3 ใบๆ ละ 4 จุด เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้ระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู ด้วยวิธี DMRT (Duncan' s multiple range test)

1.3 การหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี

เก็บใบลองกอง ลางสาด และดูกูที่มีอายุและสีใบใกล้เคียงกันมาตัวอย่างละ 5 ต้นๆ ละ 3 ใบ ตัดให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำมาบดให้ละเอียดในโกร่งร่วมกับแมกนีเซียมคาร์บอเนต ปริมาณ 0.5 กรัม และอะซิโตน เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมอะซิโตนที่ความเข้มข้นเดียวกันเพิ่มอีก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำมาปั่นที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนบนเก็บไว้ เพื่อนำมาหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 647 นาโนเมตร สำหรับคลอโรฟิลล์เอ และ 664 นาโนเมตร สำหรับคลอโรฟิลล์บีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตรของ Inskeep และ Bloom (1985) อ้างโดย Jeff และคณะ (1996) ดังนี้

$$E = 17.90E_{647} + 8.08E_{664}$$

โดย E คือ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และบี

E_{647} และ E_{664} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์เอและบีตามลำดับ

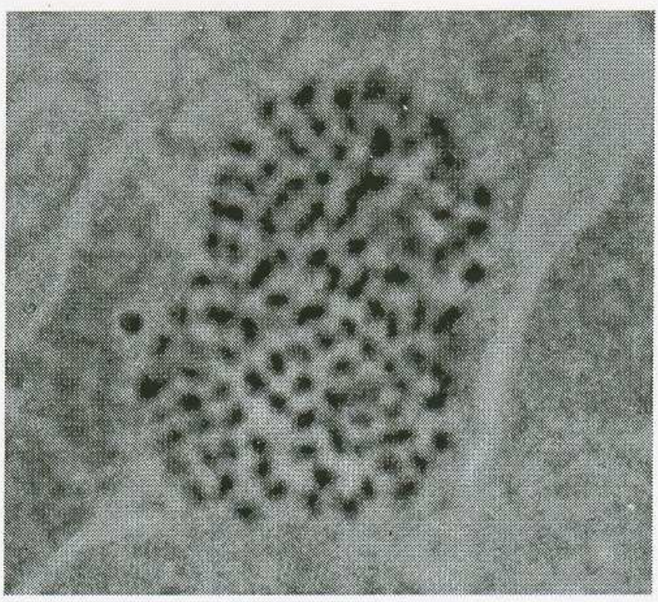
นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกูเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 1.2

ผลและวิจารณ์

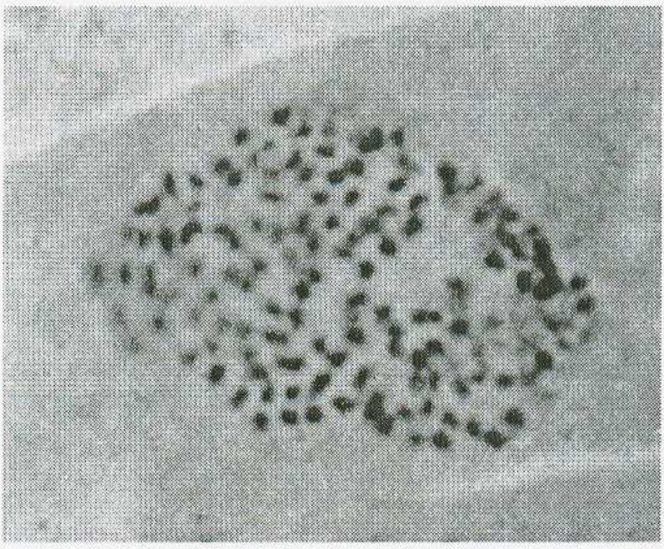
จากการนับจำนวนโครโมโซมปลายรากลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า โครโมโซมของพืชสกุลนี้มีขนาดเล็กและมีจำนวนมาก ทำให้เกิดความยุ่งยากในการนับจำนวนที่แน่นอน จากการสุ่มนับจำนวน 5 เซลล์ที่มีการกระจายตัวของโครโมโซมดีที่สุดจากแต่ละชนิด พบว่าจำนวนที่นับจากแต่ละเซลล์ไม่เท่ากัน โดยลางสาดมีจำนวนโครโมโซมมากกว่าลองกองและดูกูคือนับได้ประมาณ 137-144 แท่ง ในขณะที่ลองกองและดูกูมีจำนวนโครโมโซมไกล้เคียงกันคือประมาณ 121-129 แท่ง (รูปที่ 1) จากการศึกษาของ Bernado และ Rameirez (1959) พบว่าลางสาดมีจำนวนโครโมโซม 72 คู่หรือ 144 แท่งและมีโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 18 ดังนั้นจึงสรุปว่าลางสาดมีจำนวนโครโมโซม 8 ชุด (octapolid) ซึ่งไกล้เคียงกับผลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ แม้ว่าการตรวจนับจำนวนโครโมโซมเปรียบเทียบกันจะเป็นวิธีการที่ดีที่สุดในการศึกษาระดับพลอยดี (Ploidy level) หรือจำนวนชุดโครโมโซมในพืช แต่วิธีการนี้อาจมีข้อจำกัดหากพืชที่ศึกษามีจำนวนโครโมโซมมาก หรือพืชนั้นมีโครโมโซมขนาดเล็กดังเช่นที่ประสบในพืชสกุลสางสาด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้วิธีอื่นควบคู่กันไปด้วยเพื่อการยืนยันผลที่ถูกต้อง การวัดขนาดของปากใบและนับจำนวนปากใบเป็นอีกวิธีการที่มีผู้ศึกษาและมีรายงานว่าสามารถเปรียบเทียบจำนวนชุดโครโมโซมได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น การวัดขนาดปากใบในพริกไทยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงละอองเกสร (Qin and Rotino,1995) และการนับจำนวนปากใบในกล้วย (Vandenhout *et al.*, 1995) ซึ่งพบว่าขนาดและความหนาแน่นของปากใบมีความสัมพันธุ์โดยตรงกับจำนวนชุดโครโมโซม คือที่ระดับพลอยดีต่ำจะมีความหนาแน่นของปากมากแต่มีขนาดปากใบเล็ก ในทางตรงกันข้าม ที่ระดับพลอยดีสูงขนาดปากใบใหญ่แต่มีจำนวนน้อย ทำนองเดียวกับการศึกษาของ Cohen และ Yao (1996) พบว่า Zanteschia ที่ได้รับการทรีตด้วยโคลชิซีนเพื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมนั้น ปากใบมีความยาวมากกว่าต้นปกติ นอกจากนี้ยังสามารถหาระดับพลอยดีได้โดยการหาปริมาณคลอโรฟิลล์ เช่นการศึกษาในมังคุด (ราตรี สุจารีย์, 2540) หรือการนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในต่ละ quard cell

จากการนับจำนวนปากใบภายไต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์กำลังขยาย 400 เท่า ของลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่าความหนาแน่นของจำนวนปากใบลองกอง ลางสาด และดูกูมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.05$) โดยลองกองมีจำนวนปากใบมากที่สุด เท่ากับ 37.57 ต่อตารางมิลลิเมตร รองลงมา คือ ลางสาด เท่ากับ 30.83 ต่อตารางมิลลิเมตร และดูกูมีจำนวนปากใบน้อยที่สุด เท่ากับ 29.87 ต่อตารางมิลลิเมตร (ตารางที่ 1) สำหรับขนาดของปากใบก็เช่นเดียวกัน พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P = 0.01$) โดยลองกองมีขนาดปากใบใหญ่ที่สุด เท่ากับ 167.80 ไมโครเมตร รองลงมา คือ ลางสาด เท่ากับ 158.14 ไมโครเมตร และดูกูมีขนาดปากใบเล็กที่สุด เท่ากับ 137.54 ไมโครเมตร (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2) เป็นที่น่าสังเกตว่าการกระจายตัวของปากใบในลองกองแตกต่างจากลางสาดและดูกู กล่าวคือปากใบลองกองจะรวมตัวเป็นกระจุก ไม่ได้มีการกระจายสม่ำเสมอดังที่พบในลางสาดและดูกู เมื่อทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของพืชทั้งสามชนิด พบว่า ลางสาดมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงที่สุด เท่ากับ 12.58 ส่วนลองกองและดูกูมีปริมาณคลอโรฟิลล์ใกล้เคียงกัน เท่ากับ 10.42 และ 10.8 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามปริมาณคลอโรฟิลล์

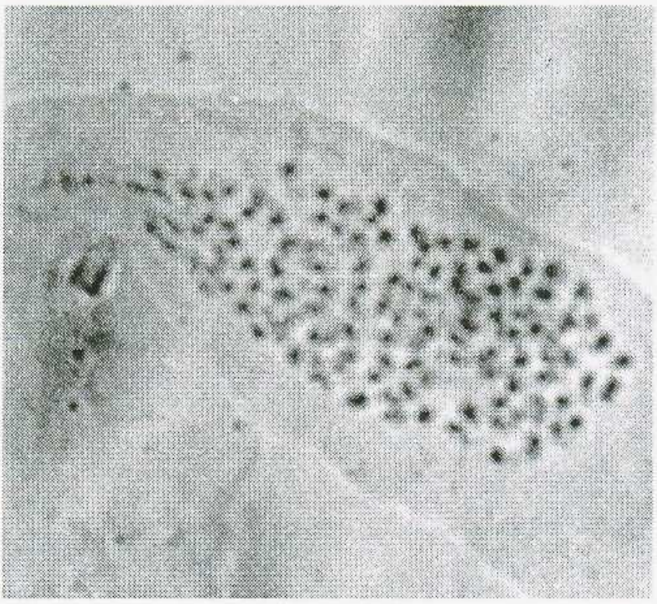
ของพืชทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากผลการทดลองครั้งนี้ยังไม่สามารถระบุแน่ชัดถึงจำนวนโครโมโซมของพืชสกุลลางสาด อาจต้องอาศัยเทคนิคอื่นเพื่อยืนยันผลที่ชัดเจนต่อไป



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 1 โครโมโซมของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และ ดูกู (ค)

ตารางที่1 . จำนวนปากใบของลองกอง ลางสาด และดูกู

ชนิด	จำนวนปากใบ/มม^2
ลองกอง	27.83[a]
ลางสาด	22.84[b]
ดูกู	22.12[b]
F-test	*
C.V. (%)	11.20

Means followed by different letters within column differ significantly(P=0.05) by DMRT

ตารางที่ 2. ขนาดปากใบของลองกอง ลางสาด และ ดูกู

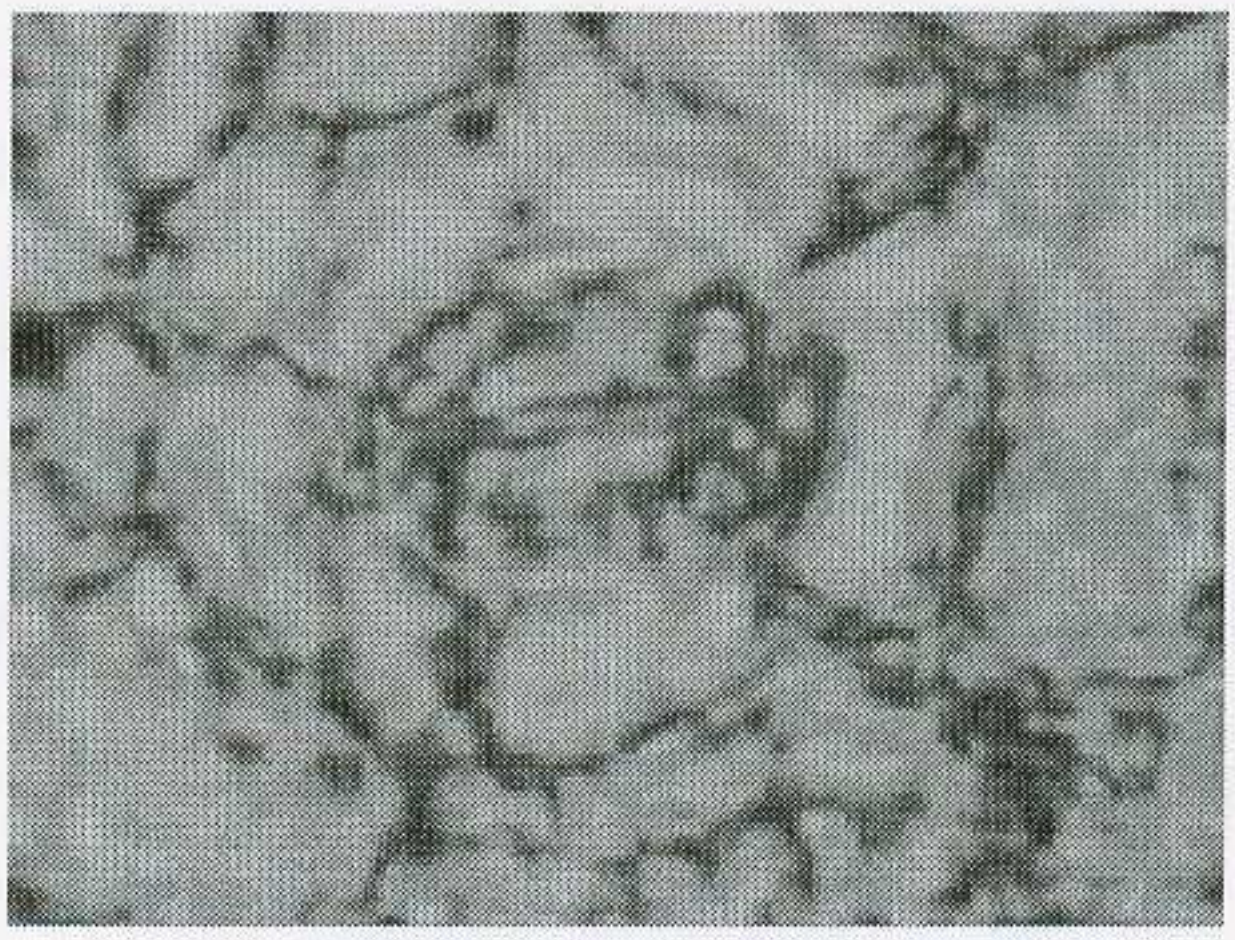
ชนิด	ขนาดปากใบ (ความยาว : u)
ลองกอง	167.80[a]
ลางสาด	158.14[ab]
ดูกู	137.54[b]
F-test	**
C.V. (%)	7.84

Means followed by different letters within column differ highly significantly(P=0.001) by DMRT

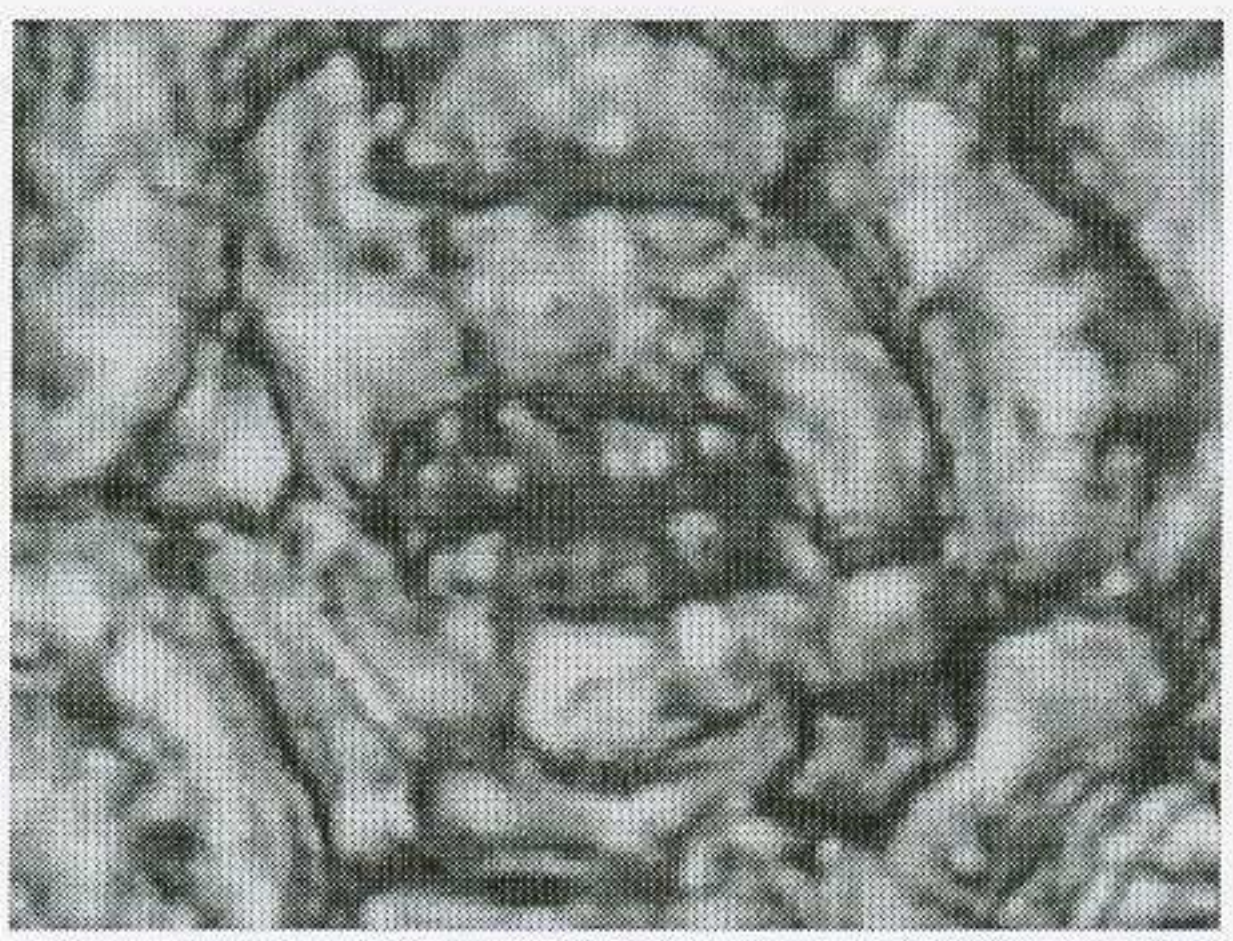
ตารางที่ 3. จำนวนคลอโรฟิลล์รวม (a and b) ที่สกัดจากใบลองกอง ลางสาดและ ดูกู

ชนิด	ปริมาณคลอโรฟิลล์
ลองกอง	10.42
ลางสาด	12.58
ดูกู	10.08
F-test	ns
C.V. (%)	11.43

ns : non significantly analysis



(ก)



(ข)

(ค)

รูปที่ 2 ลักษณะปากใบของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค)

เอกสารอ้างอิง

ภูวดล บุตรรัตน์. 2528. เทคนิคทางพฤกษศาสตร์. ปัตตานี : ภาควิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสาตร์แลเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ราตรี สุจารีย์. 2540. การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้โคลชิซินในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุไรวรรณ นามศรี. 2541. การเจริญเติบโตและการพัฒนาการของละอองเกสรของลองกอง ลางสาด และดูกู. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อุไรวรรณ นามศรี มงคล แซ่หลิม และจรัสศรี นวลศรี 2543. ความมีชีวิตของละอองเรณูของลองกอง ลางสาด และดูกู. ว.สงขลานครินทร์ 22: 35-41.

Awoleye, F., van Duren, M., Dolezel, J. and Novak, F. J. 1994. Nuclear DNA content and *in vitro* induce somatic polyploidization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding. Euphytica 76:195-202.

Bernado, F.A. and Ramirez, D.A. 1959. Cytology of Philippine Plant III. *Lansium domesticum* Correa. The Philippine Agriculturist. 43: 375-377.

Cohen, D. and Yao, J.L. 1996. *In vitro* chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultiuars. Plant Cells, Tissue and Organ Culture 47: 43-49

Jeff, L.S., Eakes, D.J. Gillian, C.H., Keener, G.T., Donizor, W.A. and Himesirick, D.G. 1996. Foliar SPAD-502 meter values, nitrogen levels and extractable chlorophyll for red maple selection. HortScience 31: 468-740.

Qin, X. and Rotino, G.L. 1995. Chloroplast number in guard cell as ploidy indicator of in vitro grown and rogenic pepper plantlets. Plant cell, Tissue and Organ Culture 41: 145-149

Song, P., Kang, W. and Peffley, E.B. 1997. Chromosome doubling of *Allium fistulosum* x *A. cepa* interspecific F_1 hybrid through colchicine treatment of regenerating callus. Euphytica 93: 257-262

Vandenhout, H., Qrtiz, R., Vuylsteke, D., Swennen, R. and Bai, K.V. 1995. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plaintain and banana hybrids. Euphytica 83: 117-122

Yamata, T., Hosaha, K., Nakagawa, K., Kaide, N., Misoo, S. and Kamijima, O. 1998. Nvcleas genome constitution and other characteristics of somatic hybrids between dipaploid *Solanum acaule* and tetraploid *S. tuberosum* Euphytica 102: 239-246.

Zonneveld, B.J. M. and van-Iren, F. 2000. Flow cytometric analysis of DNA content in *Hosta* reveals ploidy chimeras. Euphytica 111:105-110.

การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการทำ RAPD-PCR ในพืชสกุลลางสาด

Experimental Conditions of RAPD-PCR in *Lansium domesticum* Corr.

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยเทคนิค RAPD สำหรับพืชสกุลลางสาด (*Lansium domesticum* Corr.) โดยตรวจสอบความเข้มข้นขององค์ประกอบของสารต่างๆในการทำพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ OPT-07.ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร คือ ปริมาณจีโนมิคดีเอ็นเอ 40 นาโนกรัม นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเข้มข้นชนิดละ 100 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และ เอ็นไซม์ Taq polymerase 1.5 ยูนิต สำหรับอุณหภูมิและเวลาสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ คืออุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 39 รอบและรอบสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

Abstract

Optimal condition of RAPD-PCR in *Lansium domesticum* Corr. was determined using primer OPT-07. In total volume of 25 μl, the best suit concentration of PCR components are as followings: genomic DNA 40 ng, 100 μM each of nucleotidetriphosphate (dNTP) , 0.3 μM primer, 2.5 mM $MgCl_2$ and 1.5 units of Taq polymerase. The temperature profiles for PCR are 39 cycles of 95°C 1 min, 37°C 1 min. and 72° C 2 min. follow by 1 cycle of 95 °C 1 min., 37 °C 1 min. and 72 °C for 10 min.

คำหลัก: RAPD, PCR ลองกอง ลางสาด ดูกู

บทนำ

การจำแนกพันธุ์พืชในอดีตใช้ลักษณะทางสัณฐาน ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยสายตา แต่เนื่องจากบางพืชมีลักษณะใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ พืชในสกุล *Lansium* ก็เช่นกันสามารถใช้ลักษณะและรสชาติของผลจำแนกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกูได้ แต่ต้องใช้ระยะเวลานานถึง 7 ปี กว่าพืชเหล่านี้จะติดผล ดังนั้นการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล คือ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างและความแปรปรวนที่เกิดขึ้น สามารถทำได้อย่างแม่นยำ เพราะเป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอโดยตรง เทคนิคดังกล่าวนี้ยังสามารถใช้ในการพิสูจน์พันธุ์ได้อีกด้วย ผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการวิจัยขั้นสูงต่อไป

RAPD เป็นวิธีการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเฉพาะบริเวณที่สนใจให้มีปริมาณสูงขึ้นเป็นล้านเท่าด้วยการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) จากปฏิกิริยาในหลอดทดลองที่เกิดขึ้นซ้ำๆกันหลายๆรอบ

ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

1. การแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturation step) เป็นขั้นตอนที่ให้ความร้อนแก่ดีเอ็นเอสายคู่ ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 94 - 95 องศาเซลเซียสเพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว อุณหภูมิในขั้นตอนนี้ถ้าสูงเกินไป จะทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพ แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปจะทำให้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์แยกสายไม่สมบูรณ์

2. การจับคู่ระหว่างไพรเมอร์และส่วนของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (Annealing step) อุณหภูมิในช่วงนี้ถือว่าสำคัญมาก เพราะเป็นขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับบริเวณดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่มีลำดับเบสคู่สมกัน เกิดขึ้นที่อุณหภูมิประมาณ 30-60 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณและสัดส่วนของกัวนีน (guanine, G) และไซโตซีน (cytosine, C) ซึ่งมีผลต่อ melting temperature (Tm) ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปจะทำให้ปฏิกิริยามีความจำเพาะน้อย เช่น ในพืชสกุล *Passiflora* L. ใช้อุณหภูมิในช่วง annealing 36 องศาเซลเซียส (Fajardo *et al*., 1998) ในขณะที่ในข้าวสาลีใช้อุณหภูมิ annealing สูงถึง 50 องศาเซลเซียส (Gill and Gill, 1996) จากนี้แล้วความยาวของไพรเมอร์ที่ใช้ก็มีผลต่ออุณหภูมิดังกล่าวนี้ด้วย

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Extension step) เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการต่อดีออกซีนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลายด้าน 3' OH ของไพรเมอร์โดยใช้เอนไซม์ที่ทนต่อความร้อน ปกติแล้วมักใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอ

โพลีเมอเรส ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้งสามขั้นตอนนี้ใช้เวลาสั้นๆ และหมุนเวียนเป็นรอบๆ ประมาณ 24 – 45 รอบ แต่ละรอบจะได้ดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากเดิมในลักษณะทวีคูณ เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) ทั้งนี้เวลาที่ใช้เปลี่ยนจากอุณหภูมิหนึ่งไปยังอุณหภูมิหนึ่งต้องไม่น้อยเกินไปหรือนานเกินไป โดยเฉพาะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนที่ 2 เปลี่ยนไปเป็น ขั้นตอนที่ 3 ถ้านานเกินไปจะทำให้ไพรเมอร์ที่จับอยู่กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ถูกแยกสายออกมาเป็นดีเอ็นเอสายเดียวอีกครั้ง (Weising *et al.*, 1995)

ปัจจัยที่มีผลต่อความเที่ยงตรงของเทคนิค RAPD

1.ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (Template DNA) เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างพืช ในกรณีของ RAPD-PCR ต้องการดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในปริมาณน้อยแต่ต้องการดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่มีคุณ-ภาพสูง นิยมใช้ตั้งแต่ 5 - 500 นาโนกรัม แต่โดยทั่วไปมักใช้ 10 - 50 นาโนกรัม การสกัดดีเอ็นเอจากพืชมีหลายวิธีการ แต่ละวิธีมีความเหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด และงานที่ต้องนำไปใช้ คือต้องการปริมาณดีเอ็นเอมากหรือน้อย มีความบริสุทธิ์เพียงใด ซึ่งวิธีการโดยทั่วไปคือ สกัดดีเอ็นเอโดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีเกลือ CTAB (Mudge *et al.*, 1996 ; Gunter *et al.*, 1996 ; Barrett *et al.*, 1997 ; Doyle and Doyle, 1990) ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติมคลอโรฟอร์ม หรือฟีนอล และกำจัดอาร์เอ็นเอด้วยเอ็นไซม์อาร์เอ็นเอเอส (RNAse) ส่วน EDTA ซึ่งเป็นส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ช่วยป้อง-กันดีเอ็นเอไม่ให้ถูกทำลายจาก endogenous nuclease โดย EDTA จะไปจับกับแมกนีเซียมซึ่งเป็น co-factor ช่วยในการทำงานของเอ็นไซม์ (Rogers and Bendich, 1988)

ตัวอย่างพืชที่นำมาสกัดควรเป็นตัวอย่างสด แต่ถ้าจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างไว้เป็นเวลานาน การเก็บให้ถูกต้องเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีที่สุด จากการศึกษาเก็บพืชไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ ที่อุณหภูมิต่ำ (frozen) อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิสูง เพื่อประเมินคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ พบว่าเมื่อนำใบพืชเหล่านี้มาสกัดดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบสด พบว่าใบพืชที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน ยังสามารถให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ PCR ดีอยู่ (Thomson and Henry, 1998)

2. บัฟเฟอร์ (Buffer) บัฟเฟอร์ที่ใช้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของบัฟเฟอร์ที่ใช้จริง ซึ่งจะใส่ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา บัฟเฟอร์มักประกอบด้วย Tris - HCl pH 8.3 -8.4, gelatin, KCl และ Triton X -100 โดย gelatin ช่วยรักษาสภาพความคงตัวของเอนไซม์ Triton X -100 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ให้มีความจำเพาะมากขึ้น ส่วน KCl ช่วยให้ปฏิกิริยา การจับคู่ระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอแม่พิมพ์เกิดได้ดีขึ้น ถ้าความเข้มข้นของ KCl มากเกินไป จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส จากการทดลองในสาคูของ Boonsermsuk และคณะ (1996)

พบว่าความเข้มข้นของ KCl ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ คือ 80 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ความเข้มข้น 85, 90, 95, 100 และ110 มิลลิโมลาร์ ไม่สามารถให้แถบดีเอ็นเอได้ (Boonsermsuk *et al*., 1996)

3.แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เนื่องจากแมกนีเซียมคลอไรด์ไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส ถ้าความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนไม่เพียงพอ จะมีผลให้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสไม่ทำงานหรือทำงานไม่สมบูรณ์ ในทางตรงกันข้ามถ้าความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมากเกินไป ทำให้ความเที่ยงตรงของเอนไซม์ลดลง หรืออาจทำให้ผลผลิต PCR ที่ได้ไม่มีความจำเพาะเจาะจง (non-specific amplification) ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ใช้อยู่ทั่วไปอยู่ในช่วงกว้าง คือ 1.5 - 10 มิลลิโมลาร์ จากการทดลองใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสาคู (Boonsermsuk *et al*., 1996) พืชในสกุล *Cymbidium* (Obara-Okako, 1998) และพืชสกุล *Alstroemeria* (Anastassopoulos and Keil, 1996) พบว่าความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ของแมกนีเซียมคลอไรด์ให้แถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนที่สุด ในขณะที่การทำ PCR ในอ้อยต้องใช้แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้นถึง 4 มิลลิโมลาร์ (Huckett and Botha, 1995)

4. ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTPs) ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ใช้ในการเติมสายดีเอ็นเอเพื่อให้เกิดดีเอ็นเอสายใหม่ หากความเข้มข้นของดีออกซีนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งในจำนวนสี่ตัวลดลงจะมีผลทำให้ความจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยา PCR ลดลง ดังนั้นในการทดลองจึงควรใช้ความเข้มข้นของดีออกซีนิวคลีโอไทด์ทั้งสี่เท่ากัน

5.เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) เดิมในการทำ PCR ใช้เอ็นไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* คือ DNA polymerase I klenow fragment แต่เนื่องจากเอ็นไซม์ชนิดนี้ทนความร้อนสูงไม่ได้ ดังนั้นต่อมาจึงเปลี่ยนมาใช้เอ็นไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่ชื่อ *Thermus aquaticus* โดยมีข้อได้เปรียบคือสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 95 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้สำหรับทำให้ดีเอ็นเอสายคู่เปลี่ยนเป็นสายเดี่ยวในกระบวนการทำ PCR ตัวอย่างเอ็นไซม์ที่นิยมใช้ในการทำ PCR ได้แก่ Taq polymerase (Promega) (Degani *et al*.,1998) และ Ampli Taq (Perkin Elmer) (Jiang and Sink, 1997 ; Huckett and Botha, 1995 ; Mackill, 1995) เอนไซม์เหล่านี้มีคุณสมบัติ 5' -----> 3' exonuclease (Weising *et al*., 1995) โดยช่วยให้มีการเชื่อมต่อไพรเมอร์ด้วยดีออกซีนิวคลีโอไทด์ เพื่อให้เกิดดีเอ็นเอสายใหม่ตลอดแนวของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส มักอยู่ในสารละลายที่ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร และใช้ในปฏิกิริยาที่ความเข้มข้น 2.5 - 5 หน่วยต่อปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร

6. ไพรเมอร์ (Primer) เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆที่สังเคราะห์ขึ้น มีความยาวประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ (Harvey and Botha, 1996 ; Hraind *et al*., 1998 ; Wolff, 1996) ไพรเมอร์เป็นส่วน

สำคัญในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นตัวสุ่มจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในตำแหน่งที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ไพรเมอร์ที่ดีควรมีความจำเพาะกับลำดับเบสคู่สมในดีเอ็นเอแม่พิมพ์ สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ได้อย่างคงตัว และไม่เกิดการจับกับตัวเองในลักษณะ hairpin loop หรือ self dimer โดยทั่วไปไพรเมอร์จะละลายอยู่ในน้ำ หรือในสารละลาย TE ที่ความเข้มข้น 0.1 - 2.0 ไมโครโมลาร์

การใช้เทคนิค RAPD ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอ (arbitrary primer) ใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม แยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) บนอะกาโรสเจล แล้วย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากการที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอสองบริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน (5' ------> 3') จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงดังกล่าวได้ แต่ถ้าไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดียวกันทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายแต่ทิศทางแยกออกจากกัน หรือเกาะได้ในสองสายห่างไกลกันมาก แม้ทิศทางจะเข้ากันก็ไม่สามารถเกิดผลผลิตได้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา เพื่อศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดลองโดยการทำพีซีอาร์สำหรับเทคนิค RAPD .ในพืชสกุลลางสาด

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

- ใบลองกอง ดูกู และลางสาด เก็บจากแปลงภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- CTAB buffer C 1.0 % PVP-40, 1.4 M. NaCl, 20.0 mM EDTA, 100.0 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.0 % CTAB และ 10 % (-mercaptoethanol
- Extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA และ 10% SOS)
- Rose buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 312.5 mM EDTA pH 8.0)
- TE buffer (1.0 mM Tris-HCl pH 7.5 และ0.25 mM EDTA)
- Isopropanol

- 70 % ethanol

1.3 สารเคมีที่ได้ในปฏิกิริยา PCR

- $dNTP_3$ (dATP, dTTP, dGTP และ dCTP) (บริษัท Promega, U.S.A.)
- Primer (OPA 01-20, OPB 01-20 และ OPT 01-20)
- $MgCl_2$ (บริษัท Promega, U.S.A.)
- Taq DNA Polymerase B (บริษัท Promega, U.S.A.)
- 10x Taq buffer (บริษัท Promega, U.S.A.)

1.4 สารเคมีสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซีส

- Agarose
- Tris Acetic buffer (TAE buffer)
- Tris Borate buffer (TBE buffer)
- Ethidium bromide
- Loading buffer
- 100 pb DNA Ladder (บริษัท Operon, U.S.A.)
- Liquid Nitrogen

2. อุปกรณ์

- เครื่อง PCR
- อุปกรณ์อิเล็กโตรโฟรีซีส
- UV transilluminator
- โกร่งบดตัวอย่าง
- ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
- ตู้เย็น -30 อาศาเซลเซียส
- ปิเปตปรับปริมาตร
- หลอดแอพเพนดอร์ป
- Tips
-ตู้ไมโครเวฟ

วิธีการ

ในการศึกษาเบื้องต้นเป็นการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบของลองกอง ซึ่งเป็นตัวแทนของพืชสกุลลางสาด โดยวิธีการที่ประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1990) มาทำ PCR โดยการใส่สารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ในระดับหนึ่งดังนี้

- ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เข้มข้น 80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
- บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาณ 2 ไมโครลิตร
- แมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์
- ดีออกซีนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์
- ไพรเมอร์ เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์
- Taq Polymerase เข้มข้น 1 ยูนิตต่อปฏิกิริยา
- น้ำกลั่น

นำมาทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้

1 95 องศาเซลเซียส 1 นาที

37 องศาเซลเซียส 1 นาที

72 องศาเซลเซียส 2 นาที

ทำซ้ำ 39 รอบ

2 95 องศาเซลเซียส 1 นาที

37 องศาเซลเซียส 1 นาที

72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นจึงศึกษาหาสภาพต่างๆ ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำ PCR โดยการทดสอบเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารดังนี้

- ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เข้มข้น 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
- แมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 1, 2, 2.5, 3, 4 และ 5 มิลลิโมลาร์
- ดีออกซีนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด เข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครโมลาร์
- ไพรเมอร์ เข้มข้น 0.1, 0.5, 0.3, 0.4 และ 0.6 ไมโครโมลาร์
- Taq Polymerase เข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2, และ 3 ยูนิตต่อปฏิกิริยา
- อุณหภูมิในขั้นตอน annealing มี 3 ระดับ คือ 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส

Central Library
Prince of Songkla University

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ปริมาณ 11 ไมโครลิตร ผสมกับสีหยอดลงบนช่องของแผ่นอะกาโรสเจล (Nusieve 3:1 agarose, FMC Bioproduct, U.S.A.)ความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์ หนาประมาณ 4-5 มิลลิเมตร) ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TBE buffer ปล่อยให้แถบสีเคลื่อนที่จนสุดแผ่นอะกาโรสเจลใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำแผ่นอะกาโรสเจลมาย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออก นำแผ่นอะกาโรสเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบและคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละแถบดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานของ DNA Ladder 100 คู่เบสใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ (OPT-07)

ผลและวิจารณ์

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารต่างๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการทำพีซีอาร์ ทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07 และให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร พบว่า

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ จากการศึกษาความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่ 20-80 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา ให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจนที่สุด (รูปที่ 1) ดังนั้นในการทำพีซีอาร์จึงเลือกใช้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยาความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์มีความสำคัญต่อการให้ผลผลิต PCR มาก เนื่องจากดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากหรือน้อยเกินไป มีผลต่อการจางหรือขาดหายไปของรูปแบบ RAPD โดยทั่วไปความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 5-500 นาโนกรัม (Weising *et al.*, 1995) จากการทดลองศึกษาความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่ 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 และ 200 นาโนกรัม พบว่าดีเอ็นเอความเข้มข้น 20-80 นาโนกรัม ให้ผลผลิต PCR ได้ชัดเจน ซึ่งช่วงความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในพืชหลายชนิด เช่น สาคู (Boonsermsuk *et al.*, 1996) *Brassica napus* (Dulson *et al.*, 1998) *Alstroemeria* (Anastassopoulos and Keil, 1996) และสตรอเบอร์รี่ (Degani *et al.*, 1998) จากการทดลองจะเห็นว่าที่ความเข้มข้นต่ำหรือสูงเกินไปทำให้เกิดความไม่สม่ำเสมอของรูปแบบ RAPD ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยเกินไปทำให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในระหว่างรอบที่ 1 หรือ 2 ของการทำ PCR มีประสิทธิภาพต่ำ และในทางตรงข้ามความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่มากเกินไปก็ทำให้เกิดความไม่จำเพาะเจาะจงสูง และเนื่องจากดี

เอ็นเอของพืชและสัตว์มีความซับซ้อนสูงอยู่แล้วจึงไม่จำเป็นต้องใช้ในปริมาณมาก (Caetano-Anolles *et al.*, 1992)

ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ในการทำพีซีอาร์โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ0.6 ไมโครโมลาร์ พบว่าการใช้ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ ให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจนที่สุด (รูปที่ 2) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ RAPD ครั้งนี้เป็นไพรเมอร์แบบสุ่มมีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ เปอร์เซ็นต์ G+C อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง William และคณะ (1990) รายงานว่าความยาวของไพรเมอร์ต่ำสุดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ได้ อยู่ที่ความยาว 9 นิวคลีโอไทด์ และมีเปอร์เซ็นต์ G+C อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองครั้งนี้ พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.3-0.4 ไมโครโมลาร์ โดยเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในการทำ RAPD เพื่อจำแนกพันธุ์มันฝรั่ง (Ford and Toylor, 1997) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่มากเกินไป (0.5-0.6 ไมโครโมลาร์) มีผลให้รูปแบบ RAPD ที่ได้ไม่สมบูรณ์ โอกาสเกิดความผิดพลาดเนื่องจากความไม่จำเพาะเจาะจงมีสูง (Caetano-Anolles *et al.*, 1990) และมักทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ประมาณ 200-400 คู่เบส (Weeden *et al.*, 1992) ส่วนที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่ำๆ (0.05-0.2) พบว่าทำให้แถบดีเอ็นเอบางแถบหายไป และมีแถบดีเอ็นเอบางแถบซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงเพิ่มขึ้นมา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Weeden และคณะ (1992) กล่าวคือ การใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้นต่ำๆ ทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงประมาณ 1500-3000 คู่เบส

ความเข้มข้นของดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ในการทำพีซีอาร์โดยใช้ความเข้มข้นของดีออกซีนิวคลีโอไทด์ แต่ละชนิด เท่ากับ 25, 50, 100, 150, 200 และ300 ไมโครโมลาร์ พบว่า การใช้ดีออกซีนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 150-200 ไมโครโมลาร์ ให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจนที่สุด ดังนั้นในการทำพีซีอาร์จึงเลือกใช้ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ที่ความเข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 3) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของดีออกซีนิวคลีโอไทด์แต่ละตัว คือ 100-200 ไมโครโมลาร์ จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 100 ไมโคร-โมลสาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในการทำ RAPD ของอ้อย (Huckett and Botha, 1995) จากผลการทดลองครั้งนี้จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นสูงหรือต่ำเกินไป (25-50 ไมโครโมลาร์) มีผลให้ผลผลิต PCR ที่ได้เกิดขึ้นน้อยและมีความชัดเจนลดลง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของดีออกซีไตรฟอสเฟส และบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อการเกิดรูปแบบของ RAPD อย่างมีนัยสำคัญ (Weeden *et al.*,1992)

ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ในการทำพีซีอาร์โดยใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียม คลอไรด์ เท่ากับ 1.0,2.0, 2.5, 3.0 และ4 มิลลิโมลาร์ พบว่าการใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 2.5 มิล

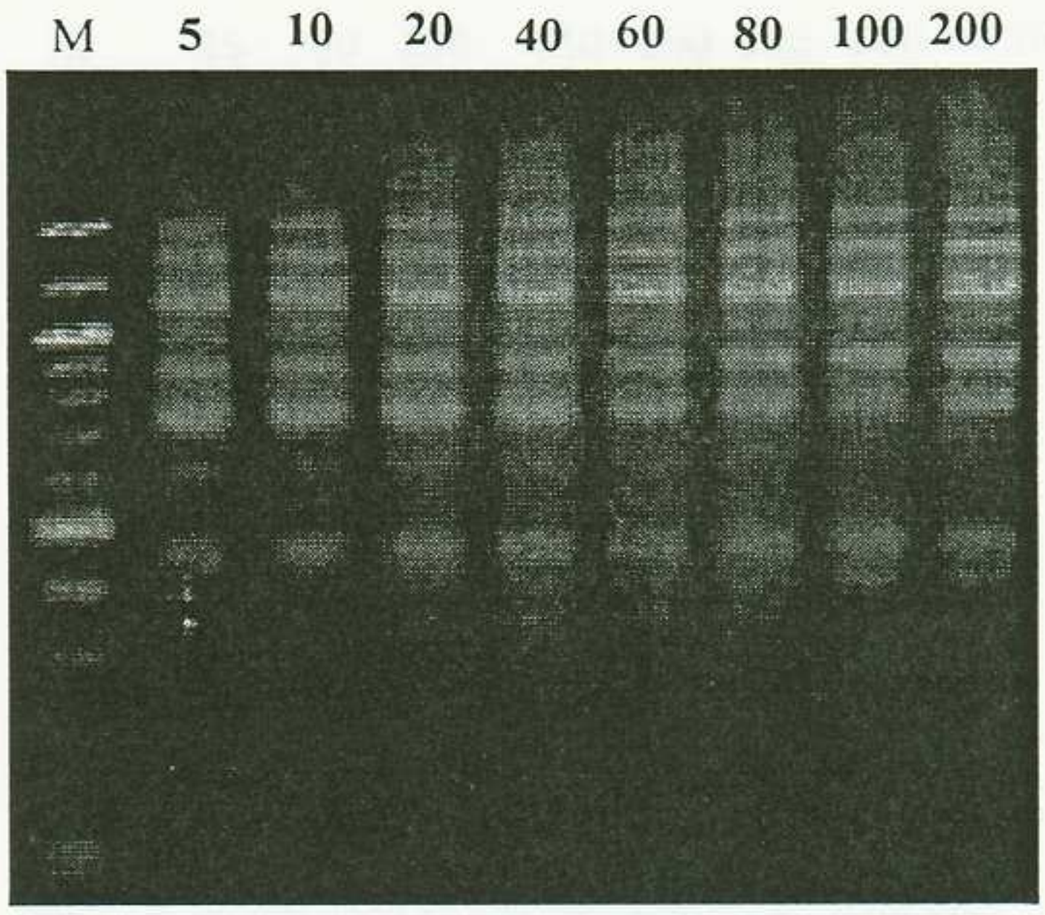
ลิโมลาร์ ให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจนที่สุด (รูปที่ 4) ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการทำ PCR ครั้งนี้อยู่ในช่วง 2.5-3.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ใน *Actinidia* (Cipriani *et al.*, 1996) และ *Brassica napus* (Dulson *et al.*, 1998) จากผลการทดลอง พบว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมสูงหรือต่ำเกินไป มีผลให้แถบดีเอ็นเอบางแถบหายไป และบางแถบมีความชัดเจนน้อยลง ซึ่งตรงกับรายงานของ Tingey และคณะ (1992) กล่าวไว้ว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลต่อการเกิดผลผลิต PCR ทั้งด้านคุณภาพ และปริมาณ กล่าวคือ ที่ความเข้ม-ข้นของแมกนีเซียมสูงหรือต่ำเกินไป มีผลให้ปริมาณและความคมชัดของผลผลิต PCR ที่ได้ลดลง แต่อย่างไรก็ตาม Henry และคณะ (1991) รายงานว่าการใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำๆ จะช่วยเพิ่มความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์

ความเข้มข้นของ Taq polymerase ในการทำพีซีอาร์โดยใช้ความเข้มข้นของเอ็นไซม์

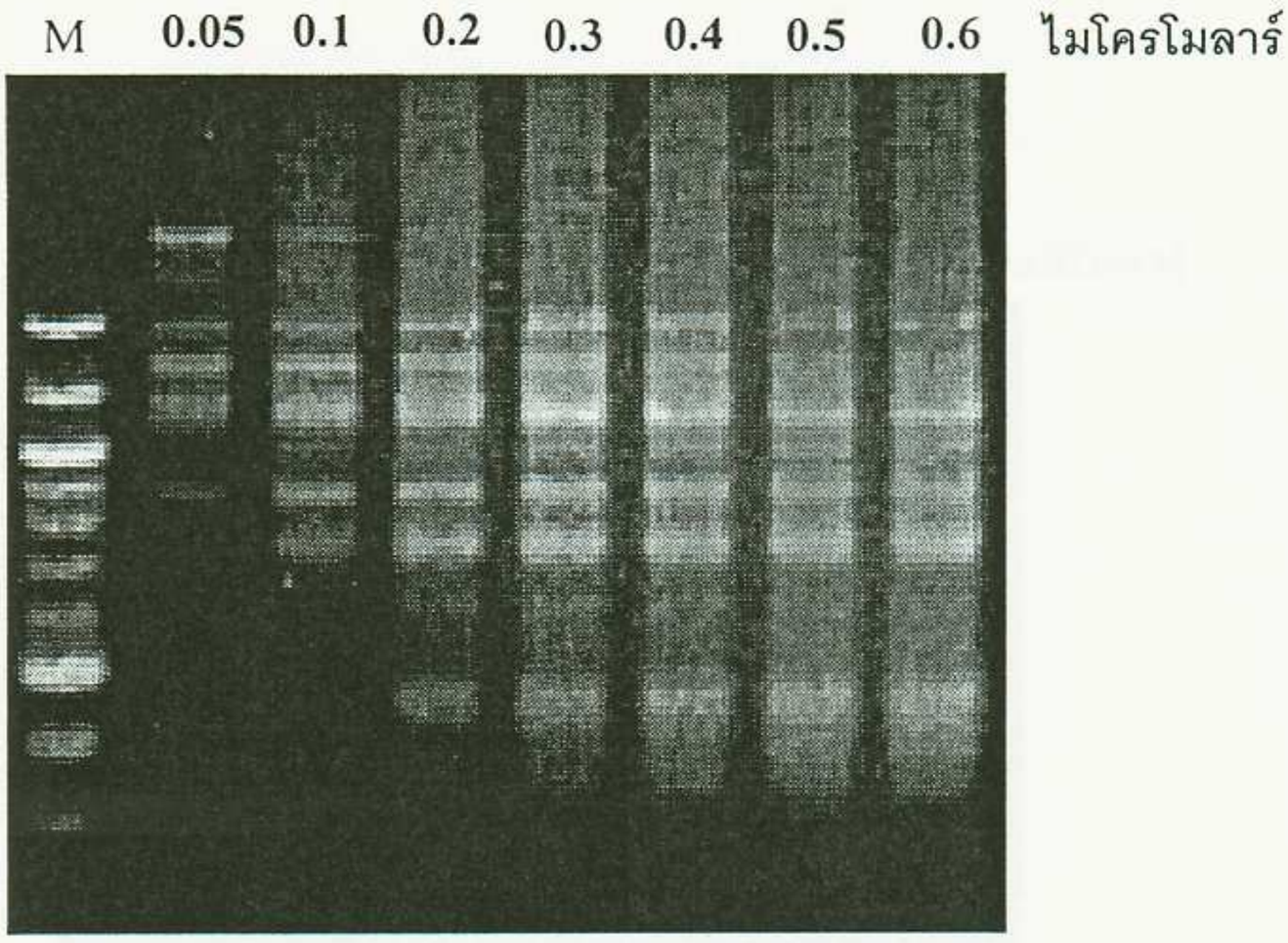
Taq polymerase เท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3 ยูนิตต่อปฏิกิริยา พบว่า การใช้ความเข้มข้นของ Taq polymerase เท่ากับ 0.3 ยูนิต ให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจนที่สุด (รูปที่ 5) ความเข้มข้นของเอ็น-ไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่เหมาะสมในการทำ PCR ครั้งนี้ คือ 15.-3.0 ยูนิต แต่เพื่อประหยัดเอ็นไซม์จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 1.5 ยูนิต การใช้เอ็นไซม์ความเข้มข้นสูง นอกจากเป็นการสิ้นเปลืองแล้วยังมีผลต่อการเกิดความไม่จำเพาะเจาะจงในการทำ PCR อีกด้วย โดย Saiki และคณะ (1988) รายงานไว้ว่าความไม่จำเพาะเจาะจงของผลผลิต PCR ที่ได้เพิ่มขึ้นตามจำนวนยูนิตของเอ็นไซม์ที่ใช้ การทดลองครั้งนี้ใช้เอ็นไซม์ Taq polymerase จากบริษัท Promeca อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ Weeden และคณะ (1992) พบว่าการใช้เอ็นไซม์จากบริษัท Perkin-Elmer, Promega หรือจากบริษัท Boehringes มีประสิทธิภาพในการให้ผลผลิต PCR ไม่แตกต่างกัน

อุณหภูมิในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ในการทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์เท่ากับ 37, 45 และ55 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจนที่สุด (รูปที่ 6)

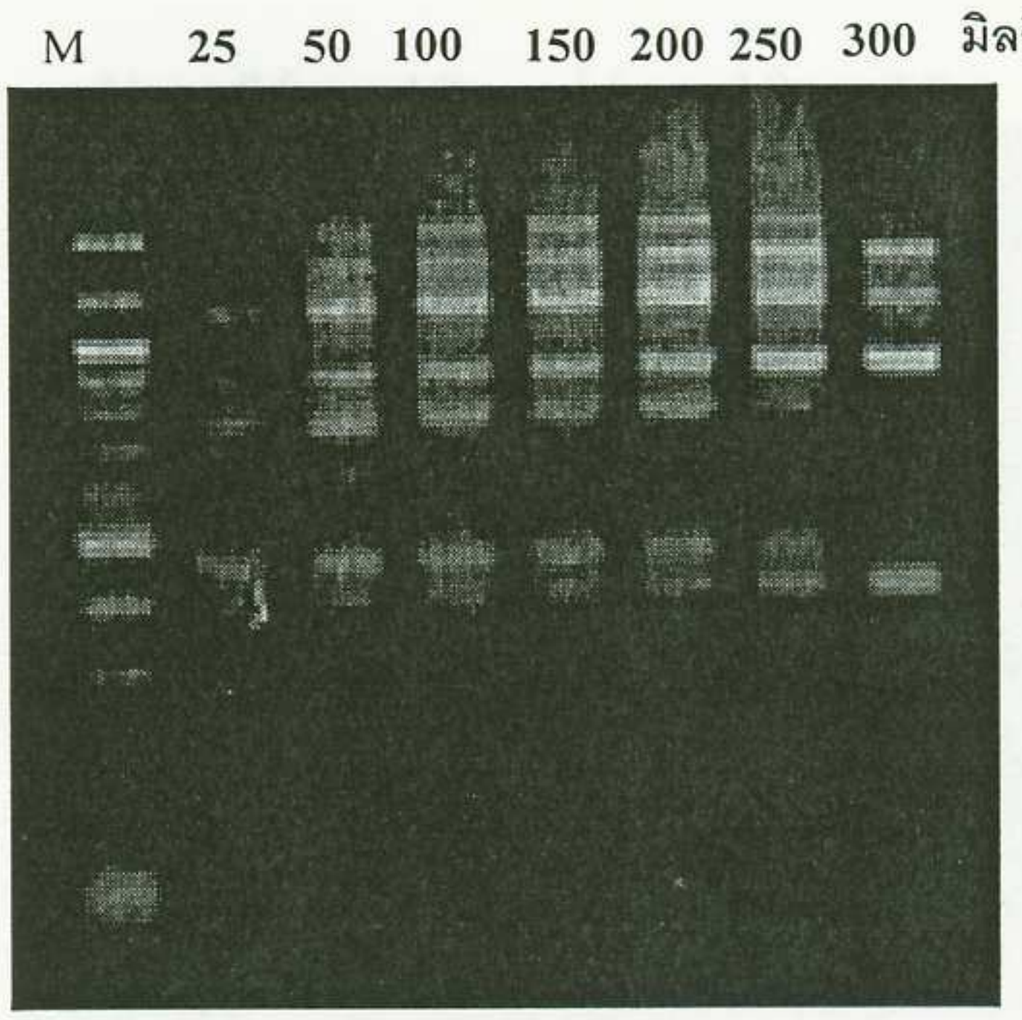
จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า การทำพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา ไพรเมอร์ เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด เข้มข้น 150 ไมโครโม-ลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ Taq polymerase เข้มข้น 0.3 ยูนิตต่อปฏิกิริยา (ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร) และอุณหภูมิในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส เป็นสภาพที่ดีที่สุดในการทำ RAPD ของพืชสกุลลางสาด



รูปที่ 1 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ต่อการเกิดผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07 M คือ DNA Ladder (100 คู่เบส)

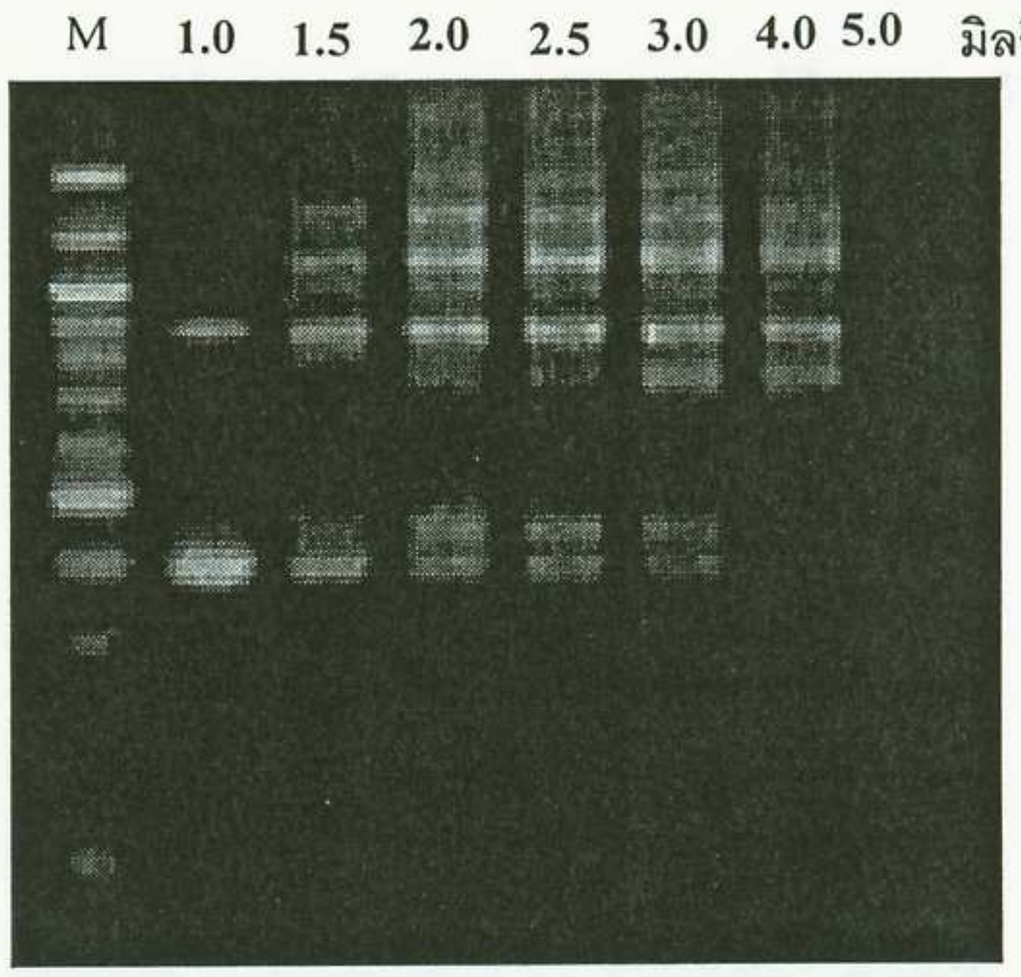


รูปที่ 2 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่อการเกิดผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07 M คือ DNA Ladder (100 คู่เบส)



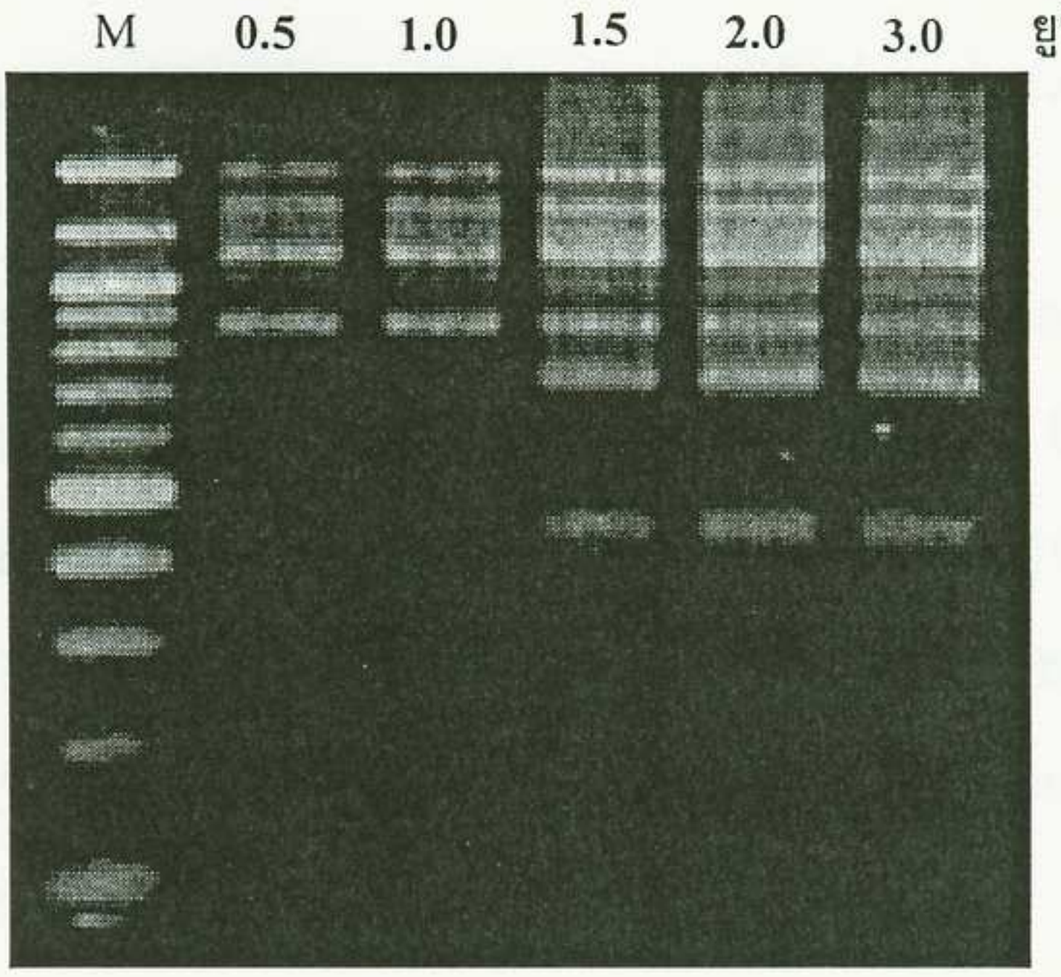
รูปที่ 3 ความเข้มข้นของดีออกซีนิวคลีโอไทด์ต่อการเกิดผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07

M คือ DNA Ladder (100 คู่เบส)

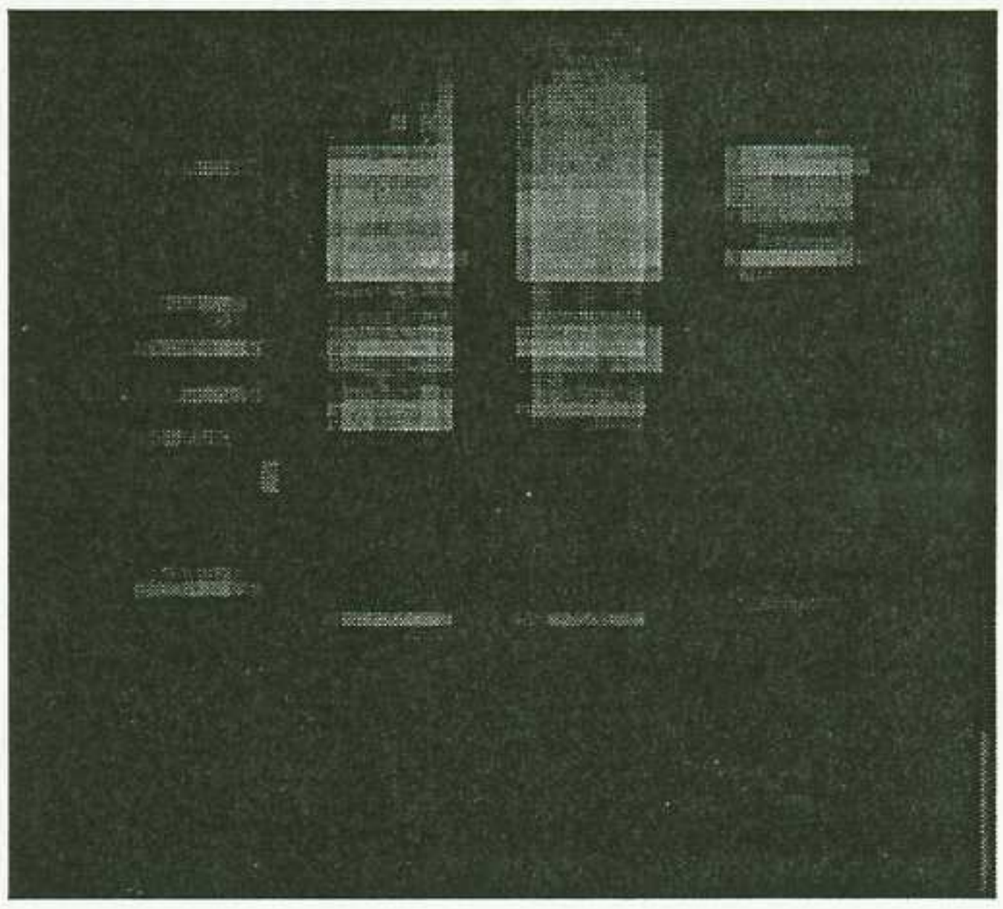


รูปที่ 4 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อการเกิดผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07

M คือ DNA Ladder (100 คู่เบส)



รูปที่ 5 ความเข้มข้นของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสต่อการเกิดผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07 M คือ DNA Ladder (100 คู่เบส)



รูปที่ 6 ผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับส่วนของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ต่อการเกิดผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07 M คือ DNA Ladder (100 คู่เบส)

เอกสารอ้างอิง

Anastassopoulos, E. and Keil, M. 1996. Assessment of natural and induced genetic variation in *Alstroemeria* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker. Euphytica. 90; 235-244.

Barrett, C., Lefort, F. and Douglass, G.C. 1997. Genetic characterization of oak seedlings, epicormc, crow and micropropagated shoots from mature tree by RAPD and microsatellite PCR. Scientia Horticulturae 70: 319-330.

Boonsermsuk, S., Anai, T., Hasegawa, K. and Hisajima, S. 1996. Establishment of experimental condition on Random Amplified Polymorphic DNA analysis of sago palm. Sago Communication 7: 66-74.

Caetano-Anoolles,G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1992. DNA amplification fingerprint with very short primers. *In* Proceedings of application of RAPD technology for plant breeding. 1 November 1992, Minneapolis. pp 18-23.

Cipriani, G., Bella, R.D. and Testolin, R. 1996. Screening RAPD primer for molecular taxonomy and cultivar fingerprinting in the genus *Actinidia*. Euphytica. 90: 169-174.

Degani, C., Rawland, L.J., Levi, A. Hortynski, J.A. and Galletta , G.J. 1998. DNA fingerprint of strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 102: 247-253.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L.1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Dulson, K., Kott, L., and Lipley, V. 1998. Efficacy of bulked DNA samples for RAPD DNA fingerprinting of genetically complex *Brassica napus* cultivars. Euphytica 102:65-70.

Fajardo, D., Angel, F., Grem, M., Tohme, J., Lobo, M., Roca, W.M. and Sanchez, I. 1998. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. Euphytica 101: 341-347.

Ford, R. and Taylor, P.W.J. 1997. The application of RAPD markers forpotato cultivar identification. Aust.J.Agric.Res. 48:1213-1217.

Gill, K.S. and Gill, B.S. 1996. A PCR-based screening assay of *Ph1*, the chromosome pairing regulator gene of wheat. Crop Sci. 36: 729-722.

Gunter, L.E., Tuskan, G.A. and Wullschleger, S.D. 1996. Diversity among population of swithgrass based on RAPD marker. Crop Sci. 36: 1017-1022.

Harvey, M. and Botha, T.C. 1996. Base of PCR methodologies for the determination of DNA diversity between Saccharum varietes. Euphytica 89: 257-265.

Huckett,B.I. and Botha, F.C. 1995. Stability and potential use of RAPD markers in sugarcane genealogy.Euphytica 86:117-125.

Jiang, C. and Sink, K. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expressionlocu M in asparagus. Euphytica 94:329-333.

Mackill, D.J. 1995. Classifying japonica rice cultivar with RAPD markers. Crop Science 35; 887-894.

Mudge, J., Andersen, W.R., Kehrer, R.L. and Fairbanks, D.J. 1996. A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*. Crop Sci. 36: 1362-1366.

Obara-Okeyo, P. and Kako, S. 1998. Genetic diversity and identification of cymbidium Cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker.Euphytica 99: 95-101.

Rogers, S.O. and Bendich, A.J. 1988. Extract of DNA from plant tissue. Plant Molecular Biology Manual A6: 1-10.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Schare, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

Thormson, D and Henry, R. 1993. Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis. Plant Molecular Biology Report. 11: 202-206.

Tingey, S.V., Rafalski, A. and Williams, J.G.K.1992. Genetic analysis with RAPD markers. *In* application of RAPD technology to plant breeding. 1 November 1992. Minneapolis. pp 3-9.

Weeden , N.F., Timmerman, G.M., Kneen, B.E. and Lodhi, M.A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers.*In* application of RAPD technology to plant breeding. 1 November 1992. Minneapolis. pp 12-17.

Weising,K., Nybom, H. Wolff, K. and Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plant and fungi. CRC Press. Florida .

Wolff, K. 1996. RAPD analysis of sporting and chimerism in chrysanthemum. Euphytica 89: 159-164.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livar, J.A., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

ORIGINAL ARTICLE

Establishment of experimental conditions on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lansium domesticum* Corr. II. primer screening and identification of longkong, langsat and duku

Suvimon Konlasuk[1], Charassri Nualsri[2] and Sompong Te-chato[3]

Abstract

Konlasuk, S., Nualsri, C. and Te-chato, S.

Establishment of experimental conditions on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lansium domesticum* Corr. II. primer screening and identification of longkong, langsat and duku

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2001, 23(3) : 325-334

RAPD patterns of *Lansium domesticum* Corr. were analyzed. Total genomic DNA was extracted from 12 plants each of longkong, langsat and duku from the department of Plant Science, Prince of Songkla University, Songkhla, Pattani and Narathiwat provinces. One of each was sampled for primer screening. Of 100 decamer oligonucleotide primers screened, 47 primers generated polymorphic DNA fragments but only 10 primers (OPA-01, OPB-04, OPB-07, OPC-04, OPC-05, OPC0-08, OPD-01, OPD-03, OPT-01 and OPT-08)

---

[1]M.S. (Plant Science), [2]Ph.D. (Agronomy), Asst. Prof., [3]Ph.D. (Plant Cell Technology), Assoc. Prof., Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

Corresponding e-mail : ncharass@ratree.psu.ac.th

Received, 29 March 2000 Accepted, 31 May 2001

showed clear and intense polymorphic bands between longkong, langsat and duku. These 10 primers were then used to identify and detect genetic variation in these 36 plants. No variation in RAPD pattern was observed in the longkong population, indicated its genetic uniformity. There were some differences in RAPD patterns within both the langsat and duku populations indicating their genetic variability. Based on the DNA fingerprint obtained from this study, longkong could clearly be distinguished from langsat and duku.

Key words : *Lansium domesticum*, RAPD, primer, genetic variation

บทคัดย่อ

สุวิมล กลศึก จรัสศรี นวลศรี และ สมปอง เตชะโต

การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA) ในพืชสกุลลางสาด II. การคัดเลือกไพรเมอร์และการแยกความแตกต่างระหว่างของลองกอง ลางสาด และดูกู

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2544 23(3) : 325-334

ศึกษาการแยกความแตกต่างระหว่างพืชสกุลลางสาด โดยการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี โดยสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบของต้นลองกอง ลางสาด และดูกู ชนิดละ 12 ต้น ซึ่งสุ่มจากสวนเกษตรกร จังหวัดปัตตานี นราธิวาส และแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ในเบื้องต้นทำการคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างพืชทั้งสามชนิด จากไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 100 ชนิดที่ทำการศึกษาพบว่า มีไพรเมอร์ 47 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน และในจำนวนนี้เลือกใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิดซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู ได้อย่างชัดเจน คือ OPA-01, OPB-04, OPB-07, OPC-04, OPC05, OPC-08, OPD-01, OPD-03, OPT-01 และ OPT-08 จากตัวอย่างต้นที่สุ่มมาชนิดละ 12 ต้น พบว่าลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกต้น ไม่ว่าจะทดสอบกับไพรเมอร์ใดก็ตาม แสดงว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรลองกอง ในขณะที่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในกลุ่มประชากรลางสาดและดูกู แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรทั้งสอง นอกจากนี้ยังพบว่า แถบดีเอ็นเอของลองกองทั้งหมดมีความจำเพาะกับลองกอง และแตกต่างจากแถบดีเอ็นเอของลางสาดและดูกู ซึ่งสามารถใช้แยกลองกองออกจากพืชอีกสองชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

The best known edible fruit species in Meliaceae is *Lansium domesticum* Corr. There are three major varieties of *L. domesticum* in Thailand: longkong, langsat and duku. Currently longkong is the most important variety because of its good quality and market demand. Smittinand (1980) identified both longkong and duku as *Aglaia dookoo* Griff., and langsat as *A. domestica* Pelleg. Based on morphological characters duku closely resembles longkong but produces numerous seeds while none or only a few seeds are produced by longkong. In addition, the fruit quality of duku is not acceptable by consumers. Thus duku is used mainly as root stock for longkong. Differentiation among these varieties is often difficult within the population due to lack of genetic markers. Identification based on morphological traits is generally unreliable, particularly at the seedling stage. This affects longkong production and causes economic loss since it takes 7 years until fruit-bearing when the plant can be assigned to one of these varieties. Identification among plants in this group needs to be studied. Autchanakul (1990) tried to distinguish longkong, langsat and

duku seedlings using some morphological characters such as leaf width/length ratio and leaf shape but this process has proven unsuccessful. A few isozymatic genetic markers also have been characterized for *L. domesticum*. (Te-chato *et al.*,1995).

Williams *et al.* (1990) and Welsh and McClellan (1990) described a technique called RAPD based on the amplification of random DNA segments with short primers of arbitrary nucleotide sequences which could be used to detect polymorphisms between amplification-production of individuals. RAPD analysis offers several adventages such as 1) only small amounts of DNA are required 2) no prior DNA sequences are needed 3) no radioactive involvement and 4) experimental simplicity and not too expensive (Rafalski, 1998). The technique has been used as a tool to generate molecular markers for several fruit crops such as cashew (*Anacadium occidentale* L.) (Silva Neto *et al.*, 1995), papaya (*Carica papaya* L.) (Sondur *et al.*, 1996; Somsri *et al.*, 1998), apple (Malus *x* domestica L.) (Koller *et al.*, 1993; Gardiner *et al.*, 1996) , kiwi fruit (*Actinidia* sp.) (Harvey *et al.*, 1998) and grape (*Vitis* sp.) (Collin and Symous, 1993: Jeanjaques *et al.*, 1993 ; Qu and Lamikanra, 1996).

The aims of the present study are 1) to screen for arbitrary primers that have common polymorphisms among plants of *L. domesticum* and 2) to identify polymorphic RAPD markers that would be useful to distinguish longkong , langsat and duku.

Materials and Methods

Primer screening

Leaf samples of longkong, langsat and duku were collected from field-grown plants at the Plant Science Department, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla. Genomic DNA from leaf tissues was prepared using modified CTAB buffer (Doyle and Doyle, 1990) as described by Nualsri and Konlasuk (2000). From approximately 200 mg of leaf sample, DNA was extracted in 1 mL CTAB buffer (1% PVP-40, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM 1 M Tris-HCl (pH. 8.0) and 2% CTAB). 2% mercaptoethanol was added to this buffer prior to extraction. Ground tissue and buffer were mixed well and incubated at 60°C for 60 min. The homogenate was then extracted with 800 µL chloroform and microcentrifuged at 12,000 rpm for 5 min. DNA was precipitated from the aqueous phase by mixing with 750 µL isopropanol and pelleted by centrifuge at 12,000 rpm for 10 min. The DNA pellet was rinsed with 70% ethanol, dried and resuspended in 100 µL TE buffer containing 1 M Tris-HCl pH 7.5 and 0.25 M EDTA pH 7.0 then stored at -20°C until use. DNA concentration was examined on agarose gel by running 2 µL of DNA sample on 0.7% Seakem agarose (FMC products, Rockland, U.S.A.) using TAE buffer with known amounts of Lambda DNA (Promega, Madison, U.S.A.) as the standard.

One hundred 10-base oligonucleotide primers (Operon Technologies, Alameda, CA) were examined for PCR amplification of *L. domesticum* under the following RAPD-PCR conditions:-

The RAPD protocol was performed in a reaction volume of 25 µL containing 2 µL of 10 X buffer, 2.5 µL of 25 mM $MgCl_2$, 100 µM of each dNTP, 1.5 µM of primer, 0.3 µL (1.5 units) of Taq DNA polymerase and 40 ng of template DNA. The thermal profile for RAPD- PCR was started from 39 cycles of 94°C for 1 min, 37°C for 1 min, 72°C for 2 min., followed by 1 cycle of 94°C for 1 min, 37°C for 1 min and finally 72°C for 10 min. PCR was performed in a PCR machine (PCR Sprint Hybaid, UK).

Electrophoresis

PCR products were then visualized by running 11 µL samples on 1.25% LE agarose (Promega, Madison, U.S.A.) using TBE buffer and stained with ethidium bromide and the molecular weight of each band compared with the standard 100 and 500 bp Ladder DNA : (Promega, Madison, U.S.A.).

Identification of *L. domesticum* by RAPD markers with chosen primers

Leaf samples were collected from 12 field-grown plants of longkong, langsat and duku,

Songklanakarin J. Sci. Technol
Vol. 23 No. 3 Jul.-Sep. 2001

Table 1. Sources of samples used in this experiment

Variety	Sources of samples
Longkong	
Plant no. 1, 2, 3, 4	Department of Plant Science, PSU. Songkhla
Plant no. 5, 6, 7, 8	Pattani
Plant no. 9, 10, 11, 12	Narathiwat
Langsat	
Plant no. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	Plant Science Department, PSU. Songkhla
Plant no. 8, 9, 10, 11	Pattani
Plant no. 12	Narathiwat
Duku	
Plant no. 1, 2, 3, 4	Plant Science Department, PSU. Songkhla
Plant no. 5, 6, 7, 8	Pattani
Plant no. 9, 10, 11, 12	Narathiwat.

selected from the Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, and from longkong orchards in Pattani and Narathiwat province (Table 1). DNA was extracted and RAPD-PCR was performed with selected primers using the protocol previously described.

Data analysis

The ten best primers having common clear polymorphisms among longkong, langsat and duku were chosen from 100 primers tested and used as RAPD markers. All markers were scored by the presence and absence of specific amplification products for each primer.

Results and Discussion

Primer screening

One hundred 10-base oligonucleotide primers were tested to determine which could produce scorable RAPD markers with template DNA from each of longkong, langsat and duku. This initial screening was essential to select markers yielding distinctive DNA patterns for each group. Of the 100 primers screened, 89 primers revealed amplified products while 11 primers did not amplify detectable products. Among the 89 primers, 17 amplified ambiguous RAPD fragments, while 25 primers showed clear patterns of amplification but did not exhibit polymorphisms among all the genotypes. Of 47 promising primers, only 10 revealed intense band patterns (Figure 1). Following this initial screening, those 10 primers (Table 2) were chosen for RAPD-PCR to identify and detect genetic variation among plants belonging to *L. domesticum*.

A total of approximately 146 bands were generated by these 10 primers. The number of

Table 2. The 10 primers and their sequences that produced polymorphic bands between longkong, langsat and duku.

Primer	Base sequences 5'----------3"	Number of DNA bands	Polymorphic bands
OPA-10	CAGGCCCTTC	14	5
OPB-04	GGACTGGAGT	13	5
OPB-07	GGTGACGCAG	16	12
OPC-04	CCGCATCTAC	19	15
OPC-05	GATGACCGCC	12	3
OPC-08	TGGACCGGTG	14	8
OPD-01	ACCGGGAAGG	14	8
OPD-03	GTCGCCGTGA	14	9
OPT-01	GGGCCACTCA	12	3
OPT-08	AACGGCGACA	18	6
	Mean ± SD	14.6±2.38	7.4±3.86

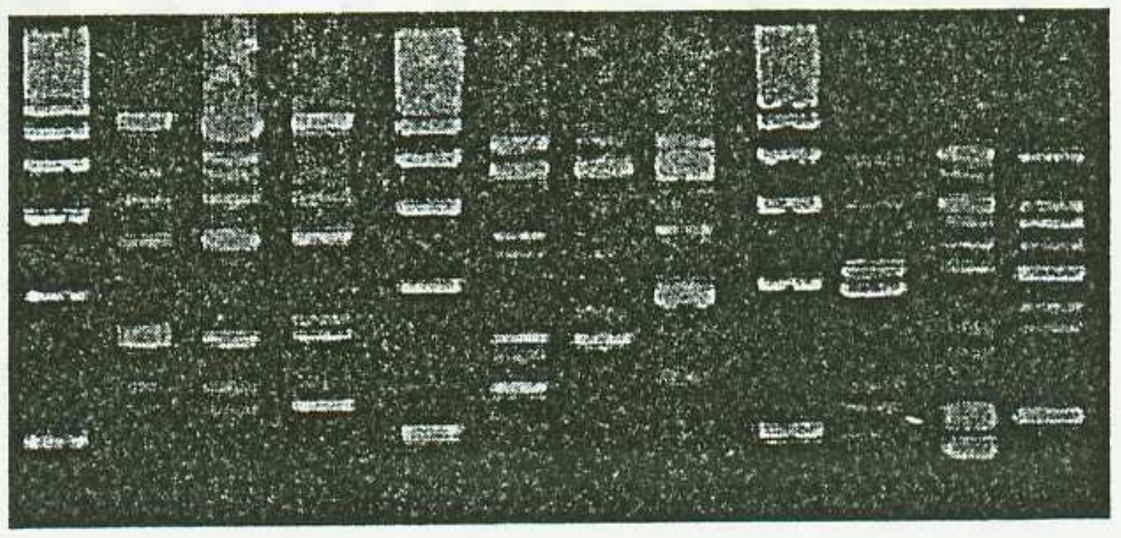


Figure 1. RAPD patterns of longkong,(L), langsat (S) and duku (D) produced by 10 primers. M1 and M2 are 100 and 500 bp Ladder DNA.

bands for each primer varied from 12 to 19 with an average of 14.6±2.38 bands per primer. Primer OPC-04 generated the highest number of fragments among all primers used. The size of the amplified fragments ranged from approximately 255 bp to 2800 bp. The number of polymorphic bands between longkong, langsat and duku are summarized in Table 2. The experiments were repeated twice to confirm the results and to ensure that all primers produced reproducible bands. Most longkong trees produced completely identical DNA patterns from the 10 primers used, indicating genetic uniformity (Figures 2, 3, 4). The results indicated that morphological differences occuring

Songklanakarin J. Sci. Technol
Vol. 23 No. 3 Jul.-Sep. 2001

Figure 2. RAPD patterns of longkong (A), langsat (B) and duku (C) obtained from primer OPA-10. M1 and M2 are 500 and 100 bp DNA Ladder, respectively.

within longkong populations could be due to the influence of environmental factors. In addition, all RAPD patterns of longkong from each primer exhibited unique RAPD genotypes that can be

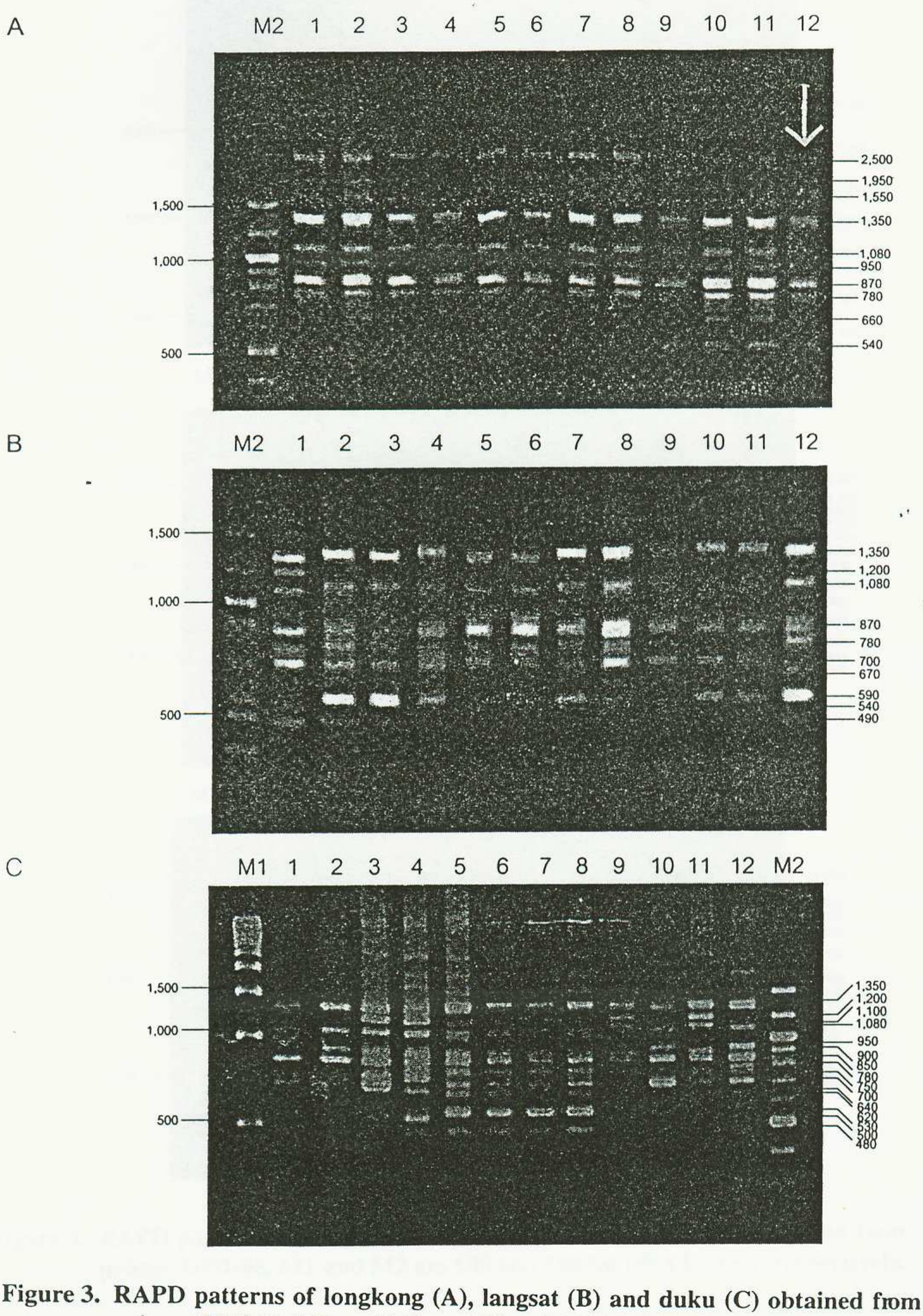


Figure 3. RAPD patterns of longkong (A), langsat (B) and duku (C) obtained from primer OPC-04. M1 and M2 are 500 and 100 bp DNA Ladder, respectively.

used to discriminate longkong from the others. With primer OPC-04, the band close to 2500 bp (Figure 3 A, indicated by arrow) was observed only in longkong plants. This suggested that the

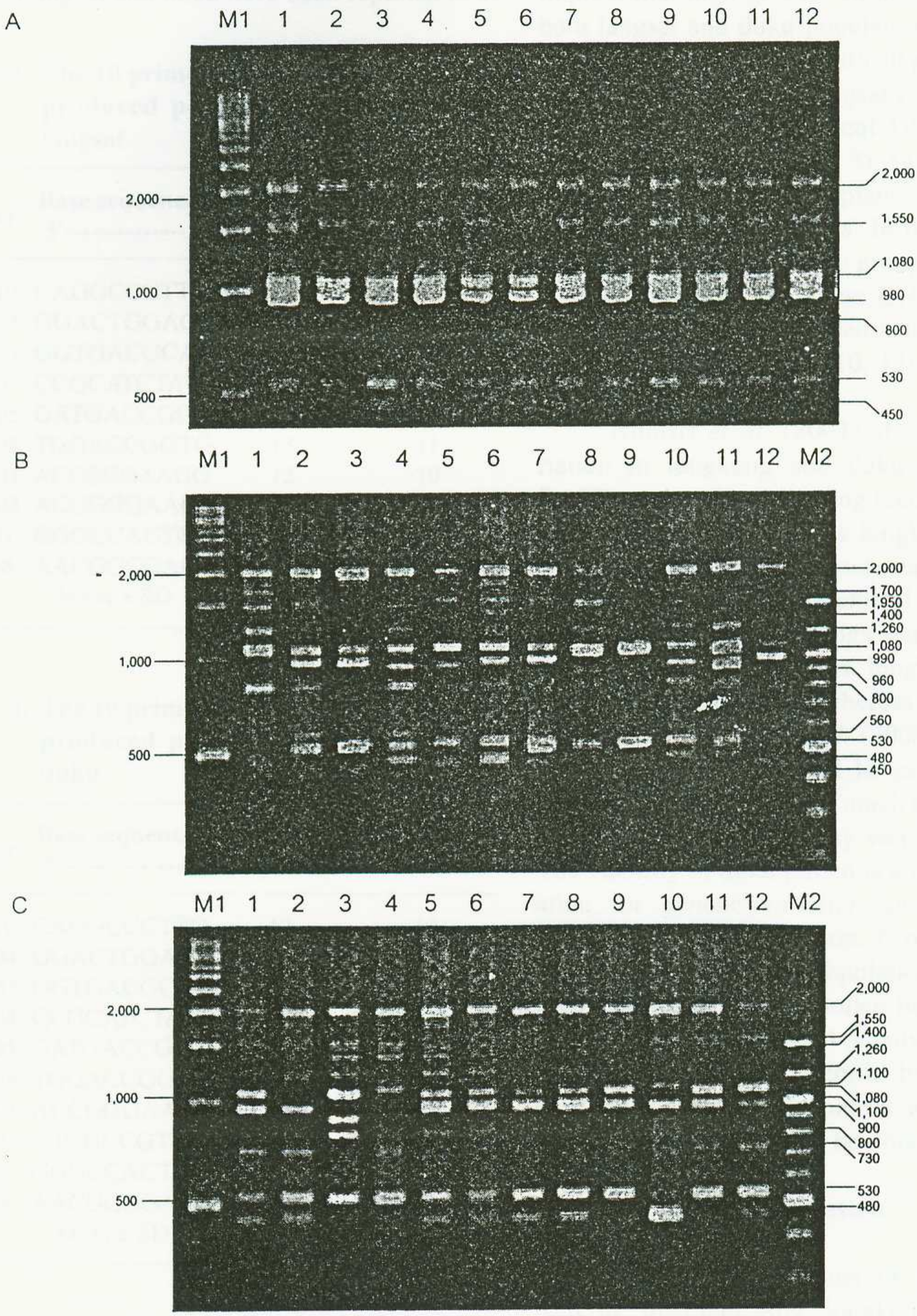


Figure 4. RAPD patterns of longkong (A), langsat (B) and duku (C) obtained from primer OPC-08. M1 and M2 are 500 and 100 bp DNA Ladder, respectively.

$OPC\text{-}04_{2500}$ could be a longkong-specific marker. There were several differences in the RAPD patterns within both langsat and duku populations. The number of polymorphic bands among langsat

and duku are shown in Tables 3 and 4, respectively. Langsat and duku have been reported to be

Table 3. The 10 primers and their sequences that produced polymorphic bands among langsat

Primer	Base sequences 5'----------3"	Number of DNA bands	Polymorphic bands
OPA-10	CAGGCCCTTC	13	11
OPB-04	GGACTGGAGT	11	7
OPB-07	GGTGACGCAG	13	11
OPC-04	CCGCATCTAC	10	7
OPC-05	GATGACCGCC	12	7
OPC-08	TGGACCGGTG	13	11
OPD-01	ACCGGGAAGG	12	10
OPD-03	ACCGGGAAGG	12	10
OPT-01	GGGCCACTCA	10	8
OPT-08	AACGGCGACA	15	12
	Mean ± SD	121±1.52	9.4±1.96

Table 4. The 10 primers and their sequences that produced polymorphic bands among duku

Primer	Base sequences 5'----------3"	Number of DNA bands	Polymorphic bands
OPA-10	CAGGCCCTTC	12	10
OPB-04	GGACTGGAGT	12	8
OPB-07	GGTGACGCAG	13	11
OPC-04	CCGCATCTAC	15	11
OPC-05	GATGACCGCC	11	6
OPC-08	TGGACCGGTG	12	11
OPD-01	ACCGGGAAGG	12	11
OPD-03	GTCGCCGTGA	10	5
OPT-01	GGGCCACTCA	11	8
OPT-08	AACGGCGACA	18	10
	Mean ± SD	12.6±2.32	9.1±2.23

apomictic plants (Bernardo *et al.*, 1961), which referred to the seed development without fertilization resulting in identical genetic backgrounds to the maternal parent. Therefore, low genetic variation in both populations should be expected. In contrast, the results obtained from our experiments implied that high genetic variation occurs within both langsat and duku populations. Based on the RAPD patterns obtained with all primers from this study, the 12 plants of langsat could be assigned into 8 groups. An identical DNA pattern was observed in plants no. (2, 3), (4, 10, 11) and (8, 9). Five of the remaining (plants no. 1, 5, 6, 7, 12) exhibited different patterns. In the duku population, 8 genotypes were also grouped. Plants no. 5, 6, 7, 8 revealed the same DNA pattern while plants no. 9 and 11 were identical and the remaining (plants no. 1, 2, 3, 4, 10, 12) revealed individual-specific fingerprints.

Nualsri *et al.* (2001) studied genetic variation in longkong and duku seedlings using RAPD markers by collecting seeds from the same maternal plants. Within the longkong population, the comparison between maternal genotypes and their offsprings yielded identical DNA fragments while 49% of duku seedlings were different from their maternal parent. Thus, longkong appears to be an obligate apomixis whereas duku is a facultative apomixis. Lim *et al.* (2000) reported high sterility of longkong and langsat pollen while indigenous duku produced much more pollen with 4% germination when they were tested *in vitro*. The viability of duku pollen is a possible explaination for genetic variation among individuals within the duku population. Crossing or selfing may occur among duku populations. Even though high sterility of langsat pollen has been reported (Lim *et al.*, 2000), several genotypes observed in the langsat population could be the results of crossing ability between langsat and duku. Further study on this issue should be done.

Conclusion

Clear polymorphisms of RAPD banding patterns distinguishing longkong, langsat and duku were obtained from 10 primers (OPA-10, OPB-04, OPB-07, OPC-04, OPC-05, OPC-08, OPD-01, OPD-03, OPT-01 and OPT-08). All longkong plants sampled from different locations exhibited identical DNA fragment profiles. Some

langsat and duku plants exhibited genetic differences within their populations. RAPD fingerprints produced from all 10 primers allowed us to distinguish longkong from duku and langsat.

Acknowledgments

The authors are grateful to Prince of Songkla University for financial support. Sincere appreciation is also given to Asst. Prof. Dr. Apinan Kamnulrat and Mr. Waedae for planting materials used in this study.

References

Autchanakul, P. 1990. Comparative Study on Morphology of Longkong (*Aglaia dookoo* Griff.). Duku (*Aglaia dookoo*) and Langsat (*Aglaia domesticum* Pelleg.). M.S. Thesis. Department of Plant Science, Prince of Songkla University, Songkhla.

Bernardo, F.A, Jessena, C.C. and Ramarez, D.A. 1961. Parthenocarpy and apomixis in *Lansium domesticum* Correa. The Philippine Agriculturist 44:415-421.

Collins, G.G. and Symous, R.H. 1993. Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD-PCR techniques. Plant Mol. Biol. Reporter 11:105-112.

Doyle, J.J and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Gardiner, S.E., Basset, H.C.M., Madie, C. and Noiton, D.A.M. 1996. Isozyme, random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers need to deduce a putative parent for the "Braeburn" apple. J. Amer. Soc. Hort.Sci. 121: 996-1001.

Harvey, C.F., Fraser, L.G., Gill, G.P., Fung, RW.M., Yoon, M. and Weising, K. 1998. Applications of biotechnology to kiwifruit (Actinidia) in New Zealand. Acta Hort. 461:193-198.

Jeanjaques, I., Defontaine, A. and Hallet, J.N. 1993. Characterization of *Vitis vinifera* cultivar by random amplified polymorphic DNA markers. Vitis 32:189-190.

Koller, B., Lehman, A., McDermott, J.M. and Gessler, C. 1993. Identification of apple cultivar using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 85:901-904.

Lim, M., Nualsri, C. and Namsri, U. 2000. The viability of pollen of longkong, langsat (*Aglaia domesticum* Pelleg.) and duku (*Aglaia dookoo* Griff.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 22:35-41.

Nualsri, C. and Konlasuk, S. 2000. Establishment of experimental conditions on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lansium domesticum* Corr. I. DNA extraction from leaf sample. Songklanakarin J. Sci. Technol. 22: 403-410.

Nualsri, C., Te-chato, S., Lim, M. and Chooruk, U. 2001. A survey of genetic viability of longkong (*Lansium domsticum* Corr.) seedlings by RAPD (Random Ampified Polymorphic DNA) technique. Proceedings of The 39th Kasetsart University Annual Conference. 5-7 Febuary 2001. Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok. (In press)

Qu, X. J.W. and Lamikanra, O. 1996. Genetic diversity in muscadine and American bunch grapes based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121: 1020-1023.

Rafaski, J.A. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **In** DNA Markers: Protocol, Applications and Overviews. pp.75-84. (eds. G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff). New York : Wiley-VCH.

Silva Neto, S.P., Mauta, I., Takaiwa, F., Ono, K. and Matsumato, K. 1995. Identification of cashew (*Anacaium occidentale* L.) seedlings with RAPD markers. Acta Hort. 370: 21-26

Smittinand, T. 1980. Thai Plant Names (Botanical names-vernacular names). Bangkok: Funny Publishing Limited.

Somsri, S., Fletcher, R.J., Jobin, M., Drew, R., Lawson, W. and Graham, M.W. 1998. Developing molecular markers for sex prediction in papaya (*Carica papaya* L.) Acta Hort. 461:141-147.

Sondur, S.N., Manshardt, R.M. and Stiles, J.I. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA marker. Theor. Appl. Genet. 93:547-553.

Te-chato, S., Aengyong, W. and Lim, M. 1995. Identification of *Lansium domesticum* Correa by isozyme technique. Songklanakarin J. Sci.Technol. 17:355-361.

Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.

Williams, J.G.K., 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. Nucleic Acids Res. 18: 6231-6235.

ความมีชีวิต ลักษณะสัณฐานของละอองเกสรดูกูและการศึกษาความเป็นไปได้ในการผสมข้าม ระหว่างดูกู ลองกอง และลางสาด

Viability and Morphology of Duku Pollen and Crossing Ability between Duku , Longkong and Langsat

บทคัดย่อ

ทำการตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเกสรดูกูโดยการย้อมสีอะซีโตคาร์มีน 2 เปอร์เซนต์และการทดสอบความงอกในห้องปฏิบัติการก่อนที่จะใช้ในการผสมเกสร นอกจากนี้ยังทำการศึกษาขนาดและรูปร่างของละอองเกสร รวมถึงการพัฒนาของไมโครสปอร์ด้วย พบว่าละอองเกสรดูกูจาก 4 ต้นที่สุ่มมาศึกษาสามารถย้อมติดสี อะซีโตคาร์มีนในเปอร์เซนต์ที่ค่อนข้างสูง (50-97%) ในขณะที่ความงอกของละอองเกสรในอาหารวุ้นอยู่ระหว่าง 0- 4 % เท่านั้น บางต้นมีละอองเกสรที่ผิดปกติ เนื่องจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสของเซลล์แม่ไมโครสปอร์ผิดปกติ และเมื่อทำการทดสอบการผสมข้ามพบว่าละอองเกสรดูกูไม่สามารถงอกได้ในส่วนของตัวเมียของทั้งลองกองและลางสาด

Abstract

Viability of duku pollen was determined by stainnig with 2% acetocarmine and in vitro germination before crossing. Pollen morphology and pollen size including differentiation of microspore were also studied. High percentage of stained pollen was observed (50-97%), while pollen germination in vitro varied from 0- 4%. Some plants produced abnormal pollen based on irregular meiosis of pollen mother cells. Crossing between duku and longkong or langsat was not success since duku pollen could not germinate in the styles of both longkong and langsat.

คำหลัก ลองกอง ลางสาด ดูกู การผสมข้าม ความมีชีวิตของละอองเกสร ไมโครสปอร์

บทนำ

พืชสกุลลางสาดโดยเฉพาะอย่างยิ่งลองกอง จัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของภาคใต้ พื้นที่ปลูกลองกองเพิ่มขึ้นมากในระยะห้าปีที่ผ่านมา ไม่เฉพาะภาคใต้เท่านั้นที่มีการปลูกเพิ่มขึ้น ภาคตะวันออกและภาคเหนือก็มีการขยายพื้นที่ปลูกเช่นกันเพราะราคาผลผลิตค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับไม้ผลชนิดอื่น ลองกองที่มีคุณภาพดีส่วนใหญ่จะมีเมล็ดน้อยหรือไม่มีเลย แต่ระยะหลังมักพบเสมอว่าลองกองมีการติดเมล็ดเพิ่มขึ้น สาเหตุเกิดจากอะไรยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้แล้วในธรรมชาติยังพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะต่างๆ ในกลุ่มดูกูและลางสาดซึ่งยืนยันได้จากผลการศึกษาของ Konlasuk และคณะ (2001) ที่ใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD) ในการตวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลลางสาด และพบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในกลุ่มประชากรดูกู และลางสาดที่สุ่มจากแหล่งปลูกในจังหวัดสงขลา ปัตตานีและนราธิวาส สันนิษฐานว่าความแปรปรวนดังกล่าวน่าจะเกิดจากการผสมข้ามในกลุ่มประชากรของพืชทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามยังไม่มีหลักฐานยืนยันว่าพืชในกลุ่มนี้สามารถผสมข้ามกันได้หรือไม่

จากการศึกษาของจรัสศรี นวลศรี และคณะ (2543) พบว่าต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดลองกองมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อยมาก เมื่อเทียบกับต้นกล้าดูกู แสดงว่าการขยายพันธุ์ลองกองเพื่อให้ได้ตรงตามพันธุ์นอกจากการเสียบยอดแล้วยังสามารถทำได้โดยการเพาะเมล็ด ในขณะที่ดูกูนั้นการเพาะเมล็ดให้ต้นกล้าที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง แม้จะมีรายงานว่าละอองเกสรของดูกู ลางสาดและลองกองมีความเป็นหมันสูง (Bernado *et al.*,1961, ภูวดล บุตรรัตน์, 2532) แต่อุไรวรรณ นามศรี และคณะ (2543) พบว่าดูกูบางต้นผลิตละอองเกสรปกติและสามารถงอกได้เมื่อทดสอบความงอกในห้องปฏิบัติการ ละอองเกสรที่มีชีวิตดังกล่าวนี้น่าจะเป็นสาเหตุของความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น การทดสอบความงอกของละอองเกสรเหล่านี้ในสภาพจริงในธรรมชาติเพื่อพิสูจน์ว่าละอองเกสรสามารถงอกผ่านส่วนตัวเมียและสามารถเข้าไปผสมกับไข่ได้อย่างสมบูรณ์หรือไม่ หากการผสมข้ามประสบความสำเร็จจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งตอการปรับปรุงพันธุ์พืชสกุลนี้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อตรวจสอบความมีชีวิต รวมถึงลักษณะสัณฐานของละอองเกสรดูกู และความสามารถในการผสมของละอองเกสรดูกู ทั้งผสมตัวเองและการผสมข้ามกับลองกอง และลางสาด

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุพืช

ใช้ดอกจากต้นลองกอง ลางสาด และดูกู จาก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และต้นดูกูจากสวนเกษตรกร ต คลองหวะ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

2. สารเคมี

ประกอบด้วยสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสร การศึกษาลักษณะสัณฐานของละอองเกสรและการทดสอบการผสมข้ามได้แก่

- เอทธานอล (Ethanol) กรดไฮโดรคลอริค (HCl), กรดอะซิติก (Acetic acid) อะซิโตคาร์มีน (Acetocarmine) อะนิลีนบลู (Aneline blue) น้ำตาลซูโครส ผงวุ้น เป็นต้น

3. อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ SEM กล้องจุลทรรศน์ชนิดคอมพาวด์ และชนิดเรืองแสง
- ตู้เพาะเลี้ยง
- เครื่องอุ่นสไลด์
- ไมโครเวฟ

วิธีการ

1.1 **การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรดูกูและการสร้างไมโครสปอร์**

การตรวจสอบความมีชีวตของละอองเกสร ทำโดยใช้ 2 วิธีคือ

การย้อมสีอะซีโตคาร์มีน

ทำการเลือกดอกดูกูในระยะที่ดอกเริ่มบานจากต้น 4 ต้นๆละประมาณ 10-15 ดอก แยกส่วนของอับเรณูออกมาและขยี้อับเรณูบนแผ่นสไลด์เพื่อให้ละอองเกสรแตกออกมา หยดอะซิโตคาร์มีน 2% ลงบนแผ่นสไลด์ที่มีละอองเกสรปริมาณ 1 หยด ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ เคาะเบาๆ แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ นับละอองเกสรที่ย้อมติดสีและไม่ติดสี ในแต่ละจุด (X 200) จำนวน 5 จุด (ทำซ้ำต้นละ 3 สไลด์) บันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ผล

การตรวจสอบความงอกของละอองเกสร

ทำการเลือกดอกดูกูในระยะที่ดอกเริ่มบานจากต้น 4 ต้นๆละประมาณ 10-15 ดอก แยกส่วนของอับเรณูออกมาและขยี้อับเรณูบนแผ่นสไลด์ เตรียมอาหารวุ้นสำหรับเพาะละอองเกสรโดยใช้วุ้น 1% และน้ำตาลซูโครส 10% ละลายให้เข้ากัน นำไปอุ่นในไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นหลอมละลาย จากนั้นวางทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงประมาณ 65 องศาเซลเซียส เทวุ้นในจานแก้วขนาดเล็ก ปล่อยทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัว จึงเคาะ

ละอองเกสรที่เตรียมไว้ให้กระจายตัวบนอาหารวุ้น ปิดผาจานแก้วและวางไว้ในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 1 วันจึงนำมาตรวจสอบกางอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ นับละอองเกสรที่งอกและไม่งอก ในแต่ละจุด (X 200) จำนวน 3 จุดในแต่ละจาน (แต่ละต้นทำการเพาะละอองเกสร 3 จาน) บันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ผล

การศึกษาการสร้างไมโครสปอร์

ศึกษาการสร้างไมโครสปอร์โดยเก็บช่อดอกที่เริ่มพัฒนา เลือกดอกที่มีขนาดเล็กยังเป็นตุ่มสีเขียวเข้ม (อายุประมาณ 15-20 วันหลังจากที่ช่อดอกเริ่มยืด) นำดอกดังกล่าวใส่ลงในสารละลายคาร์นอย (เอทธานอล 3 ส่วนและ กรดอะซิติก 1 ส่วน) เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นย้ายมาแช่ใน เอทธานอล 70% เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาศึกษา

เมื่อต้องการศึกษา นำดอกออกมาจากขวด ใช้ปากคีบปลายปหลมเปิดส่วนกลีบดอกและเขี่ยเอาเฉพาะส่วนอับเรณูออกมาวางบนแผ่นสไลด์ ใช้ปากคีบขยี้อับเรณูเบาๆ หยดสีอะซิโตคาร์มีน 1 หยดปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ เพื่อหาระยะที่เหมาะสมที่ต้องการคือระยะที่ Pollen mother cell กำลังแบ่งเซลล์ (ละอองเกสรยังไม่แดกจากอับเรณู) ทำการบันทึกภาพ

1.2. **การศึกษาขนาดและสัณฐานวิทยาของละอองเกสรดูกู**

ทำการเก็บดอกดูกูในระยะดอกเริ่มบานจากต้นดูกู 4 ต้นๆละ 10 ดอก ดองในน้ำยารักษาสภาพเซลล์เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้น นำตัวอย่างดอกไปทำการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยแช่ใน 35, 50 และ 70 เปอร์เซนต์เป็นเวลา 15-20 นาที 1 ครั้งตามลำดับ จากนั้นนำไปแช่ในอัลกอฮอล์ 95 และ 100 เปอร์เซนต์นาน 15-20 นาที 2 ครั้งตามลำดับ หลังจากนั้นนำต้วอย่างใส่ในเครื่องดูดอากาศออกจากเซลล์ ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไหลเข้าสู่เครื่องดูดอากาศเพื่อไล่อากาศและน้ำออกจากตัวอย่าง ปรับอุณหภูมิ และความดัน (ประมาณ 30 องศาเซลเซียสที่ความดัน 1000 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว ทิ้งไว้ประมาณ 20-30 นาที) ทำการดูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากเครื่องดูดอากาศเพื่อให้เกิดสูญญากาศ (เวดิน นพนิตย์,2529)นำตัวอย่างแห้งออกมา ใช้ปลายเข็มเขี่ยส่วนของอับเรณูออกจากดอก นำไปติดบนฐานติดตัวอย่างพืชโดยใช้กาวเชื่อมตัวอย่างพืชติดกับฐาน ขยี้ส่วนอับเรณูเบาๆ เพื่อให้ละอองเกสรแตกออกมา หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้อง SEM บันทึกภาพละอองเกสร

1.2 การตรวจสอบความเป็นไปได้ในการผสมข้าม

ตรวจสอบการผสมข้ามระหว่างดูกูและลองกอง ดูกูและลางสาด ดูกูผสมตัวเอง โดยใช้ละอองเกสรจากต้นดูกูจำนวน 2 ต้นที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าสามารถงอกได้ในห้องปฏิบัติการ มาทำการผสมข้าม

โดยดึงส่วนของอับเรณูจากดอกที่เริ่มบาน เขี่ยเอาเฉพาะละอองเกสรออกจากอับเรณู หยดน้ำกลั่นลงบนละอองเกสร และใช้พู่กันป้ายของสารละลายดังกล่าวบนยอดของดอกที่ใช้เป็นดอกตัวเมีย (เลือกดอกที่เริ่มบานโดยพิจารณาจากการที่กลีบดอกเริ่มแยกออกจากกันและเห็นส่วนของยอดเกสรตัวเมียโผล่ออกมา) โดยมีรายละเอียดคือ

ดก 2 x ลองกอง ผสมจำนวน 50 ดอก

ดูกู2 x ลางสาด ผสมจำนวน 50 ดอก

ดูกู 2 x ดูกู 2 (ปล่อยให้ผสมตัวเองโดยการคลุมถุงก่อนดอกบาน) จำนวน 50 ดอก

ดูกู 2 x ดูกู 3 ผสมจำนวน 50 ดอก

ดูกู 3 x ลองกอง ผสมจำนวน 50 ดอก

ดูกู 3 x ลางสาด ผสมจำนวน 50 ดอก

ดูกู 3 x ดูกู 3(ปล่อยให้ผสมตัวเองโดยการคลุมถุงก่อนดอกบาน) จำนวน 50 ดอก

นอกจากนี้ยังทำการคลุมถุงก่อนดอกบานกับดอกลางสาดและลองกอง ป้องกันการผสมข้ามและนำมาศึกษาเปรียบเทียบด้วย

หลังจากผสมเกสรแล้วจึงทำการเก็บดอกที่ผสมเพื่อนำไปตรวจสอบการงอกของละอองเกสรภายในส่วนของตัวเมียในระยะเวลาต่างๆกัน คือ 2, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ โดยเก็บดอกระยะละ 10 ดอก การตรวจสอบทำโดยแช่ดอกในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ เอทธานอล 6 ส่วน คลอโรฟอร์ม 3 ส่วน และกรดอะซีติก 1 ส่วน เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการระเหยน้ำโดยแช่ใน สารละลายต่อไปนี้คือ เอทธานอล 70% 10 นาที: เอทธานอล 30% 10 นาที น้ำกลั่น 10 นาที ทำให้เซลล์นิ่มโดยแช่ใน 0.8 N NaOH 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงย้อมด้วย aniline blue เข้มข้น 0.1 % ผสมกับ 0.1 N K_3PO_4 เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนตัวเมียเท่านั้นมาวางบนสไลด์ หยด glycerol 1 หยด แล้วปิดด้วย cover glass เคาะเบาๆให้ปิดสนิท ส่องด้วยกล้อง Fluorescence บันทึกภาพ

ผลและวิจารณ์

ความมีชีวิตของละอองเกสรและการสร้างไมโครสปอร์ของดูกู

จากการตรวจสอบพบว่าดูกูจำนวน 3 ต้นจากภาควิชาพืชศาสตร์มีการสร้างละอองเกสรเป็นจำนวนมาก ในขณะที่ดูกูของสวนเกษตรกร ต. คลองหวะสร้างละอองเกสรในปริมาณที่น้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัด เมื่อทดสอบความมีชีวิตโดยการย้อมสีอะซิโตคาร์มีน พบว่าละอองเกสรของดูกูทั้ง 3 ต้นจากภาควิชาพืชศาสตร์ติดสีในเปอร์เซนต์ที่ค่อนข้างสูงคือ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่1) ส่วนต้นที่

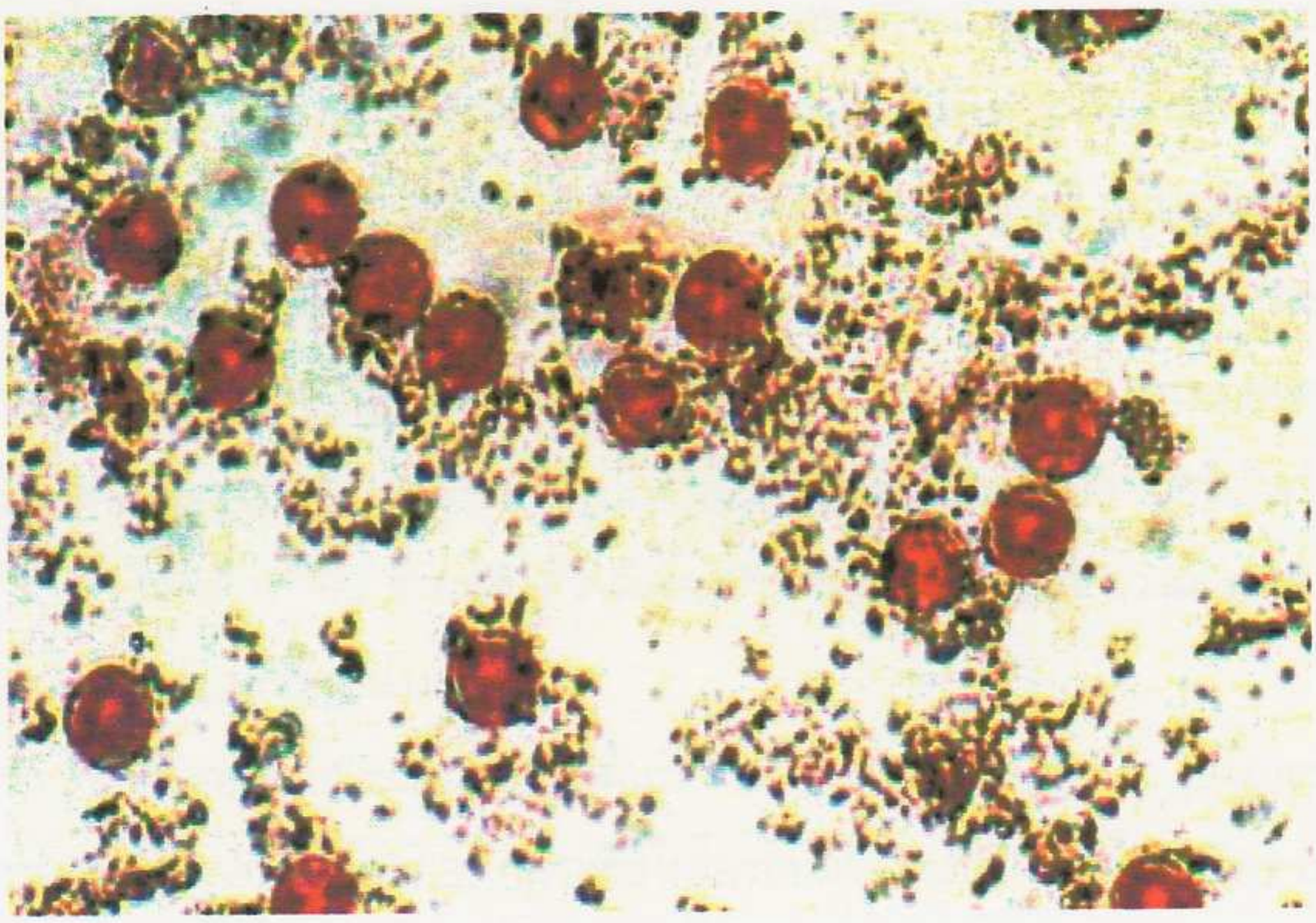
ตารางที่ 1 ขนาดละอองเกสรดูกูที่ทำการวัด โดยเฉลี่ยจาก 50 ละอองเกสร/ต้น

ต้นที่	แหล่งที่มา	ขนาดละอองเกสร
1	ภาควิชาพืชศาสตร์	28.42a
2	ภาควิชาพืชศาสตร์	20.61b
3	ภาควิชาพืชศาสตร์	29.92a
4	ต. คลองหวะ	nd
F-test		**
CV. (%)		13.89

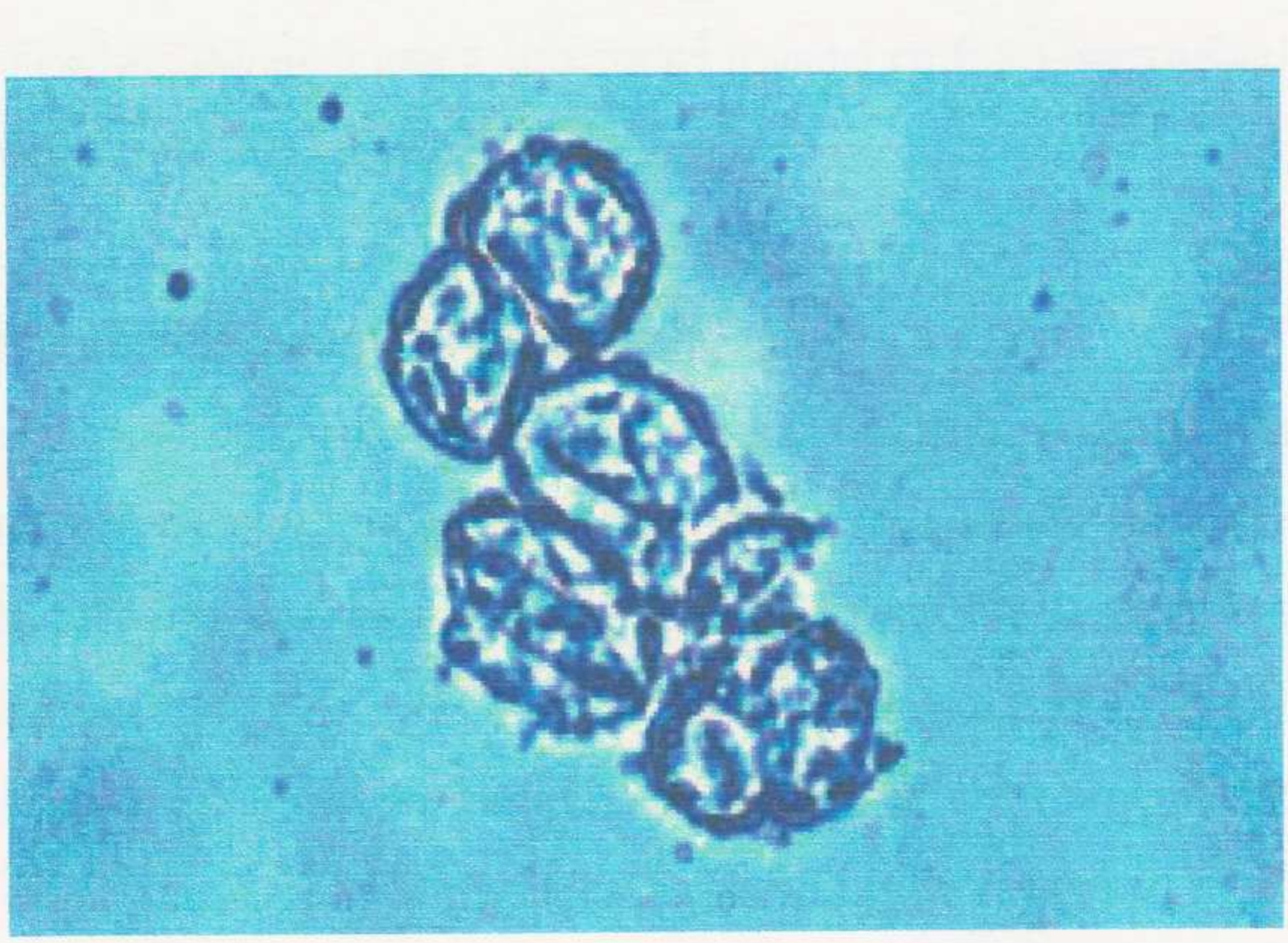
nd = ไม่ได้ทำการวัด

ตารางที่ 2 การทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสรดูกูโดยการย้อมสีอะซิโตคาร์มีนและการทดสอบความงอก

ต้นที่	การย้อมติดสี (%)	การงอกของละอองเกสร (%)
1	97.7^{a}	0^{b}
2	92.6^{b}	2.69^{ab}
3	98.1^{a}	3.58^{a}
F-test	*	*
C.V.(%)	3.28	89.05



(ก)



(ข)

รูปที่ 1 ละอองเกสรดูกูที่ย้อมติดสีอะซิโตคาร์มีน (ก) และละอองเกสรซึ่งไม่สามารถย้อมติดสี (ข)

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบประกอบ (X 100 และ X 400 ตามลำดับ)

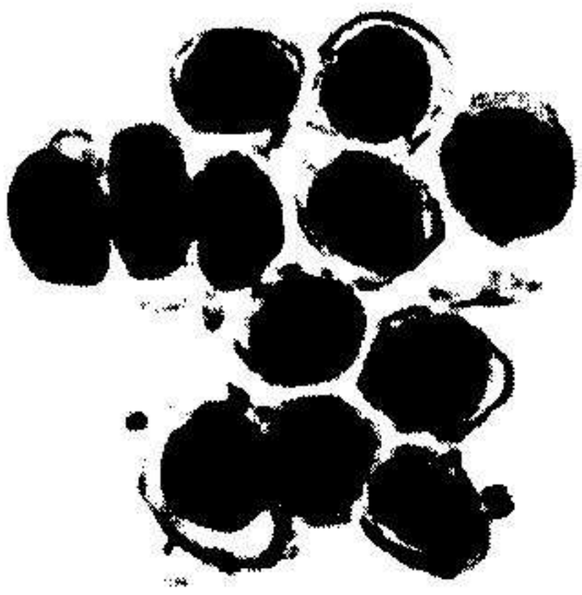
4 จากคลองหวะติดสีเพียง 50 เปอร์เซนต์เท่านั้น และเป็นที่น่าสังเกตว่าละอองเกสรจากต้นนี้ถูกปลดปล่อยออกมาในลักษณะเป็นกลุ่มก้อน (3-4 อัน) (รูปที่ 4) แทนที่จะเป็นละอองเกสรเดี่ยวๆ เช่นเดียวกับละอองเกสรของดูกูอีก 3 ต้น เมื่อมีการทดสอบความงอก พบว่ามีเพียง 2 ต้นเท่านั้นที่สามารถงอกได้ เปอร์เซนต์ความงอกค่อนข้างต่ำคือ 2.69-3.58 เปอร์เซนต์เท่านั้น (ตารางที่ 2)ในขณะที่ดูกูจากสวนเกษตรกร ต.. คลองหวะไม่สามารถงอกได้เลย (ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้นำมาวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกับต้นอื่นๆ เพราะเกษตรกรได้โค่นต้นก่อนที่จะมีการทดลองซ้ำ) จากการศึกษาของมงคลและคณะ (2543) พบว่าดูกูพื้นเมืองผลิตละอองเกสรเป็นจำนวนมากและย้อมติดสีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ แต่สามารถงอกได้เพียง 4 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับงานทดลองครั้งนี้ ความแตกต่างที่เกิดขึ้นคงเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

การศึกษา Pollen mother cells ของดูกูต้นที่ 1 2 และ 3 พบว่า pollen mother cells มีการแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นปกติ ให้ละอองเกสรหรือไมโครสปอร์ จำนวน 4 ไมโครสปอร์ เป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 2) ในขณะที่ดูกูต้นที่ 4 จาก ต. คลองหวะนั้น ส่วนใหญ่มีการแบ่งเซลล์ผิดปกติทั้งที่ให้ 1 ไมโครสปอร์ขนาดใหญ่ (Monad) และ 2 ไมโครสปอร์ (Dyads) (รูปที่ 2) ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้เองที่มีผลทำให้ละอองเกสรผิดปกติและไม่มีชีวิต

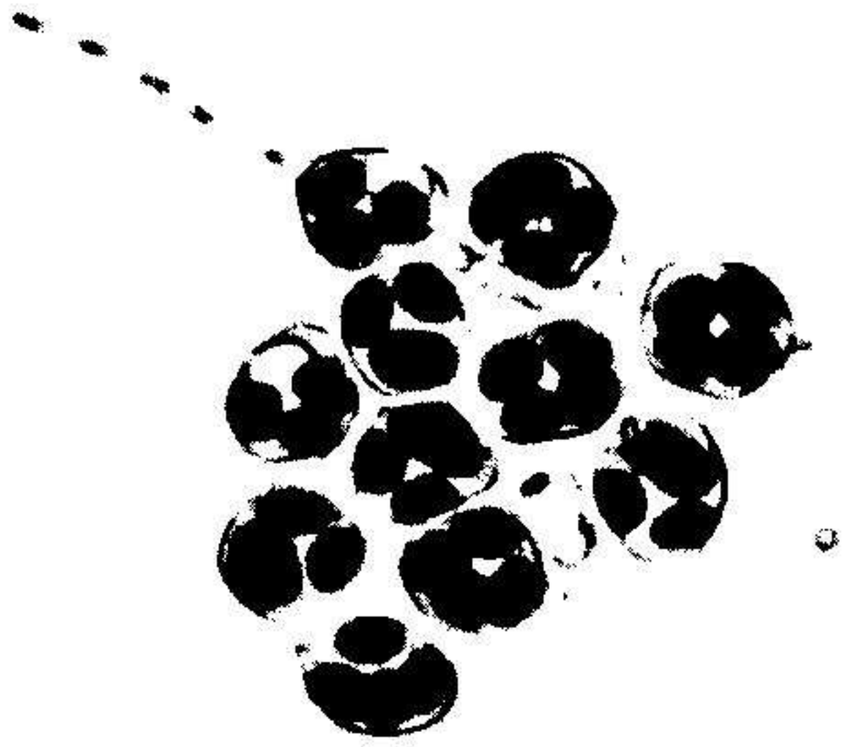
การศึกษาขนาดและลักษณะสัณฐานของละอองเกสรดูกู

ลักษณะสัณฐานของละอองเกสรดูกูทั้ง 4 ต้นมีลักษณะไกล้เคียงกัน คือมีรูปร่างเป็นทรงกลม (spheroidal) ผิวขรุขระมีหนามแหลมขนาดเล็กกระจายทั่วไป สลับกับปมลักษณะกลมมนประปราย มีช่องเปิด 2 ช่อง คือด้านบนและด้านล่าง ช่องเปิดนี้เป็นช่องทางที่จะให้หลอดละอองเกสรแทงทะลุออกมาหากมีการงอกของละอองเกสร (รูปที่ 3 ก) ละอองเกสรบางอันมีความแตกต่างไปจากนี้บ้างเล็กน้อย คือจะไม่เป็นทรงกลม แต่มีลักษณะคล้ายผลลูกแพร์ (รูปที่ 3 ข) ส่วนละอองเกสรที่ผิดปกติชัดเจนซึ่งไม่สามารถงอกได้มักเป็นละอองเกสรฝ่อ บริเวณผิวค่อนข้างเรียบ (รูปที่ 3 ค และ ง) สำหรับละอองเกสรของดูกูจาก ต. คลองหวะ เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้อง SEM เห็นได้ชัดว่าจะเกาะกันเป็นกลุ่ม 3-4 อัน ส่วนใหญ่จะฝ่อและมีผิวเรียบ (รูปที่ 4) ขนาดของละอองเกสรที่ทำการวัดขนาดจากตัวอย่างต้นละ 50 ละอองเกสร มีขนาดอยู่ระหว่าง 20.61-29.92 ไมครอน (ยกเว้นละอองเกสรจาก ต. คลองหวะที่ไม่ได้วัดขนาดเนื่องจากเกาะกันเป็นกลุ่ม

(ก)



(ข)



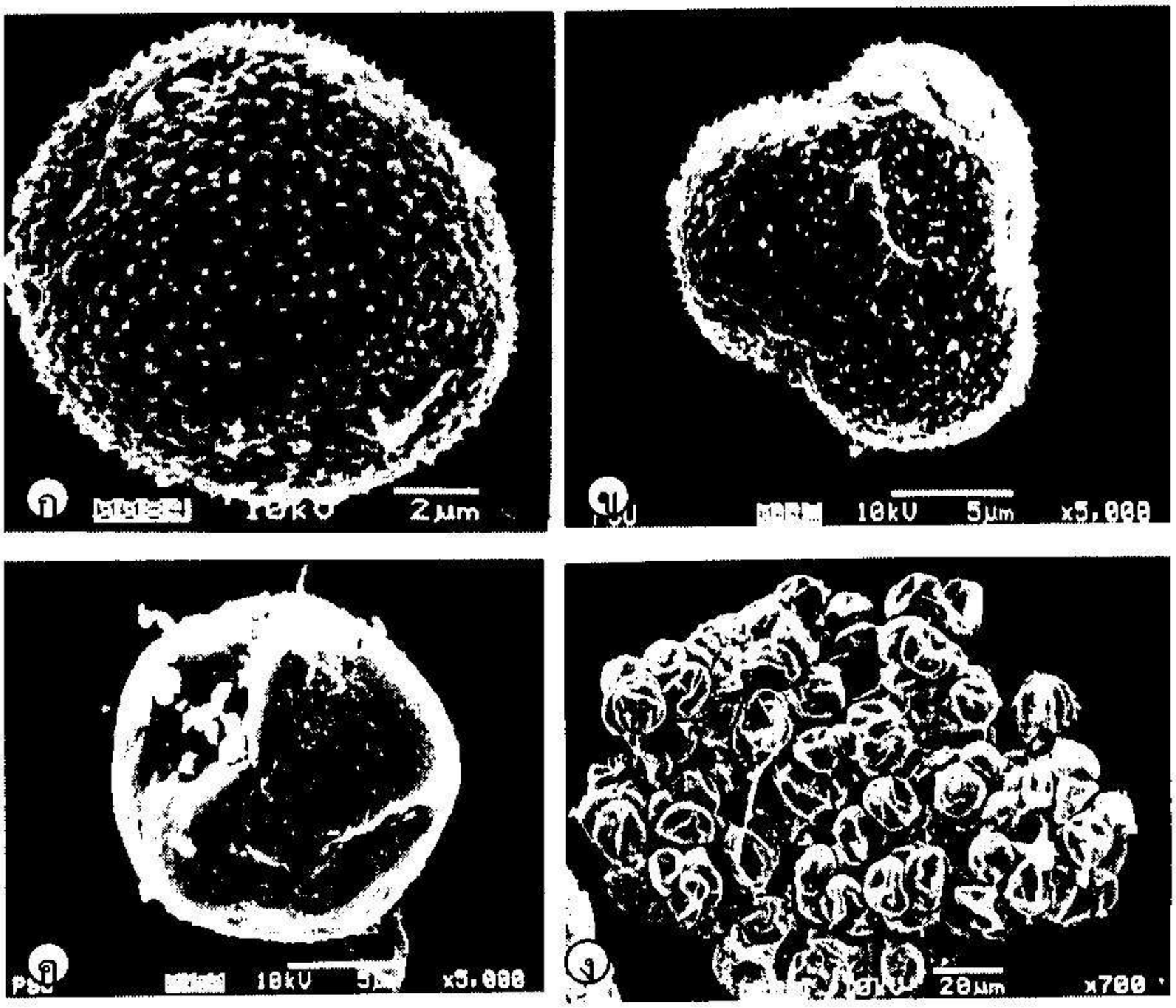
(ค)

รูปที่ 2 Pollen mother cells ที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสผิดปกติมีทั้งที่เป็น monad, dyads, และ triads (ก)

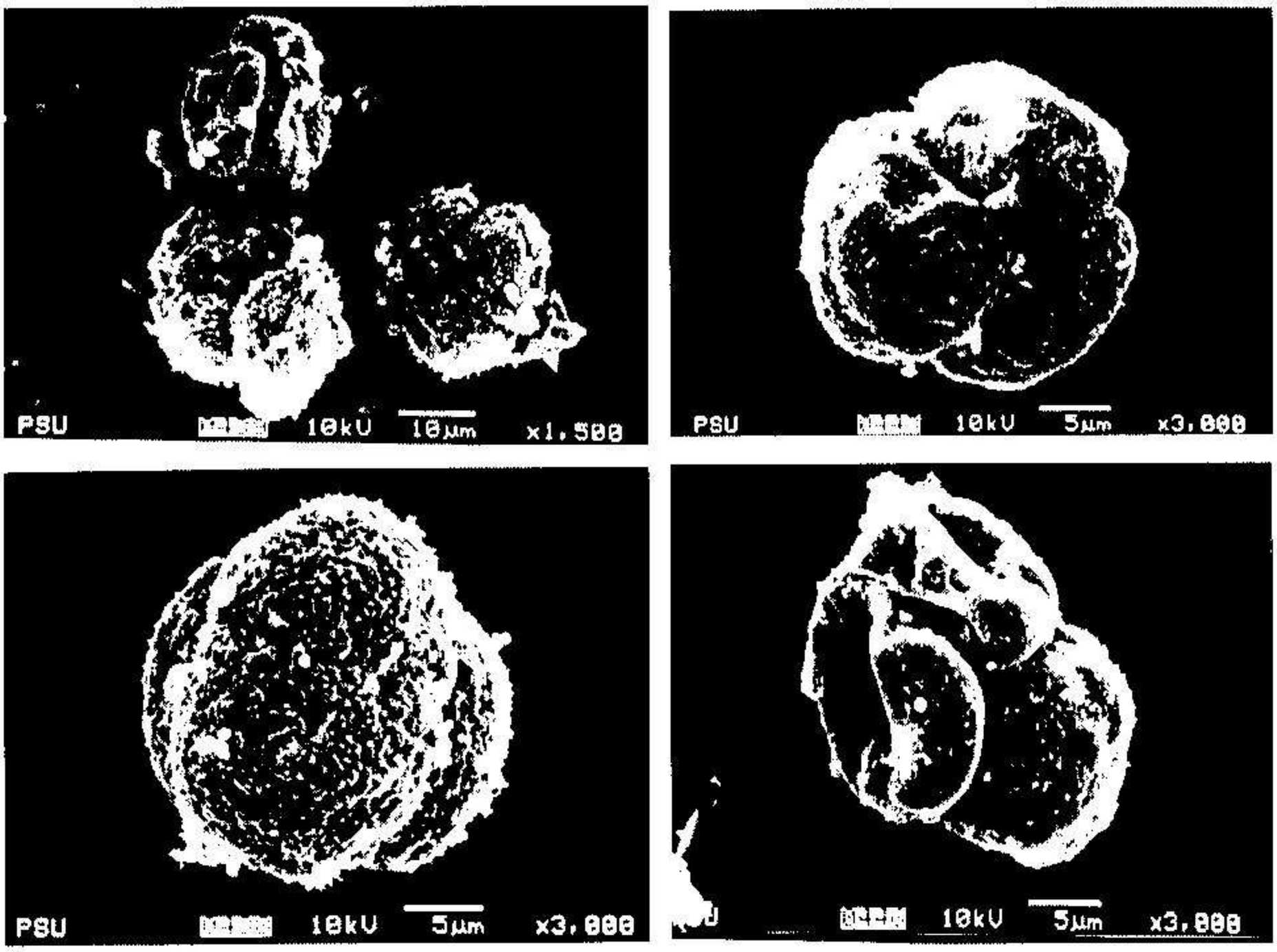
(ข) ลักษณะ monad (ค) Pollen mother cells ที่มีการแบ่งเซลล์ปกติส่วนใหญ่เป็น tetrads

การตรวจสอบความเป็นไปได้ในการผสมข้าม

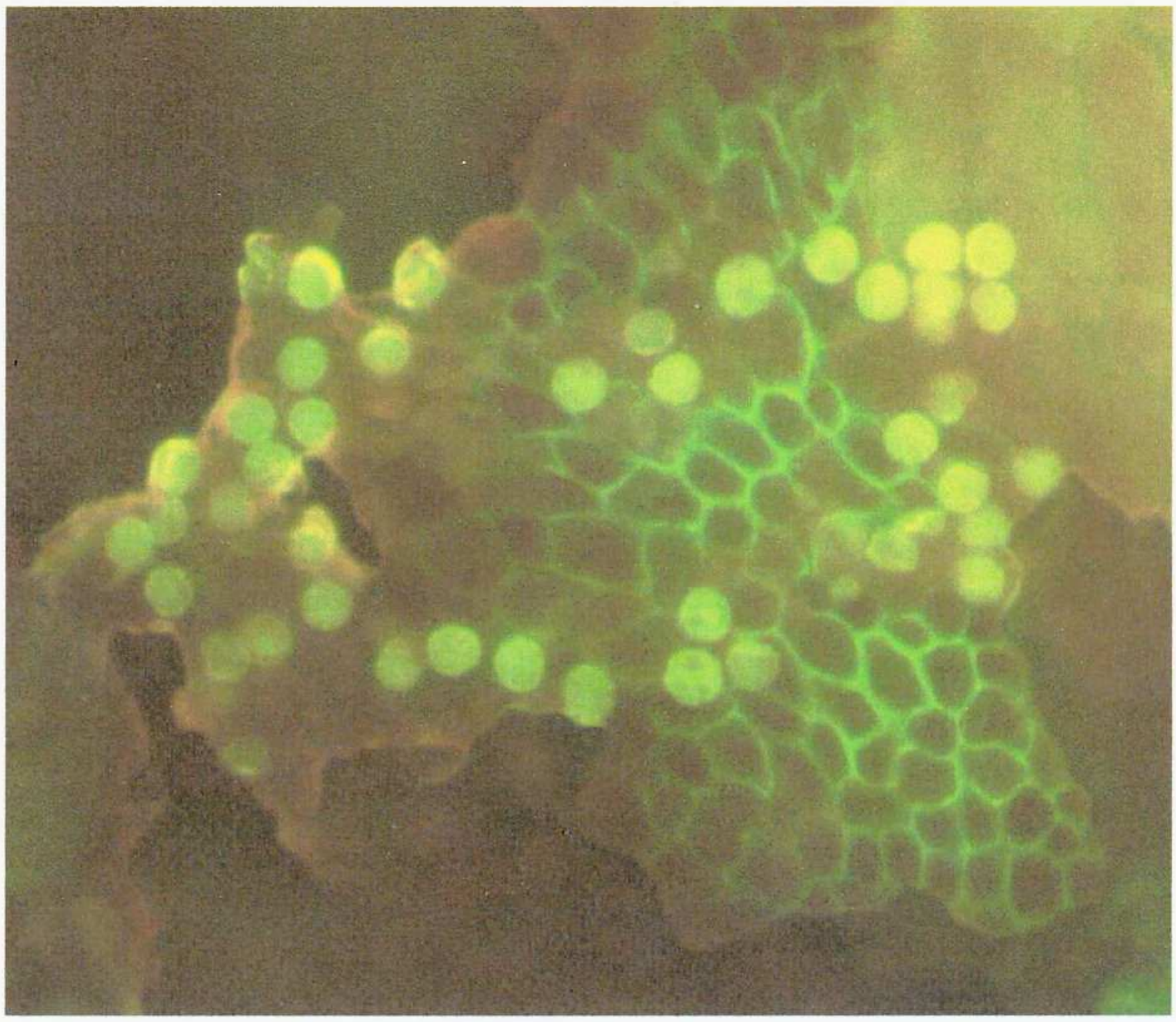
จากการทดลองผสมข้ามระหว่างดูกูกับดูกู ดูกูกับลองกอง ดูกูกับลางสาด โดยใช้ละอองเกสรดูกูที่ผ่านการทดสอบความงอกแล้วมาผสม รวมไปถึงการให้ดูกูผสมตัวเอง ลางสาดและลองกองคลุมถุง โดยการคลุมถุงตั้งแต่ดอกยังอ่อน จากนั้นจึงทำการเก็บดอก ย้อมสี และสังเกตุในส่วนตัวเมียของพืชแต่ละชนิดภายใต้กล้อง Fluorescence ผลปรากฏว่าไม่พบการงอกของละอองเกสรเลย ยกเว้นในดูกูผสมตัวเองที่มีการงอกของละอองเกสรในช่วงระยะเวลา 2 วันหลังผสม (รูปที่ 5 ข) แต่พบเป็นจำนวนน้อยเพียง 2-3 ละอองเกสรเท่านั้นและหลอดละอองเกสรที่พบมีขนาดสั้นๆ คาดว่าคงไม่สามารถเข้าไปผสมกับไข่ได้ อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้อาจยังไม่สมบูรณ์เพียงพอที่จะสรุปได้ว่าไม่เกิดการผสมข้ามในกลุ่มประชากรของพืชสกุลลางสาด การผสมข้ามไม่ประสบความสำเร็จอาจเป็เพราะปัจจัยสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เนื่องจากช่วงการผสมเกสรอากาศค่อนข้างร้อนมาก หรือช่วงการผสมเกสรนั้นแม้ละอองเกสรอยู่ในช่วงพร้อมผสม (anthesis) แต่ส่วนของตัวเมียอาจยังไม่พร้อมรับการผสม (receptive) ซึ่งพืชหลายชนิดมีกลไกดังกล่าว จึงทำให้มีพฤติกรรมเป็นพืชผสมข้ามในธรรมชาติ (Ferh,1987) จากผลการทดลองครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นถึงความเป็นไปได้ในการผสมข้ามในพืชสกุลลางสาด ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมให้ลึกลงไปว่า อะไรคือปัจจัยที่ทำให้การผสมข้ามไม่ประสบความสำเร็จ และหากพืชกลุ่มนี้ไม่สามารถผสมข้ามกันได้จริงๆ แล้วในธรรมชาติ อะไรคือสาเหตุที่ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดูกูและลางสาด



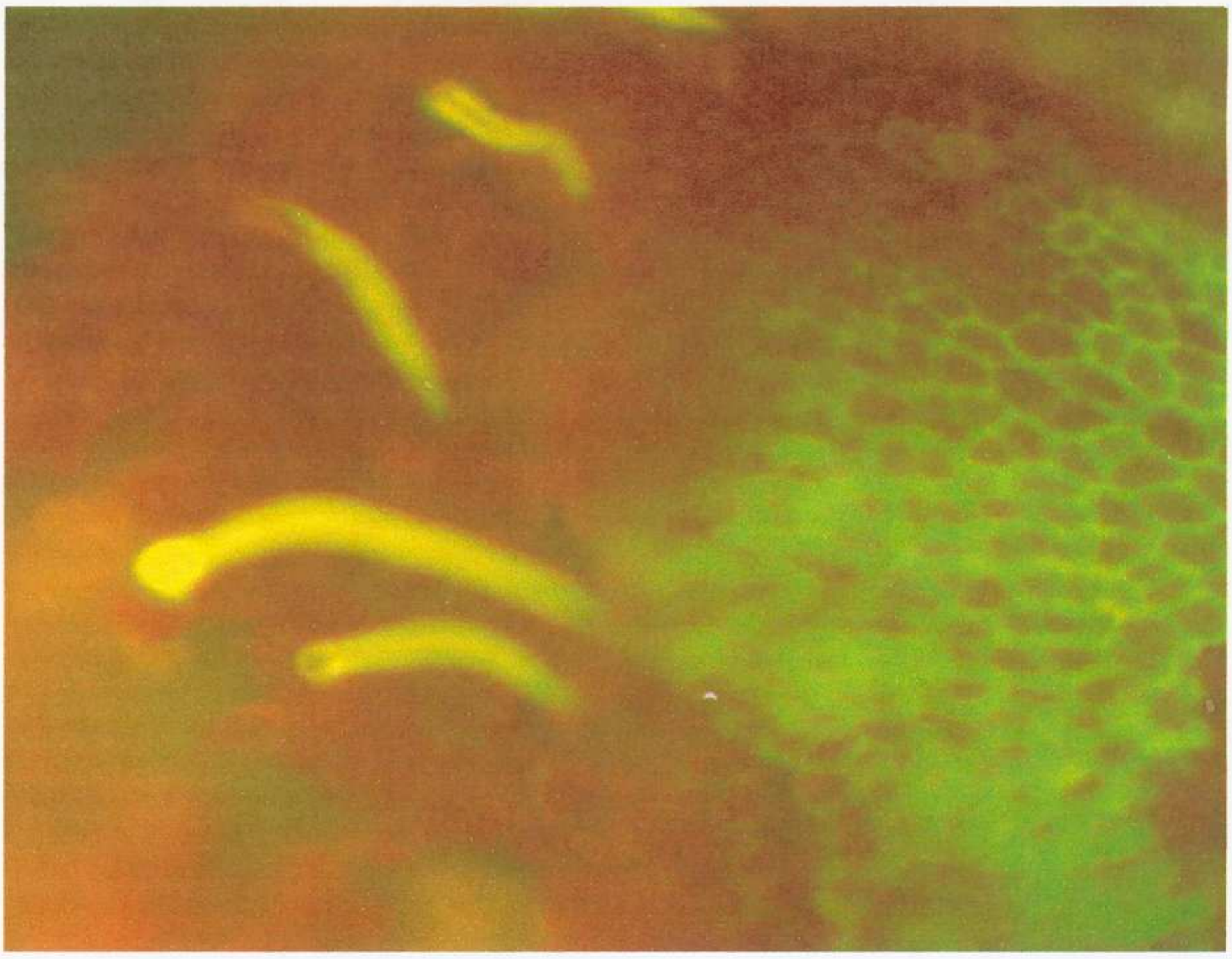
รูปที 3 ลักษณะละอองเกสรดูกู เปรียบเทียบระหว่างละอองเกสรปกติ (ก) และ ละอองเกสรที่ผิดปกติ (ข) (ค) และ (ง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)



รูปที่ 4 ลักษณะละอองเกสรดูกูที่ถูกปลดปล่อยออกมาเป็นกลุ่มก้อน ซึ่งทั้งหมดไม่สามารถงอกได้เมื่อทำการเพาะในห้องปฏิบัติการ



(ก)



(ข)

รูปที่ 5 (ก) ละอองเกสรดูกู (ที่ไม่สามารถงอกได้) บนยอดเกสรตัวเมียของลางสาดหลังการช่วยผสมเกสร 24 ชั่วโมง
(ข) ละอองเกสรดูกู (ที่สามารถงอกได้) บริเวณใกล้ส่วนยอดเกสรตัวเมียของดูกูเอง หลังการช่วยผสมเกสร 24 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

จรัสศรี นวลศรี สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม และอุษา ขูรักษ์. 2544. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.) ที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยเทคนิค RAPD. เอกสารการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 39 3-7 กุมภาพันธ์ 2544 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ภูวดล บุตรรัตน์. 2528. เทคนิคทางพฤกษศาสตร์. ปัตตานี : ภาควิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสาตร์แลเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เวคิน นพนิตย์. 2529. จุลทรรศน์อีเล็คตรอนแบบส่องสแกน:การประยุกต์ทางวิทยาศาสตร์การแพทย์. กรุงเทพฯ: คณะทันตแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุไรวรรณ นามศรี มงคล แซ่หลิม และจรัสศรี นวลศรี 2543. ความมีชีวิตของละอองเรณูของลองกอง ลางสาด และดูกู. ว.สงขลานครินทร์ 22: 35-41.

Bernado, F.A., C.C. Jessena and D.A. Ramarez. 1961. Parthenocarpy and apomixis in *Lansium domesticum* Correa. The Phillippine Agriculturalist 44:415-421.

Ferh, W.R. 1987. Principles of Cultivar Development::Theory and Technique. NewYork: McGraw-Hill Inc.

Konlasuk, S., C. Nualsri and S. Te-chato. 2001. Establisment of experimantal conditions of Random amplified Polymorphic DNA (RAPD).analysis II. Primer screening and identification of *Lansium domesticum* Corr. Songklanakari J. Sci. Technol. 23: 325-334.