รายงานวิจัย

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.)ที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยใช้เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

A Survey on Genetic Variability of Longkong (*Lansium domesticum* Corr.) Seedlings by RAPD (Random amplified polymorphic DNA) Technique

โดย

นางสาวจรัสศรี นวลศรี

นายสมปอง เตชะโต

นางมงคล แซ่หลิม

ภาควิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

คณะทรัพยากรธรรมชาติ วิทยาเขตหาดใหญ่

เลขหมู่ SK321.A2 ว572ร ฉ.1

Bib Key 211386

29 มิ.ย. 2544

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกองหรือพืชสกุล *Lansium* เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นสูงต่อไป
2. เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกองที่ได้จากการเพาะเมล็ด สำหรับการแนะนำการขยายพันธุ์ที่ถูกต้อง

สถานที่ทำการทดลองและ/หรือเก็บข้อมูล

1. สวนเกษตรกรจังหวัดปัตตานี, นราธิวาส
2. แปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์
3. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์

ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย

รวมระยะเวลา 2 ปี โดยเริ่มตั้งแต่ปี 2539 ถึง ปี 2541

ประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัย

1. เพื่อเป็นข้อมูลที่ถูกต้องในการแนะนำเกษตรกรในการขยายพันธุ์ลองกอง
2. เป็นส่วนหนึ่งในการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการเรียนการสอนที่เกี่ยวข้องกับงานนี้โดยตรง เช่น การปรับปรุงพันธุ์พืชสวน (510-432) ไม้ผลเมืองร้อน (510-455)
3. เป็นส่วนหนึ่งของการผลิตบัณฑิตในระดับปริญญาโท เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารทางวิชาการ

Nualsri, C. and S. Konlasuk. 2000. Establishment experimental conditions on RAPD (Random amplified polymorphic DNA) analysis of *Lansium domesticum* Correa. 1. DNA extraction from leaf samples. Songklanakarin J. Sci. Technol. 22:403-410.

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกองที่ได้จากการเพาะเมล็ดใน ปี 2539-2541 ได้แบ่งงานทดลองออกเป็น 2 ชุดดังนี้

1. ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากในพืชสกุล *Lansium*
2. ทำการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกองและดูดูโดยเทคนิค RAPD จากไพรเมอร์ที่คัดเลือก

[redacted]
NO.
ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากร
9 มิ.ย. 2541

สรุปผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่จากการดำเนินการวิจัย

1. Nualsri, C. and S. Konlasuk 2000. Establishment experimental conditions on RAPD (Random amplified polymorphic DNA) analysis of *Lansium domesticum* Corr.. I. DNA extraction from leaf samples. Songklanakarin J. Sci. Technol.22:403-410.
2. จรัสศรี นวลศรี สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม และอุษา ชูรักษ์. 2543. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกองที่ได้จากการเพาะเมล็ด (In preparation)

ORIGINAL ARTICLE

Establishment of experimental conditions on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lansium domesticum* Corr. I. DNA extraction from leaf samples

Charassri Nualsri [1] and Suvimon Konlasuk [2]

Abstract

Nualsri, C. and Konlasuk, S.

Establishment of experimental conditions on Random Amplified Polymorhpic DNA (RAPD) analysis of *Lansium domesticum* Corr. I. DNA extraction from leaf samples

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2000, 22(4) : 403-410

DNA extraction from leaf samples of longkong (*Lansium domesticum* Corr.) was investigated. From four different methods, the CTAB method modified from Doyle and Doyle (1990) showed the best result. From 200 mg fresh leaves as starting material, approximately 15-20 µg of DNA was obtained. DNA extracted from leaves in three different stages of development was compared. Young leaves tended to produce higher yields while young fully expanded leaves and old leaves gave almost the same amounts of DNA. Quantity and quality of extracted DNA from leaves that were kept in a sealed brown paper bag and stored in various durations under 3 different conditions, room temperature (30-32°C), 4°C and -30°C, were determined. At room temperature and 4°C, DNA yields declined rapidly after storage for 3 and 5 days, respectively, while leaves storage under -30 °C could be kept at least 30 days and the banding profiles of RAPD-PCR products was not different from fresh leaf extracted DNA.

Key words : RAPD, PCR, *Lansium domesticum*, DNA extraction

[1]Ph.D. (Agronomy), Asst. Prof., [2]Student, Department of Plant Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.
Corresponding e-mail : ncharass@ratree.psu.ac.th
Received, 17 February 2000 Accepted, 24 March 2000

บทคัดย่อ

จรัสศรี นวลศรี และ สุวิมล กลศึก

การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีสำหรับพืชสกุลลางสาด (*Lansium domesticum* Corr.) I. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบ

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2543 22(4) : 403-410

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.) โดยทดสอบจาก 4 วิธี พบว่าวิธีการใช้ CTAB ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1990) ให้ผลดีที่สุด จากชิ้นส่วนใบ 200 มก. ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดอยู่ในช่วง 15-20 ไมโครกรัมโดยประมาณ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่ทำการสกัดจากใบซึ่งมีระยะการเจริญแตกต่างกัน พบว่าใบอ่อนมีแนวโน้มที่จะให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่าใบเพสลาดและใบแก่ซึ่งให้ปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียงกัน จากการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากใบซึ่งทำการเก็บรักษาในถุงกระดาษสีน้ำตาลปิดผนึกที่ระยะเวลาแตกต่างกันภายใต้อุณหภูมิ 3 ระดับคือ อุณหภูมิห้อง (30-32 °C) 4 และ -30 °C พบว่าที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 °C ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเก็บรักษาเพียง 3 และ 5 วัน ตามลำดับ ส่วนปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากใบซึ่งทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 °C เป็นเวลานาน 30 วันลดลงเพียงเล็กน้อย และรูปแบบของแถบดีเอ็นเอไม่มีความแตกต่างจากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบสดเมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.)ที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยเทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA)

จรัสศรี นวลศรี[1] สมปอง เตชะโต[2] มงคล แซ่หลิม[3] และอุษา ชูรักษ์[4]

Abstract

Nualsri, C., S. Te-chato, M. Lim and U. Choorak
A Survey of Genetic Variability in Longkong (*Lansium domesticum* Corr.) Seedlings Using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Technique

Genetic variation of longkong and duku seedlings was determined by RAPD technique with 5 oligonucleotide primers; OPB-07(GGTGACGCAG), OPC-05(GATGACCGCC), OPC-08 (TGGACCGGTA),OPD-01(ACCGCGAAGG) and OPD-03 (GTCGCCGTGA). In total 149 longkong seedlings, including 9 maternal plants, were analyzed. Identical DNA patterns were found, except 2 seedlings exhibited slightly different fragment pattern profiles and 49% of duku seedlings revealed genetic variation that differ from their maternal plants. Based on the results obtained from this study, it was concluded that longkong produces almost only nucellar seedlings while duku produces 49 % zygotic seedlings, indicating longkong can be propagated true-to-type by seed.

Key words: longkong, duku (*Lansium domesticum* Corr.), RAPD, genetic variability

---

Plant Science Department, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

---

[1]Ph.D.(Agronomy) ผู้ช่วยศาตราจารย์ [2]Ph.D. (Cell Technology) รองศาสตราจารย์ [3] M.S. (Agr.) รองศาสตราจารย์ [4] วท.บ (เกษตรศาสตร์) ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

บทคัดย่อ

จรัสศรี นวลศรี สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม และอุษา ชูรักษ์

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.)ที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยเทคนิคอาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA)

ทำการศึกษาความแปรปรวนของทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกอง และ ดูกูที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยใช้เทคนิค RAPD กับไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิดคือ OPB-07(GGTGACGCAG), OPC-05(GATGACCGCC), OPC-08 (TGGACCGGTA),OPD-01(ACCGCGAAGG) และ OPD-03 (GTCGCCGTGA) พบว่าจากจำนวนต้นกล้าลองกอง 149 ต้น รวมทั้งต้นแม่ 9 ต้น ที่ทำการทดสอบให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด ยกเว้นต้นกล้า 2 ต้นที่ให้ลายพิมพ์ต่างจากต้นแม่เล็กน้อย ในขณะที่ต้นกล้าดูกูมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่างจากต้นแม่ประมาณ 49 % แสดงว่าต้นกล้าลองกองส่วนใหญ่เป็นต้นกล้านิวเซลลา (nucellar seedling) ซึ่งจะมีพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ ส่วนดูกูนั้นต้นกล้า 49 % เป็นต้นกล้าไซโกติก (zygotic seedling) คือต้นกล้าที่เกิดจากการผสม ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากต้นแม่ ดังนั้นการเพาะเมล็ดลองกองจะได้ต้นกล้าที่ตรงตามพันธุ์เกือบทั้งหมด

สารบาญ

ลำดับเรื่อง	ชื่อเรื่อง	หน้า
1.	Establishment experimental conditions on RAPD (Random amplified polymorphic DNA) analysis of *Lansium domesticum* Corr. I. DNA extraction from leaf samples	1
2.	การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกองที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยเทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA)	9

ORIGINAL ARTICLE

Establishment of experimental conditions on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lansium domesticum* Corr. I. DNA extraction from leaf samples

Charassri Nualsri [1] and Suvimon Konlasuk [2]

Abstract

Nualsri, C. and Konlasuk, S.

Establishment of experimental conditions on Random Amplified Polymorhpic DNA (RAPD) analysis of *Lansium domesticum* Corr. I. DNA extraction from leaf samples

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2000, 22(4) : 403-410

DNA extraction from leaf samples of longkong (*Lansium domesticum* Corr.) was investigated. From four different methods, the CTAB method modified from Doyle and Doyle (1990) showed the best result. From 200 mg fresh leaves as starting material, approximately 15-20 µg of DNA was obtained. DNA extracted from leaves in three different stages of development was compared. Young leaves tended to produce higher yields while young fully expanded leaves and old leaves gave almost the same amounts of DNA. Quantity and quality of extracted DNA from leaves that were kept in a sealed brown paper bag and stored in various durations under 3 different conditions, room temperature (30-32°C), 4°C and -30°C, were determined. At room temperature and 4°C, DNA yields declined rapidly after storage for 3 and 5 days, respectively, while leaves storage under -30 °C could be kept at least 30 days and the banding profiles of RAPD-PCR products was not different from fresh leaf extracted DNA.

Key words : RAPD, PCR, *Lansium domesticum*, DNA extraction

[1]Ph.D. (Agronomy), Asst. Prof., [2]Student, Department of Plant Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.
Corresponding e-mail : ncharass@ratree.psu.ac.th
Received, 17 February 2000 Accepted, 24 March 2000

บทคัดย่อ

จรัสศรี นวลศรี และ สุวิมล กลศึก

การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีสำหรับพืชสกุลลางสาด (*Lansium domesticum* Corr.) I. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบ

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2543 22(4) : 403-410

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.) โดยทดสอบจาก 4 วิธี พบว่าวิธีการใช้ CTAB ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1990) ให้ผลดีที่สุด จากชิ้นส่วนใบ 200 มก. ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดอยู่ในช่วง 15-20 ไมโครกรัมโดยประมาณ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่ทำการสกัดจากใบซึ่งมีระยะการเจริญแตกต่างกัน พบว่าใบอ่อนมีแนวโน้มที่จะให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่าใบเพสลาดและใบแก่ซึ่งให้ปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียงกัน จากการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากใบซึ่งทำการเก็บรักษาในถุงกระดาษสีน้ำตาลปิดผนึกที่ระยะเวลาแตกต่างกันภายใต้อุณหภูมิ 3 ระดับคือ อุณหภูมิห้อง (30-32 °C) 4 และ -30 °C พบว่าที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 °C ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเก็บรักษาเพียง 3 และ 5 วัน ตามลำดับ ส่วนปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากใบซึ่งทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 °C เป็นเวลานาน 30 วันลดลงเพียงเล็กน้อย และรูปแบบของแถบดีเอ็นเอไม่มีความแตกต่างจากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบสดเมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Cultivar or variety identification is usually based on morphological characters. There are several disadvantages of using morphology for genetic marker: 1) morphological markers are in some cases, associated with deleterious effects, 2) they are difficult to analyze in breeding populations, and 3) they are affected by environmental conditions (Tanksley *et al.*, 1989). In *Lansium domesticum* Corr., cultivar characterization is difficult due to a lack of genetic markers. Molecular markers lend themselves to use in applied genetic programs. Many types of molecular markers have been used to observe variation directly at the DNA level, such as restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). Most studies have employed the RFLP marker: they are often codominant but are restricted to regions with low or single copy sequence (Michelmore *et al.*, 1991). RFLP markers can sample various regions of the genome and are potentially unlimited in number. RFLP assays detect DNA polymorphism through restriction endonuclease digestion, coupled with DNA blot hybridization, but are time consuming, require large amounts of plant tissue and involve radioactivity. RAPD markers have demonstrated their usefulness as genetic markers for a variety of eukaryotic organisms. (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). RAPD are polymorphic DNA sequences separated by gel electrophoresis after polymerase chain reaction (PCR) amplification using random oligonucleotide primers. If these priming sites are within an amplifiable distance of each other, a discrete DNA product is produced through thermocyclic amplification (Tingey *et al.*, 1993).

The suitability of DNA preparations for PCR is one of the conditions that affects the RAPD technique. However, for PCR reactions, relatively pure high molecular weight DNA is not required like RFLP (Berthomieu and Meyer, 1991; Brunel, 1992). Any plant contains three types of DNA; nuclear, mitochondrial and chloroplast DNA. In most cases, nuclear DNA is used. Many different methods have been tried in an effort to extract quality DNA from plant tissues (Murrey and Thompson, 1980; Dellaporta *et al.*, 1983; Gawel and Jarret, 1991; Oard and Dronavalli, 1992). All preparation methods involve the removal of the cell wall and nuclear membrane around the

DNA, which is usually done by grinding the tissues in liquid nitrogen with mortar and pestle or a grinder. The DNA is then separated from all other cell components such as cell wall debris, protein, lipids or RNA etc. Because the biochemical composition of plant tissue and species varies considerably, it is impossible to use a single isolation protocol which is optimally suited for all plants. Many DNA isolation techniques widely used by scientists are based on CTAB (hexadecyl trimethylammoniumbromide) extraction buffer (Rogers and Bendich, 1985; Doyle and Doyle, 1987; Gawel and Jarret, 1991; Thomson and Henry, 1993) however, each plant species may require quite different isolation procedures.

The quality and yield of a plant DNA preparation are considerable extent influenced by the condition of the starting material. Most studies used fresh or frozen tissue as a source of DNA. However, in many cases, it is impossible to isolate DNA directly from fresh tissue because the plant species of interest grow at remote locations. Strategies for field collection and preservation are important. Rogstad (1992) suggested that leaf samples can be preserved in saturated NaCl-CTAB for DNA extraction. Thomson and Henry (1993) studied in peach and reported that storage of fresh leaves in a paper envelope in the laboratory, allowing the tissue to dry out over a period of several days, was the most successful approach for DNA extraction. Fresh tissue should be kept cool on ice for a short period of time depending on species and tissue. Since no reports on DNA extraction in *Lansium domesticum* Corr. have been found, this study was designed with the following objectives:

1. To determine which DNA extraction method gives the highest DNA yields for *Lansium domesticum* Corr.

2. To determine if the stage of leaf development affects DNA yields, and

3. To determine if the storage of leaves in different conditions and times prior to extracting DNA can affect quality and yield of DNA.

Materials and Methods

Plant materials

Young fully expanded leaves were collected from 10-year-old longkong trees at the Plant Science Department, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla. All leaves were cleaned with sterile distilled water two times and air dried at room temperature prior to extraction.

Extraction of DNA with different methods

Approximately 200 mg of cleaned fresh leaves were cut into small pieces and placed in a cold mortar. The leaf samples were then ground to a fine powder in liquid nitrogen. Ground samples were placed into 1.5 ml polypropylene centrifuge tubes and the following 4 methods for DNA extraction employed.

Method I : This procedure was modified from Doyle and Doyle (1990). DNA was extracted in 1 mL CTAB buffer [(1% polyvinylpyrrolidone (PVP-40), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM Tris-HCl (pH. 8.0), 2% CTAB and 2% β-mercaptoethanol was added to this buffer just 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 centrifuged at 12,000 rpm 4°C for 2 min. DNA in the aqueous phase was precipitated by mixing with 750 µL isopropanol and pelleted by centrifuge at 12,000 rpm 4°C for 10 min. The DNA pellet was rinsed with 70% ethanol two times, dried and resuspended in 100 µL TE buffer containing of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 1 mM EDTA (pH 7.0) then stored at -20°C until use.

Method II: Ground sample was mixed with 1 mL extraction buffer containing 20 mM Tris- HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA and 10% SDS. The mixture was incubated at 70°C for 15 min before adding 500 µL 5M NH_4OAc. This solution was mixed and incubated again at 4°C for 30 min then centrifuged at 15,000 rpm 4°C for 10 min. Supernatant was removed to a new tube and DNA was precipitated with 600 µL isopropanol

for 10 min at room temperature and centrifuged at 15,000 rpm 4°C for 10 min. The pellet was rinsed with cold 70% ethanol, air dried and resuspended in 100 µL TE buffer.

Method III: This procedure was introduced by Steiner *et al.* (1995). Ground sample was extracted in 1 mL rapid one step extraction buffer (ROSE buffer) containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 312.5 mM EDTA (pH 8.0), 1% sodium lauryl sarcosyl and 1% polyvinyl polypyrrolidone (PVPP). The tubes and contents were vortexed thoroughly and incubated in a water bath at 90°C for 20 min. The samples were placed on ice for 5 min to allow the tissue and PVPP to settle before aliquots of extract are taken (~ 80 µL was obtained) for amplification.

Method IV: The procedure was developed by McDonald *et al.* (1994). Ground sample was placed in a 1.5 ml polypropylene centrifuge tube containing 1 mL extraction buffer [200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 288 mM NaCl 25 mM EDTA and 0.5% SDS]. Each tube was vortexed for 30 sec and centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at room temperature. Supernatant was then transferred to a fresh tube and 750 µL isopropanol was added to the supernatant and mixed gently. The mixture of isopropanol and supernatant was incubated for 5 min at room temperature then centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at room temperature. The pellet was washed with 750 µL 70% ethanol, air dried and the pellet was resuspended in 100 µL TE buffer.

DNA from each method was then approximately quantified and compared by running 2.0 µL of each extract on gel electrophoresis through 0.7% Seakem agarose (FMC Bioproducts, Rockland U.S.A.) using TAE buffer and compared with known amounts of Lambda DNA (λ DNA : Promega, Madison, U.S.A.) as the standards.

Comparison of the amounts of DNA from 3 different stages of leaf tissues

Leaf tissues of longkong were collected at 3 different stages; young leaves (2 weeks after flushing), young fully expanded leaves (6 weeks after flushing) and old leaves (8 weeks after flushing) (Figure 1). All leaves were extracted for DNA yields by the best method from the previous experiment. The quantity of DNA was compared after gel electrophoresis as previously described.

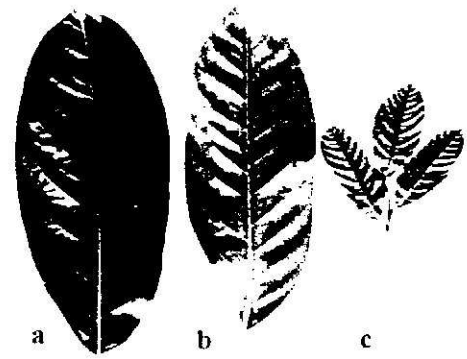


Figure 1. Different stages of longkong leaf samples collected from field grown plants used for DNA extraction: (a) old leaf , (b) young fully expanded leaf and (c) young leaves.

DNA yields from preserved leaves

Leaf tissues of longkong were collected from field grown plants at the same stage from the same tree. Fresh leaf samples were extracted within 60 min after collection using the best method we investigated (CTAB method). Other leaf samples were separated into 3 groups: Group 1, leaf samples were stored separately in brown paper bags (2 leaves/bag) and left at room temperature (~30-32°C) for 1, 3, 5, 7, 14 and 30 days. Group 2, leaf samples were kept in the same way as group 1 but placed at 4°C for the same period of times. Group 3, leaf samples were also placed in brown paper bags and stored at -30°C for 1, 3, 5, 7, 14 and 30 days. DNA was then extracted from each treatment (2 replicates /treatment) and the amounts of DNA were compared after electrophoresis. The quality of DNA from each treatment was tested by RAPD-PCR. Primer selection was based on the ability to generate amplification products in the experiment involving screening of primers (data not shown). Primer OPA-03 (AGT CAGCCAC: Operon, California U.S.A.) was chosen in this study. RAPD protocol was performed in a reaction volume of 25 µL containing

2 µL of 10 X buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 100 µM each dNTP, 1.5 µM of primer, 0.3 µL of Taq DNA polymerase and 40 ng template DNA. The thermal profile for RAPD-PCR was 95°C initial denaturation for 1 min then 39 cycles of 94°C for 1 min, 37°C for 1 min 72°C for 2 min and followed by 1 cycle of 94°C for 1 min, 37°C for 1 min and 72°C for 10 min. PCR was performed in a PCR machine (PCR Sprint Hybaid, UK). Amplification products were then separated by gel electrophoresis through 1.25% Nusieve agarose 3:1 (Bioproduct, Madison U.S.A.) and DNA bands were visualized by UV transillumination after ethidium bromide staining.

Results and Discussion

DNA extraction with different methods

With the same amounts of starting material (~200 mg fresh leaf tissue), it was found that CTAB method (method I) gave the highest amounts of DNA. Approximate yields of DNA obtained from CTAB method were between 300 to 400 ng/2µL (15-20 µg/200 mg fresh tissue) compared to 200 ng/2µL (10 µg/200 mg fresh tissue) from method II and 10 ng/2µL (0.4 µg/200 mg fresh tissue) from method III whereas very small amounts of DNA were obtained from method IV (Figure 2). CTAB buffer protocol and its modification have been widely used for obtaining good quality total DNA from many plant species such as *Musa acuminata* (Gawel and Jarret, 1991), *Nelumbo* (Kanazawa and Tsutsumi, 1992), *Saccharum* (Honeycutt *et al.*, 1992), *Prunus persica* (Thomson and Henry, 1993), *Lotus corniculatus* (Nualsri *et al.*, 1998). Many extraction procedures are time consuming and leave waste materials behind. Of the 4 methods we investigated, the last 2 methods took less time and produced less hazardous wastes, particularly the one-step process of method III. However, these methods are not suitable for longkong leaf extraction. DNA pellet obtained from all methods, except CTAB method tend to be brown colored. Te-chato (personal communication) obtained white DNA pellets from *in vitro* seedling leaves of longkong using method II, while brown color occurred when leaves from field grown plant was used in our experiment. Based on these results, it was concluded that longkong leaf tissues contain high phenolic compounds and different conditions or different stages of plant development may influence the accumulation of phenolic compounds in this species. Phenolic compounds can be eliminated by adding some chemicals such as diethyldithiocarbamic acid, polyvinylpyrrolidone (PVP) and β-mercaptoethanol (Couch and Fritz, 1990; Kanazawa and Tsutsumi, 1992). PVP-40 and β-mercaptoethanol are added into CTAB buffer in order to reduce phenolic compounds, and therefore the whitish DNA pellet was obtained using method I. In addition to phenolic compounds, the other impurity, namely polysaccharide, which is abundant in many plant species, also affect RAPD products (Demeke and Adams, 1992). DNA can be successfully isolated from plants rich in polysaccharide by increasing the CTAB concentration in the isolation buffer (Doyle and Doyle, 1990). According to the results obtained from this experiment, method I was chosen as the extraction method for further studies.

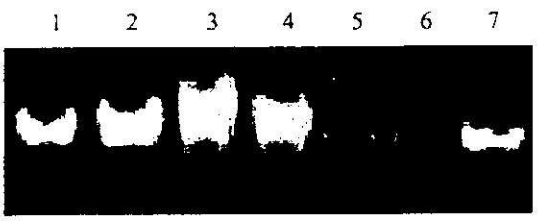


Figure 2. DNA yields extracted from leaf samples using different methods. Lane 1, lane 2 and lane 7 are 100, 200 and 80 ng/2µL λ DNA. Lane 3, 4, 5 and 6 are DNA from method I, II, III and IV.

Comparison of the amounts of DNA from 3 different stages of leaf tissues.

Young leaves, young fully expanded leaves and old leaves of longkong were harvested and extracted for total DNA by using CTAB method as described previously. The results showed that young leaves tend to produce higher DNA yields

compared to young fully expanded leaves and old leaves (Figure 3). Young leaves always give higher yields because they contain more cells per weight. In addition, young leaves contain less polysaccharides and phenolic compounds and are easy to grind, particularly when liquid nitrogen is not available. Thus, in many cases, very young leaves are recommended as the starting material for DNA extraction. From our experiment, although less DNA was obtained from both young fully expanded leaves and old leaves compared to young leaves using the same extraction method, all amounts were enough for many RAPD reactions, indicating that all stages of leaf development can yield sufficient DNA for this technique.

DNA yields from preserved leaves

Yields extracted from preserved leaves in different conditions and different period of storage were compared (Figure 4). At room temperature (~30-32°C) and 4°C, leaf color changed from green to brown after 3 and 5 days respectively, resulting in a brown pellet of DNA. At the 5th day or longer, no DNA was obtained under room temperature

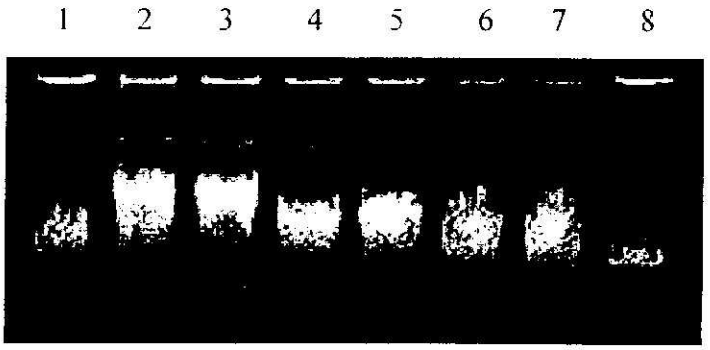


Figure 3. DNA yields extracted from different stages of longkong leaf samples using CTAB method. Lane 1 and 8 are 200 and 100 ng/2μL λ DNA. Lane 2, 3 are DNA from the young leaves, lane 4, 5 are DNA from young fully expanded leaves and lane 6, 7 are DNA from old leaves

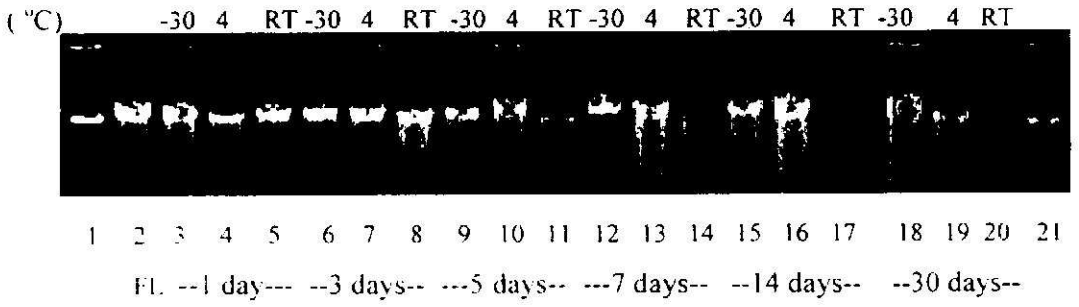


Figure 4. DNA yields extracted from longkong leaf samples after storing in various durations under different conditions. Lane 1 and lane 21 are 80 and 40 ng/ 2μL (λ DNA, lane 2 is DNA from fresh leaf, lane 3, 6, 9, 12, 15, 18 are DNA from 1, 3, 5, 7, 14 and 30 days at -30°C. Lane 4, 7, 10, 13, 16, 19 are DNA from 1, 3, 5, 7, 14 and 30 days at 4°C. Lane 5, 8, 11, 14, 17, 20 are DNA from 1, 3, 5, 7, 14 and 30 days under room temperature.
FL= DNA from fresh leaf. RT= room temperature.

while all durations under 4°C and -30°C still yield sufficiently. Thomson and Henry (1993) studied in peach and reported that sufficient yields of DNA can be obtained from leaves storage in paper envelopes at room temperature for 122 days. They also noted that high moisture content in leave may shorten the storage period. High moisture content together with high room temperature was accounted for the rapidly decrement of DNA in this experiment. In the genus *Macaranga* under tropical rain forest conditions in Malaysia, Weising *et al.* (1995) suggested an appropriated means of preserving leaf tissues for DNA isolation by dessication of leaf tissues in polypropylene tube with silica gel.

To ensure an acceptable quality, DNA was then tested for RAPD products. RAPD was performed with a random primer (OPA-03) and products obtained from each treatment are shown in Figure 5. DNA from tissues stored at -30°C for 1 to 30 days produced the same products as DNA extracted from fresh tissues, however, differences in band intensity were observed (Figure 5a). No RAPD product was observed from extracted DNA after storage under room temperature and 4°C for 1 and 3 days, respectively (Figure 5b, 5c). At 4°C, although DNA can be obtained after storage up to 30 days but its quality is not good enough for RAPD. The results demonstrated that preservation of leaf tissues under -30°C was the most successful DNA extraction of longkong.

Conclusions

Extraction of DNA from longkong leaf tissues was successful using a modified CTAB method from Doyle and Doyle (1990). In this method, 1% PVP-40 is added in the buffer and β-mercaptoethanol is increased from 0.2% to 2%. Every stage of leaf growth can be used for extraction to get sufficient amounts of DNA for many RAPD reactions. However, young leaves are preferred because they tend to produce higher yields and are easier to grind, especially if liquid nitrogen is not available. After harvesting, leaf tissues can be stored at -30°C for at least 30 days for DNA

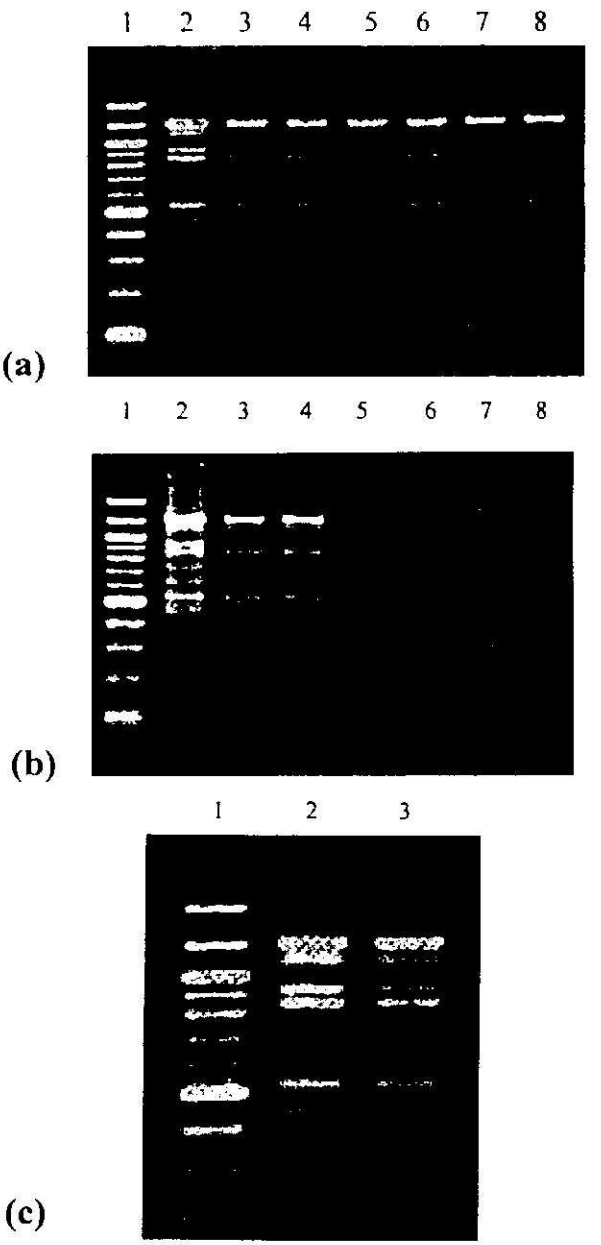


Figure 5. PCR products amplified with primer OPA-03 after electrophoresis of extracted DNA from longkong leaf samples after storing in various durations under different conditions. (a) Lane 1 is 100 bp Ladder DNA, lane 2 is products from fresh leaf, lane 3, 4, 5, 6, 7, 8 are products from 1, 3, 5, 7, 14 and 30 days under -30°C. (b) 4°C and (c) room temperature.

extraction and quality of DNA is good enough for RAPD technique.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from Prince of Songkla University.

References

Berthomieu, P. and Meyer, C. 1991. Direct application of plant genomic DNA from leaf and root species using PCR. Plant Mol. Biol.17 : 555-557.

Brunel, D. 1992. An alternative, rapid method of plant DNA extraction for PCR analysis. Nucleic Acids Res. 20:4676.

Couch, J.A. and Fritz, P.J. 1990. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. Plant Mol. Biol. Rep. 8:8-12.

Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19-21.

Demeke, T. and Adams, R.P. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. Biotechniques 12:332-334.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15

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

Gawel, N.J. and Jarret, R.L. 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. Plant Mol. Biol. Rep. 9:262-266.

Honeycutt, R., Sobral, B.W.S., Keim, P. and Irvine, J.E. 1992. A rapid DNA extraction method for sugarcane and its relatives. Plant Mol. Biol. Rep. 10:66-72.

Kanazawa, A. and Tsutsumi, N. 1992. Extraction of restrictable DNA from plants of the genus *Nelumbo*. Plant Mol. Biol. Rep. 10:316-318.

McDonald, M.B., Elliot, L.J. and Sweeney, P.M. 1994. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. Seed Sci. & Seed Tech. 22:171-176.

Michelmore, R.W., Paran, I. and Kesseli, R. 1991. Identification of markers to distance-resistantce genes by bulked segregant analysis : A rapid method to detect markers in specific genome regions by segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:2336-2340.

Murrey, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.

Nualsri, C., Beuselinck, P.R. and Steiner. J.J. 1998. Rhizomatous *Lotus corniculatus* L. III Introgression of rhizomes into autogamous germplasm. Crop Sci. 38:503-509.

Oard, J.H. and Dronavalli, S. 1992. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis of random-primer PCR. Plant Mol. Biol. Rep. 10:236-241.

Rogers, S.O. and Bendich, A.J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol. Biol. 5: 69-76.

Rogstad, S.H. 1992. Saturation NaCl-CTAB solution as a mean of field preservation of leaves for DNA analysis. Taxon. 41:701-708.

Steiner, J.J., Poklemba, C.J. Ejellstrom, R.G. and Elliot. L.E. 1995. A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analysis. USDA/ARS, Oregon Univ. pp 1-8.

Tanksley, S.D., Young, N.D., Palerson, A.H. and Bonierbale, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding : new tools an old science. Bio/Technology 7:257-264.

Thomson, D. and Henry, R. 1993. Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis. Plant Mol. Biol. Rep. 11:202-206.

Tingey, S.V., Rafalski, J.A. and Williams, J.G.K. 1993. Genetic analysis with RAPD markers. **In** Application of RAPD Technology to Plant Breeding. (M. Neff, ed.). ASHS Publishers. St. Paul. MN. pp 3-8.

Weising, K.H., Nymbom, K., Wolff, K. and Meyer. M. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, Fla.

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.

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.)ที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยเทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA)

จรัสศรี นวลศรี[1] สมปอง เตชะโต[2] มงคล แซ่หลิม[3] และอุษา ชูรักษ์[4]

Abstract

Nualsri, C., S. Te-chato, M. Lim and U. Choorak
A Survey of Genetic Variability in Longkong (*Lansium domesticum* Corr.) Seedlings Using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Technique

Genetic variation of longkong and duku seedlings was determined by RAPD technique with 5 oligonucleotide primers; OPB-07(GGTGACGCAG), OPC-05(GATGACCGCC), OPC-08 (TGGACCGGTA),OPD-01(ACCGCGAAGG) and OPD-03 (GTCGCCGTGA). In total 149 longkong seedlings, including 9 maternal plants, were analyzed. Identical DNA patterns were found, except 2 seedlings exhibited slightly different fragment pattern profiles and 49% of duku seedlings revealed genetic variation that differ from their maternal plants. Based on the results obtained from this study, it was concluded that longkong produces almost only nucellar seedlings while duku produces 49 % zygotic seedlings, indicating longkong can be propagated true-to-type by seed.

Key words: longkong, duku (*Lansium domesticum* Corr.), RAPD, genetic variability

---

Plant Science Department, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

---

[1]Ph.D.(Agronomy) ผู้ช่วยศาตราจารย์ [2]Ph.D. (Cell Technology) รองศาสตราจารย์ [3] M.S. (Agr.) รองศาสตราจารย์ [4] วท.บ (เกษตรศาสตร์) ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

บทคัดย่อ

จรัสศรี นวลศรี สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม และอุษา ชูรักษ์

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.)ที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยเทคนิคอาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA)

ทำการศึกษาความแปรปรวนของทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกอง และ ดูกูที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยใช้เทคนิค RAPD กับไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิดคือ OPB-07(GGTGACGCAG), OPC-05(GATGACCGCC), OPC-08 (TGGACCGGTA),OPD-01(ACCGCGAAGG) และ OPD-03 (GTCGCCGTGA) พบว่าจากจำนวนต้นกล้าลองกอง 149 ต้น รวมทั้งต้นแม่ 9 ต้น ที่ทำการทดสอบให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด ยกเว้นต้นกล้า 2 ต้นที่ให้ลายพิมพ์ต่างจากต้นแม่เล็กน้อย ในขณะที่ต้นกล้าดูกูมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่างจากต้นแม่ประมาณ 49 % แสดงว่าต้นกล้าลองกองส่วนใหญ่เป็นต้นกล้านิวเซลลา (nucellar seedling) ซึ่งจะมีพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ ส่วนดูกูนั้นต้นกล้า 49 % เป็นต้นกล้าไซโกติก (zygotic seedling) คือต้นกล้าที่เกิดจากการผสม ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากต้นแม่ ดังนั้นการเพาะเมล็ดลองกองจะได้ต้นกล้าที่ตรงตามพันธุ์เกือบทั้งหมด

บทนำ

ลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.) จัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญอีกพืชหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตสูงสำหรับพื้นที่ทางภาคใต้ของประเทศไทย ปัจจุบันพื้นที่ปลูกลองกองได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ปี 2530 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกลองกอง 37,769 ไร่ และเพิ่มเป็น 160,783 ไร่ในปี 2538 (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542) เนื่องจากความต้องการของผู้บริโภคและผลตอบแทนต่อไร่ค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามการผลิตลองกองยังคงมีปัญหามากมาย เช่น ผลผลิตไม่สม่ำเสมอ คุณภาพผลไม่แน่นอน ปัญหาการเก็บเกี่ยวรวมไปถึงโรคและแมลง ซึ่งปัญหาเหล่านี้ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากปัจจัยสภาพแวดล้อมและการจัดการที่ไม่เหมาะสม ความไม่แน่นอนของพันธุ์ที่ใช้ปลูกก็นับว่าเป็นปัญหาสำคัญอีกปัญหาหนึ่งของชาวสวนลองกอง เป็นที่น่าสังเกตว่าหลายพื้นที่ที่มีการปลูกลองกองเช่นจังหวัดนราธิวาส ปัตตานี ยะลาและสงขลา เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสวนเก่า อายุประมาณ 10-20 ปี มักมีพันธุ์ลางสาด และ ดูกู ปะปนแทบทุกสวน ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับเจ้าของสวนมากน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับจำนวนต้นที่ปะปนเข้ามา สาเหตุดังกล่าวส่วนหนึ่งอาจเกิดจากความตั้งใจของผู้ขายในการปลอมปนพันธุ์ เนื่องจากความต้องการต้นกล้าพันธุ์จำนวนมาก หรืออาจเกิดจากการผิดพลาดในการผลิตต้นกล้าพันธุ์ การขยายพันธุ์ลองกองเพื่อให้ได้ต้นพันธุ์ที่ตรงตามต้นพันธุ์สามารถทำได้โดยวิธีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (asexual propagation) เช่นการเสียบยอด หรือการทาบกิ่ง โดยใช้ดูกูเป็นต้นตอเพราะลองกองติดเมล็ดน้อย แต่วิธีการดังกล่าวอาจมีข้อเสียตรงที่เกิดรอยแยกของท่อน้ำท่ออาหารบริเวณรอยต่อระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญเติบโต ดังนั้นชาวสวนส่วนหนึ่งยังคงใช้วิธีปลูกโดยการเพาะเมล็ด แต่ยังมีข้อสงสัยว่าเมล็ดลองกองจะให้ต้นกล้าที่ต่างจากต้นแม่หรือไม่ โดยเฉพาะในช่วงหลัง ๆพบว่าลองกองติดเมล็ดมากขึ้นและรสชาติแตกต่างกัน ความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันหรือเกิดจากพันธุกรรมที่ต่างกัน หลายคนเชื่อว่าเมล็ดลองกองจะไม่มีการกลายพันธุ์ อย่างไรก็ตามยังขาดหลักฐานที่ชัดเจน

ในพืชบางชนิดมีการสร้างเมล็ดแต่เมล็ดไม่ได้มาจากการผสมระหว่างไข่และละอองเกสร แต่พัฒนามาจากส่วนเนื้อเยื่อร่างกายบริเวณรอบ ๆถุงเอ็มบริโอ (embryo sac) เช่นนิวเซลลัส (nucellus) หรืออินเทคกูเมนท์ (integument) ดังนั้นต้นกล้าที่พัฒนามาจากเมล็ดดังกล่าวจะมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ เรียกลักษณะดังกล่าวว่าอะโพมิกซีส (apomixis) ซึ่งพบในพืชหลายชนิดเช่น ส้ม (Chin and Roberts, 1980) มะม่วง (Truscott *et al.*,1993) แบล็คเบอรี (Kraft *et al.*, 1996) มันสำปะหลัง (Nassar *et al.*, 1998) เป็นต้น พืชสกุลลางสาดก็เช่นเดียวกัน Bernardo และคณะ(1961) รายงานว่าการเกิดเมล็ดของลางสาด และดูกูเป็นแบบอะโพมิกซีส พืชทั้งสองชนิดไม่มีการสร้างละอองเกสร นอกจากนี้แล้วยังพบว่ามีการสลายตัวของไข่ด้วยเช่นกัน (Prakash *et al.*, 1977) แต่จากการศึกษาของมงคล และคณะ (2543) พบว่าดูกูพื้นเมืองที่พบในภาคใต้ของประเทศไทยบางต้นมีการสร้างละอองเกสรเป็นจำนวนมากและละอองเกสรเหล่านี้มี

ความสามารถในการงอกได้ตามปกติเมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ (อุไรวรรณและคณะม 2543) มีรายงานว่าลักษณะอะโพมิกซีสมักมีความสัมพันธ์กับการที่พืชมีโครโมโซมมากกว่า 2 ชุด (polyploid) (Richards, 1997) ลักษณะบางประการที่พอสังเกตได้สำหรับพืชที่เป็นอะโพมิกซีส เช่น การที่เมล็ดหนึ่งเมล็ดสามารถให้ต้นกล้ามากกว่า 1 ต้นเมื่อนำไปเพาะเรียกลักษณะดังกล่าวว่า โพลีเอ็มบริโอนี (polyembryony) Bernardo และ Ramirez (1959) ศึกษาในลางสาดและรายงานว่าพืชชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซมถึง 8 ชุด เมื่อมีการนำเมล็ดลางสาดและดูกูไปเพาะพบว่า 30% ของเมล็ดดูกูและ 52% ของเมล็ดลางสาดให้ต้นกล้ามากกว่า 1 ต้น (Prakash *et al.*, 1977) เช่นเดียวกับงานทดลองของประพันธ์ (2534) ซึ่งพบลักษณะโพลีเอ็มบริโอนีในลองกอง ดูกู และลางสาดประมาณ 55.8, 12.6 และ 1.2 % ตามลำดับ ในพืชตระกูลส้ม พบว่าต้นกล้าหลายต้นที่พัฒนามาจากเมล็ดเดียวกัน มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกัน เนื่องจากบางต้นพัฒนามาจากเนื้อเยื่อนิวเซลลัสและบางต้นเกิดจากการผสมระหว่างไข่อ่อนและละอองเกสร (Chin and Roberts, 1980) สำหรับลองกอง ยังไม่มีรายงานยืนยันชัดเจนว่าต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดจะมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างหรือเหมือนกับต้นแม่ ดังนั้นการหาข้อสรุปโดยการใช้เครื่องหมายระดับดีเอ็นเอตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยเปรียบเทียบกับต้นแม่จึงเป็นประโยชน์ต่อชาวสวนลองกองเป็นอย่างมากในการให้คำแนะนำเรื่องการขยายพันธุ์ที่ถูกต้อง

การจำแนกความแตกต่างของพันธุ์พืชแต่เดิม มักจะอาศัยลักษณะที่มองเห็นได้ภายนอกเช่น ลักษณะของต้น ใบ ดอก หรือผลซึ่งมีความแตกต่างกันเป็นเกณฑ์ แต่ลักษณะเหล่านี้มีความไม่แน่นอน และปัจจัยสภาพแวดล้อมมีผลกระทบอย่างมากต่อการแสดงออกของลักษณะดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะทางปริมาณ นอกจากนี้แล้วพืชหลายชนิดมีลักษณะต่าง ๆ คล้ายกันมาก เช่น ลองกองกับดูกู ในระยะกล้าหรือต้นที่ยังไม่ให้ผลผลิตหากไม่ใช่ผู้ที่มีความชำนาญแล้วก็ไม่สามารถบอกความแตกต่างได้ จนกว่าจะติดผล ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานานประมาณ 5-6 ปี เทคโนโลยีระดับโมเลกุลซึ่งได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็วในช่วงระยะ 10 ปีที่ผ่านมา นับได้ว่ามีประโยชน์อย่างมากสำหรับการคัดเลือกและตรวจสอบสายพันธุ์พืช สามารถทำได้รวดเร็ว แม้กระทั่งในระยะต้นกล้าซึ่งมีใบเพียง 2-3 ใบ เช่นการใช้ไอโซไซม์ (isozymes) และ อาร์เอฟแอลพี (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในอดีต (Tanksley and Orton, 1983) อย่างไรก็ตาม ทั้งสองวิธีนี้ก็มีข้อจำกัด เช่น การใช้ไอโซไซม์นั้นแม้ว่าวิธีนี้จะง่ายและค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำ แต่ผลที่ได้ก็ยังไม่ค่อยแน่นอน เพราะระยะการเจริญเติบโตของต้นพืช หรือสภาพแวดล้อมจะมีผลต่อการสร้างเอ็นไซม์ในพืช (Adam and Joly, 1980, Toboski and Kemery, 1992, Kuhns and Fretz, 1978) ส่วนอาร์เอฟแอลพีนั้นแม้เทคนิคที่ใช้จะให้ความแม่นยำสูงก็จริง แต่วิธีการค่อนข้างสลับซับซ้อน ใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง ต้องใช้ตัวอย่างพืชเป็นจำนวนมาก และที่สำคัญก็คือเทคนิคดังกล่าวนี้ใช้สารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อมนุษย์และมีผลตกค้างในสภาพแวดล้อม เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA) ซึ่งพัฒนาโดยนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่มคือ Williams และคณะ

(1990) และ Welsh และ McClelland (1990) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่มีผู้นิยมใช้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม และการตรวจสอบความแตกต่างของพันธุ์พืช วิธีการไม่ซับซ้อน ใช้ปริมาณตัวอย่างพืชเพียงเล็กน้อย ทำได้รวดเร็วโดยเฉพาะเมื่อมีตัวอย่างเป็นจำนวนมากและปลอดภัยจากสารกัมมันตภาพรังสี รวมทั้งค่าใช้จ่ายไม่แพงจนเกินไป

อาร์เอพีดี เริ่มต้นด้วยการสกัดดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนพืช แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ อย่างสุ่มด้วยการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction :PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ประมาณ 10 เบสเพียงชนิดเดียว ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการทำอิเล็คโตรโฟริซีส การใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต้นกล้าพันธุ์ลองกอง จะทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง ชัดเจน และรวดเร็วเมื่อเทียบกับการใช้ลักษณะทางสัณฐาน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกองที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยใช้เทคนิคทางอาร์เอพีดี เพื่อเป็นข้อมูลในการแนะนำเกษตรกรเกี่ยวกับเรื่องพันธุ์ และวิธีการในการขยายพันธุ์ลองกองที่ถูกต้อง

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บและการเพาะเมล็ด

ทำการเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์จากต้นลองกองจากสวนเกษตรกร 3 สวน ในเขตจังหวัดปัตตานี 1 สวน และนราธิวาส 2 สวนในแต่ละสวน เลือกต้นลองกองจำนวน 3 ต้น แต่ละต้นสุ่มเก็บเมล็ดให้ได้จำนวน 20 เมล็ด นำเมล็ดทั้งหมดมาเพาะในกระบะทรายที่ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เมื่อต้นกล้ามีใบจริงประมาณ 2 ใบจึงย้ายกล้าลงถุงพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว เมื่อต้นกล้ามีใบจริง 4-5 ใบจึงทำการเก็บตัวอย่างใบจากต้นกล้าเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้สุ่มตัวอย่างใบของต้นกล้าดูกูจำนวน 32 ต้น ซึ่งต้นกล้าทั้งหมดได้จากต้นแม่เดียวกัน (จากภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ) วัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของดูกูเปรียบเทียบกับลองกอง

การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบ

การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการที่ประยุกต์มาจาก Doyle และ Doyle (1990) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ เก็บใบจากต้นกล้าแต่ละต้นน้ำหนักประมาณ 200 มิลลิกรัม (รวมทั้งใบจากต้นแม่ที่ทำการเก็บเมล็ดแต่ละต้นด้วย) ตัดชิ้นส่วนใบเป็นชิ้นเล็กๆใส่ในโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลว แล้วทำการบดจนเป็นผงละเอียด ตักผงใบที่บดละเอียดใส่หลอดเอพเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่จะใช้สกัดดีเอ็นเอ คือสารละลาย CTAB ซึ่งประกอบด้วย PVP-40 1% , EDTA (pH 8.0) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl (pH 8.0) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ

CTAB 2% โดยเติม β-mercaptoethanol 2% และผสมให้เข้ากับบัฟเฟอร์ก่อนที่จะทำการสกัดในแต่ละวัน หลังจากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 60 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา นำไปปั่นตกตะกอนโดยเครื่องเซนตริฟิวจ์ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาเฉพาะสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยสารละลายไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาณ 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้งโดยเครื่องเซนตริฟิวจ์ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนเป็นน้ำทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยอัลกอฮอล์ 70% จำนวน 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและละลายตะกอนดีเอ็นเอในสารละลายบัฟเฟอร์ TE 100 ไมโครลิตร (TE ประกอบด้วย Tris-HCl pH 5.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์) ทำการตรวจสอบปริมาณ DNA จากการประมาณค่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการทำอิเล็คโตรโฟริซีสใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส (SeaKem agarose) 0.7% เปรียบเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้วคือ λ DNA เข้มข้น 80 นาโนกรัม/2 ไมโครลิตร หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ประมาณ 40-60 นาโนกรัม/ ไมโครลิตรซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ของลองกอง (Nualsri and Konlasuk, 2000)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แบบสุ่มโดยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 5 ชนิด (Table 1) สภาพที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ใช้ความเข้มข้นของสารละลายต่าง ๆดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแม่พิมพ์ 40 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ 10X 2 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรท์ 2.5 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.3 ไมโครโมลาร์ เอ็นไซม์ Taq polymerase 1.5 ยูนิต dNTP ชนิดละ 100 ไมโครโมลาร์ อุณหภูมิที่ใช้สำหรับการทำพีซีอาร์ คืออุณหภูมิ 94°ซ 1 นาที 37°ซ 1 นาที 72°ซ 2 นาที จำนวน 39 รอบ ตามด้วย 94 °ซ 1 นาที 37 °ซ 1 นาที และ 72 °ซ 10 นาที จำนวน 1 รอบ

หมายเหตุ การทดสอบโดยการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองทำซ้ำอย่างน้อยจำนวน 2 ครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ตรงกัน

Table 1 List of five primers used for RAPD-PCR of longkong and duku seedlings

Primer	Base sequences 5'..... 3'
OPB-07	GGTGACGCAG
OPC-05	GATGACCGCC
OPC-08	TGGACCGGTA
OPD-01	ACCGCGAAGG
OPD-03	GTCGCCGTGA

การตรวจสอบความแตกต่างของผลผลิตดีเอ็นเอ

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ จากแต่ละตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนทำพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้ว มาทำอิเล็คโตรโฟรีซีสเพื่อแยกความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอนบนอะกาโรส (Nusieve agarose 3:1) 1.25% ภายใต้การให้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงทำการย้อมแผ่นเจล ด้วยสารละลาย
เอธีเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 30 นาที ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ภายใต้เครื่องเรืองแสงอุลตราไวโอเล็ต ทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพโพลาลอยด์ นำภาพถ่ายที่บันทึกแถบของดีเอ็นเอ จากแต่ละต้นทำการศึกษาเปรียบเทียบและแปลผลการทดลอง

ผลและวิจารณ์

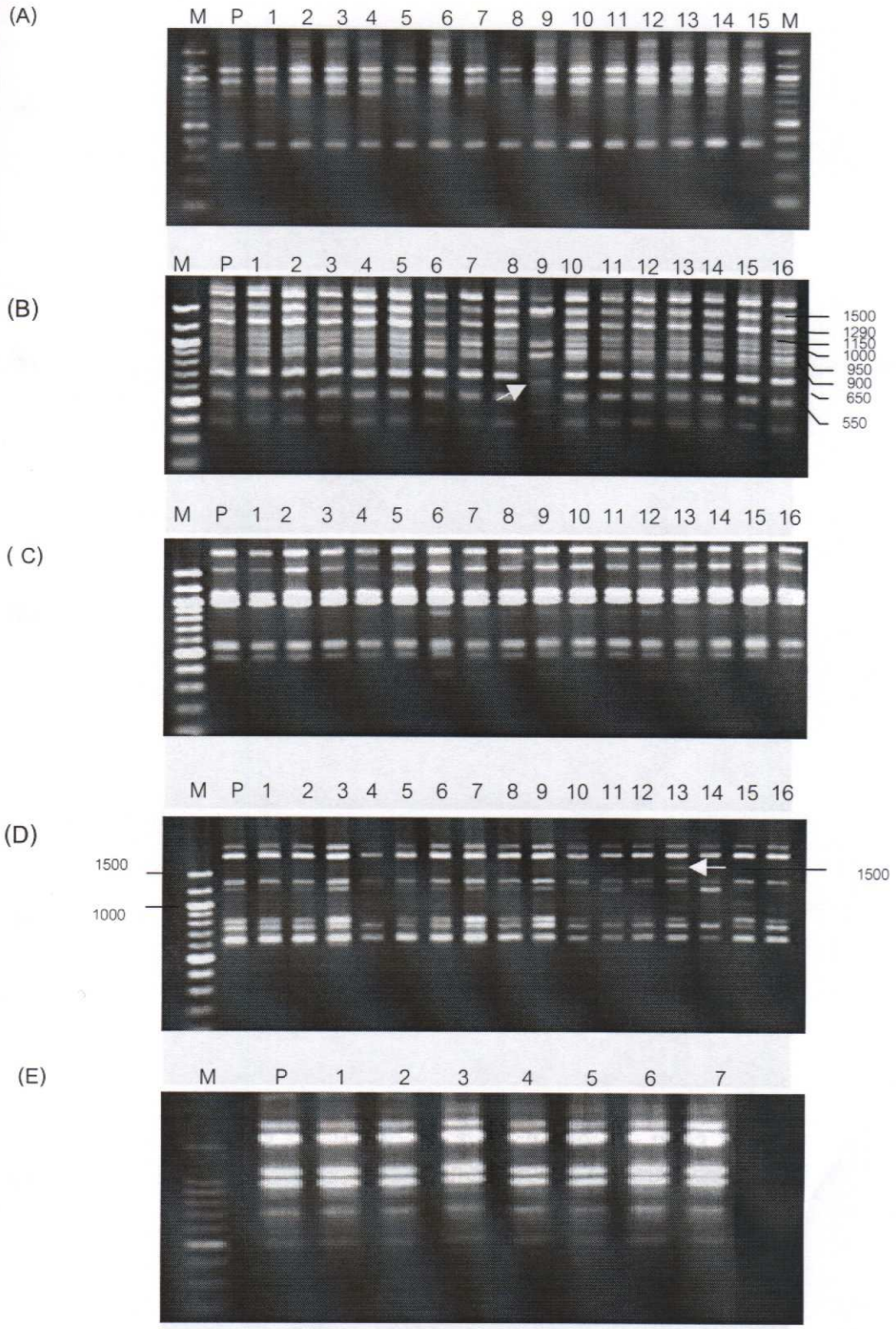
จากการใช้ไพรเมอร์จำนวนทั้งหมด 5 ชนิดคือ OPB-07, OPC-05, OPC-08, OPD-01 และ OPD-03 ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นกล้าลองกองซึ่งได้จากการเพาะเมล็ด พบว่าต้นกล้าเกือบทุกต้นที่เก็บจากต้นแม่ต้นเดียวกันมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน และไม่มีความแตกต่างจากต้นแม่ แสดงว่าต้นกล้ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อยมาก นอกจากนี้ยังพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นกล้าลองกองและต้นแม่ทุกต้นที่สุ่มเก็บตัวอย่างมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบเดียวกันทั้งหมด พบต้นกล้าเพียง 2 ต้นจากเมล็ดที่เก็บจากสวนเกษตรกร อ. รือเสาะ จ. นราธิวาส ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่าง คือต้นกล้าต้นที่ 9 (Figure 1B) เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPC-05 พบว่าต้นกล้าต้นนี้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1290, 1150, 950 และ 550 คู่เบส เช่นเดียวกับต้นแม่และต้นกล้าอื่นๆ แต่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบส (ศรชี้) ปรากฏแทน และเมื่อทดสอบกับไพรเมอร์ OPD-01 พบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในต้นกล้าต้นที่ 13 (Figure 1D)ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 1500 คู่เบส (ศรชี้) ในขณะที่ต้นอื่นๆไม่มีแถบดังกล่าวนี้ อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบกับไพรเมอร์อื่นๆอีก 3 ชนิดไม่พบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สาเหตุของความ

แตกต่างที่เกิดขึ้นยังไม่ทราบแน่ชัดเพราะได้ทดสอบซ้ำสองครั้งด้วยเกรงจะเกิดการปนเปื้อนขณะปฏิบัติงานแต่ผลที่ได้เหมือนเดิม และหากมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นก็น่าจะตรวจพบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไพรเมอร์อื่นๆด้วย ไพรเมอร์ทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการตรวจสอบครั้งนี้เป็นไพรเมอร์ที่ได้มาจากการคัดเลือกจากไพรเมอร์ทั้งสิ้น 100 ชนิดซึ่งไพรเมอร์เหล่านี้ได้รับการตรวจสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพเพียงพอในการใช้แยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาดและดูกู ได้อย่างชัดเจนทั้งในกลุ่มและระหว่างกลุ่มประชากร (สุวิมลและคณะ; In preparation) ซึ่งสามารถเห็นผลอย่างชัดเจนเมื่อใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวกับต้นกล้าดูกู การตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นกล้าดูกูที่ได้จากการเพาะเมล็ด พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นกล้าเหล่านั้นมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด (Figure 2) จากจำนวนต้นกล้าทั้งสิ้น 32 ต้น (จากต้นแม่เดียวกัน) ที่สุ่มมาทำการทดสอบพบความแตกต่างจากต้นแม่ 50, 44.4, 55.5, 53.8 และ 43.3% เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-07, OPC-05, OPC-08, OPD-01 และ OPD-03 ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงว่าประมาณ 49 % ของต้นกล้าดูกูเป็นต้นกล้าไซโกติก (zygotic seedling) ซึ่งเป็นต้นกล้าที่เกิดจากการผสมระหว่างไข่และสเปอร์ม ส่วนที่เหลือเป็นต้นกล้า
นิวเซลลา (nucellar seedling) ที่พัฒนามาจากเนื้อเยื่อนิวเซลลัสเช่นเดียวกับที่พบในพืชสกุลอื่นเช่นส้ม หรือ มะม่วง เป็นต้น (Chin and Roberts, 1980) สำหรับต้นกล้าลองกองจากต้นแม่เดียวกันเกือบทั้งหมดเป็นต้นกล้านิวเซลลา Bernardo และคณะ (1961) รายงานการเกิดลักษณะเดียวกันในลางสาด ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของอุไรวรรณ และคณะ (2543) ซึ่งพบว่าลองกองมีการสร้างละอองเกสรน้อยมากเมื่อเทียบกับดูกูพื้นเมือง นอกจากนี้แล้วละอองเกสรของลองกองทั้งหมดเป็นหมัน แม้สามารถย้อมติดสีบ้างแต่ไม่สามารถงอกได้เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่ดูกูพื้นเมืองสร้างละอองเกสรเป็นจำนวนมากและสามารถงอกได้ประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่ละอองเกสรของดูกูพื้นเมืองสามารถผสมข้ามกับดูกูต้นอื่นๆที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงกันหรือแม้แต่ผสมตัวเอง จึงทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นพืชในกลุ่มดูกู ละอองเกสรของดูกูพื้นเมืองอาจไม่สามารถผสมข้ามกับลองกองได้ หรือแม้สามารถผสมได้แต่ส่วนของตัวเมียในลองกองอาจเป็นหมันเช่นเดียวกับละอองเกสร ดังที่มีรายงานในดูกูบางชนิด (Prakash *et al.*, 1977) ซึ่งเรื่องนี้ยังไม่มีผู้ศึกษาในลองกองมาก่อน อาจมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพื่อความชัดเจนต่อไป สุวิมล (ติดต่อส่วนตัว) ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิดเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกูจากจำนวนตัวอย่างชนิดละ 12 ต้นในแต่ละกลุ่ม โดยสุ่มจากสวนต่างๆในเขตจังหวัดสงขลา ปัตตานี และนราธิวาส พบว่าลองกองทั้งหมดมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน ส่วนลางสาดและดูกูนั้นหลายต้นให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรลางสาดและดูกู สนับสนุนผลการทดลองครั้งนี้ที่พบว่าระดับของการเกิดเมล็ดแบบอะโพมิกซีสในลองกองสูงกว่าดูกู เช่นเดียวกับงานทดลองในกลุ่มประชากรแบล็คเบอรี (*Rubus nessensis*) ซึ่งเป็นพืชที่มีลักษณะอะโพมิกซีสและมีจำนวนโครโมโซม 4 ชุด พบว่าทั้งหมดมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันในขณะที่ *R. pensilvanicus* ซึ่งมีลักษณะอะโพมิกซีสเช่นกัน แต่ในประชากรกลุ่มนี้หลาย

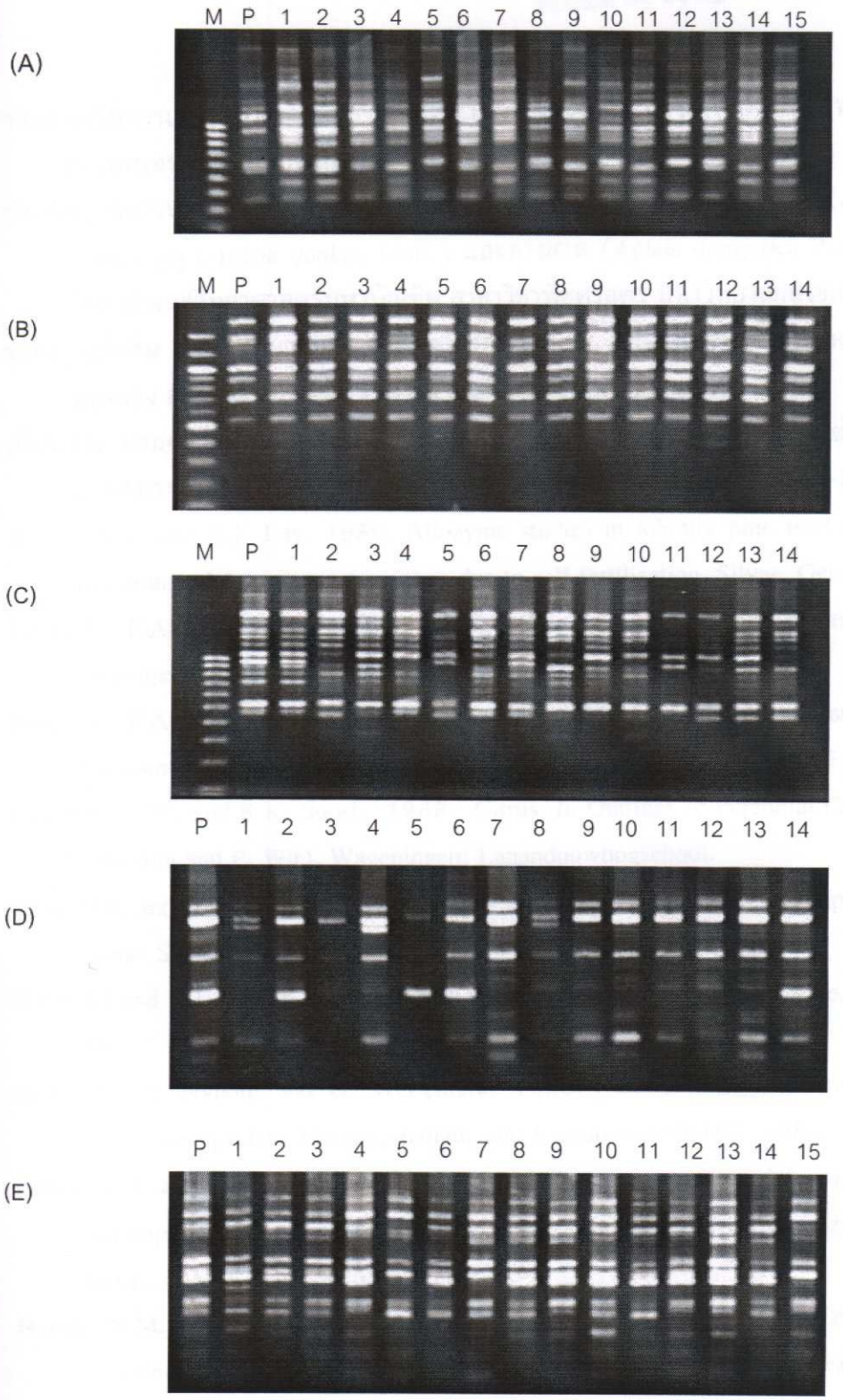
ต้นให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างจากต้นอื่น ๆ สันนิษฐานว่าเกิดมาจากการผสมข้ามที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ (Nybom and Schaal,1990) นอกจากนี้ในพืชตระกูลส้มพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นกล้าไซโกติกจะมีความแปรปรวนระหว่างผล หรือขึ้นอยู่กับพันธุ์ ละอองเกสรจากต้นพันธุ์ที่ต่างกันมีผลต่อการสร้างต้นกล้าไซโกติก เช่นในพันธุ์ Rough lemon เมื่อทำการช่วยผสมเกสรโดยใช้ละอองเกสรจากต้นเดียวกันพบว่าต้นกล้าทั้งหมดเป็นต้นกล้านิวเซลลา แต่เมื่อใช้ละอองเกสรจาก *Poncirus trifoliata* จะให้ต้นกล้าไซโกติกประมาณ 46% ในบางพันธุ์ที่ให้ต้นกล้านิวเซลลาทั้งหมด เพราะเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมมีความอ่อนแอและไม่สามารถพัฒนาได้ (Cameron และ Soost, 1969).

สรุป

จากผลการทดลองศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกองที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าต้นกล้าและต้นแม่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันเกือบทั้งหมดคือพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อยมาก สรุปได้ว่าการขยายพันธุ์ลองกองเพื่อให้ได้ต้นตรงตามพันธุ์สามารถทำได้โดยการเพาะเมล็ดโดยตรง ดังนั้นความแตกต่างของลักษณะต่าง ๆที่มักพบเสมอในสวนลองกองเช่น ความหนาของเปลือก รสชาติ การเกิดมีเมล็ดมากกว่าปกติ น่าจะเกิดจากผลของสภาพแวดล้อมมากกว่าลักษณะทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตามในกระบวนการวิวัฒนาการของพืช การเกิดการกลายพันธุ์ในธรรมชาติ สามารถเกิดขึ้นได้เสมอซึ่งเป็นอาจเป็นสาเหตุในการทำให้เกิดพันธุ์พืชใหม่ในระยะต่อมา



Fiqure 1. RAPD products from longkong seedlings and their maternal parent obtained from primers OPB-07 (A), OPC-05 (B), OPC-08 (C), OPD-01 (D) and OPD-03 (E). M is 100 bp Ladder DNA .P is a maternal parent.



Fiqure 2. RAPD products from duku seedlings and their maternal parent obtained from primers OPB-07 (A), OPC-05 (B), OPC-08 (C), OPD-01 (D) and OPD-03 (E) . M is 100 bp Ladder DNA. P is a maternal parent.

Central Library
Prince of Songkla Univ.

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2542. สถิติการปลูกไม้ผล ไม้ยืนต้น. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

ประพันธุ์ อรรจนกุล. 2534. การศึกษาสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบของลองกอง (*Aglaia dookoo* Griff.) ดูกู (*Aglaia dookoo* Griff.) และลางสาด (*Aglaia domestica* Pelleg.). สงขลา : วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มงคล แซ่หลิม จรัสศรี นวลศรี และอุไรวรรณ นามศรี. 2543.ความมีชีวิตของละอองเรณูของลองกอง ลางสาด และ ดูกู. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22:35-41.

อุไรวรรณ นามศรี มงคล แซ่หลิม และจรัสศรี นวลศรี. 2543. ปัจจัยที่มีผลต่อความงอกของละอองเรณูดูกู (*Aglaia dookoo* Griff.). ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22:43-50.

Adam, W.T. and R.J. Joly. 1980. Allozyme studies in loblolly pine seed orchards clonal variation and frequency of progeny due to self fertilization. Silvae. Genet. 29:1-4.

Bernardo, F.A. and D.A. Ramirez. 1959. Cytology of Philippine plants. III. *Lansium domesticum* Correa. The Philippine agriculturist 43:375-377.

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

Cameron, J. W. and R.K. Soost. 1969. Citrus. *In* Outlines of Perennial Crops. (eds. F.P. Ferwerda and F. Wit). Wageningen: Lanandouwhogschool.

Chin, H.F. and E.H. Roberts. 1980. Recalcitrant Crop Seeds. Kuala Lumpur: Art Printing Works SDN.BHD.

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

Kraft, T., H. Nybom and G. Werlemark. 1996. DNA fingerprint variation in some blackberry species. Plant Systematic and Evolution 199:103-108.

Kuhns, L.J. and T.A. Fretz. 1978. Distinguishing rose cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis. I. Extraction and storage of protein and active enzymes from rose leaves. J. Mol. Biol. 80:515-519.

Nassar, N.M.A., M.A. Vieira, C. Viera and D. Grattapaglia. 1998. A molecular and embryonic study of apomixis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Euphytica 102:9-13.

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

Nybom, H. and Schaal, B.A. 1990. DNA fingerprints reveal genotypic distributions in natural populations of blackberries and raspberries (*Rubus*, Rosaceae) Amer. J. Bot. 77:883-888.

Prakash, N., A.L. Lim and R. Manurung. 1977. Embryology of duku and langsat varieties of *Lansium domesticum* Corr. Phytomorphology 3:50-59.

Richards, A.J. 1997. Plant Breeding Systems. 2nd. London: Chapman & Hall.

Tanksley, S.D. and T.J. Orton. 1983. Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Amsterdam : Elsevier Co. .

Toboski, J.J. and R.D. Kemery. 1992. Identification of red maple cultivars by isozyme analysis. HortScience 27:169-171.

Truscott, M., C. human and G.J. Visser. 1993. Frequency of zygotic seedlings from polyembryonic mango rootstocks. J. Southern Afri. Soc. Hort. Sci. B:2

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

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