บทที่ 1

การศึกษาพันธุ์สะตอโดยอาศัยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

Identification of *Parkia speciosa* Hassk. Based on DNA Markers

รศ.ดร. จรัสศรี นวลศรี ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

หลักการและเหตุผล

สะตอ (*Parkia speciosa* Hassk.) เป็นพืชตระกูลถั่ว อยู่ในวงศ์ Mimosaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในคาบสมุทรมาลายา ซึ่งเป็นแถบพื้นที่ภาคใต้ของไทยและมาเลเซียตลอดไปจนถึงหมู่เกาะต่างๆ ของประเทศอินโดนีเซีย (Nielsen, 1985) และพม่า (Jensen, 1995) สะตอเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่ง เห็นได้จากปัจจุบันมีผู้นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ และมีการส่งออกผลผลิตไปยังต่างประเทศ ในอดีตผลผลิตสะตอได้จากการเก็บจากต้นที่ขึ้นอยู่ในป่า แต่เมื่อพื้นที่ป่าลดลงการเก็บผลผลิตสะตอจากป่าเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาดและการบริโภค จึงมีการนำสะตอมาปลูกเป็นระบบสวน หรือปลูกแซมกับพืชอื่นๆ ปัจจุบันพบว่า สะตอไม่ได้ปลูกเฉพาะภาคใต้เพียงแห่งเดียว ภาคตะวันออกแถบจังหวัดจันทบุรีก็ได้นำสะตอไปปลูกเป็นจำนวนมาก และมีแนวโน้มว่าในอนาคตจะมีผู้สนใจทำสวนสะตอเป็นอาชีพมากขึ้น กรมส่งเสริมการเกษตร (2538) อ้างโดย จารุ (2541) รายงานว่า ภาคใต้มีพื้นที่ปลูกสะตอจำนวน 135,031 ไร่ แหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ จังหวัดชุมพร ระนอง และนครศรีธรรมราช แหล่งปลูกภาคอื่นๆ เช่น ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี และตราด สะตอที่นิยมปลูกเพื่อบริโภค และพบเห็นวางขายตามท้องตลาด มี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มสะตอข้าว และสะตอดาน ผลผลิตของสะตอทั้งสองสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายประเภท ทั้งสามารถเก็บไว้บริโภคนอกฤดูกาลในรูปของสะตอดอง (สมพร, 2534) ปัจจุบันพบว่าสะตอในธรรมชาติมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง ไม่ว่าจะเป็นช่วงระยะเวลาในการออกดอก ติดฝัก ลักษณะของฝัก และเมล็ด มีความแตกต่างกันหลายแบบ ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นนี้ ส่งผลต่อจำนวนผลผลิต คุณภาพ และราคา สิ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในด้านความต้องการของตลาดและผู้บริโภค สาเหตุสำคัญเนื่องมาจากสะตอเป็นพืชผสมข้าม (จารุ, 2541) การผสมข้ามระหว่างต้นพืช สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งชนิดเดียวกัน หรือเป็นการผสมข้ามระหว่างชนิดก็อาจเกิดขึ้นได้เช่นกัน ดังนั้นเมื่อมีการปลูกด้วยเมล็ด จึงส่งผลให้เกิดความแปรปรวนในธรรมชาติ ซึ่งการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาระบุเอกลักษณ์ของพันธุ์สะตอทำได้ยากขึ้น จึงมีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ

ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องมือที่ให้ประสิทธิภาพสูงในการศึกษาวิเคราะห์พันธุกรรมและความสัมพันธ์ของพืชภายในกลุ่ม และระหว่างกลุ่มประชากรได้ชัดเจน เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคหนึ่งทางชีวโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์พันธุกรรมและความสัมพันธ์ในพืชได้ดี ไม่ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตสภาพแวดล้อม (สุรินทร์, 2536) มีข้อได้เปรียบกว่าเทคนิคอื่นทางชีวโมเลกุล คือ เป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็ว ไม่ซับซ้อน ใช้ปริมาณตัวอย่างเพียงเล็กน้อย รวมทั้งค่าใช้จ่ายไม่แพงจนเกินไป (จรัสศรี และคณะ 2543) เทคนิคอาร์เอพีดี เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยอาศัยพื้นฐานมาจากเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ไพรเมอร์ที่ใช้เพียงชนิดเดียวขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนการทำพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอ บริเวณใด การตรวจสอบความแตกต่าง (polymorphism) จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ โดยการแยกปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (William *et al*, 1990) ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสามารถนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อดูความสัมพันธ์หรือความแตกต่างทางพันธุกรรม ทำให้ทราบความสัมพันธ์และทราบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพืชที่อยู่ในพันธุ์และชนิดเดียวกันได้ การศึกษาพันธุ์สะตอโดยอาศัยเครื่องหมายดีเอ็นเอ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพันธุ์และลักษณะประจำพันธุ์สะตอโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา และเพื่อศึกษาพันธุกรรมของสะตอโดยอาศัยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

วิธีการวิจัย

1. ศึกษาความแตกต่างระหว่างสะตอข้าว และสะตอดาน โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการเก็บตัวอย่างสะตอข้าว และสะตอดาน จากแหล่งปลูกต่างๆ คือ ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง อำเภอ สิเกา จังหวัดตรัง สวนเกษตรกรในเขต จังหวัดสงขลา และ จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวนทั้งหมด 88 ตัวอย่าง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบอ่อน แยกต้น และกลุ่ม ต้นที่เก็บตัวอย่าง ทำการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังต่อไปนี้

- ลักษณะต้น และใบ
- ลักษณะดอก และช่อดอก
- ลักษณะฝัก และขนาดฝัก
- ลักษณะเมล็ด และขนาดเมล็ด

2. ทำการศึกษาพันธุกรรมของสะตอโดยอาศัยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1990) โดยบดตัวอย่างใบสะตอข้าว และสะตอดานใน CTAB buffer (PVP-40, NaCl, EDTA 0.5 M pH 8.0, CTAB 2%) ร่วมกับ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2% บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เติมคลอโรฟอร์ม และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล เข้มข้น 70% ทิ้งให้แห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 70 ไมโครลิตร [Tris-HCl (pH 7.5) 10 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA (pH 7.0) 1 มิลลิโมลาร์] เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

2.2 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ ดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรส (LE Agarose; Promega, USA) เข้มข้น 0.7% แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 M, pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม โดยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ในเบื้องต้น จำนวน 180 ไพรเมอร์ (OPA01-20, OPB01-20, OPC01-20, OPD01-20, OPT01-20, OPR01-20, OPAA01-20, OPAB01-20 และOPZ01-20: Operon, USA) ในเบื้องต้นทำการเก็บตัวอย่างสะตอข้าวและสะตอดาน อย่างละ 1 ต้น จากบริเวณเขตจังหวัดสงขลา มาเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มในการคัดเลือกไพรเมอร์ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ สภาพที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ใช้ความเข้มข้นของสารละลายต่างๆ ดังนี้ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เข้มข้น 1.5 ยูนิต 10X *Taq* บัฟเฟอร์ 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTP เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ตั้งอุณหภูมิเป็น 3 ระดับ คือ อุณหภูมิที่ใช้เริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 37 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวนทั้งสิ้น 41 รอบ และรอบสุดท้ายตามด้วย 72 องศาเซลเซียส อีก 5 นาที หลังทำพีซีอาร์ นำสารละลายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว จำนวน 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้น LE อะกาโรส ที่มีความเข้มข้น 1.5% ละลายใน TBE buffer (Tris Base, Boric acid, Na_2EDTA 0.5 โมลาร์; pH 8.0)

ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ 60 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างน้ำ 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณและให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวแทนประชากรแต่ละกลุ่ม

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ มาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของประชากรทั้งหมด คัดเลือกไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างประชากรทั้งหมด ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้ โดยแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นแบบ Binary คือ ให้ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ มีค่าเท่ากับ 1 และตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 0 เปรียบเทียบ ณ ตำแหน่งเดียวกัน โดยคิดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจน วิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการใช้ UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) cluster analysis หาค่า Similarity coefficient ตามวิธีของ Jaccard (1908) กับโปรแกรม NTSYS pc-2.1 (Rohlf, 2002)

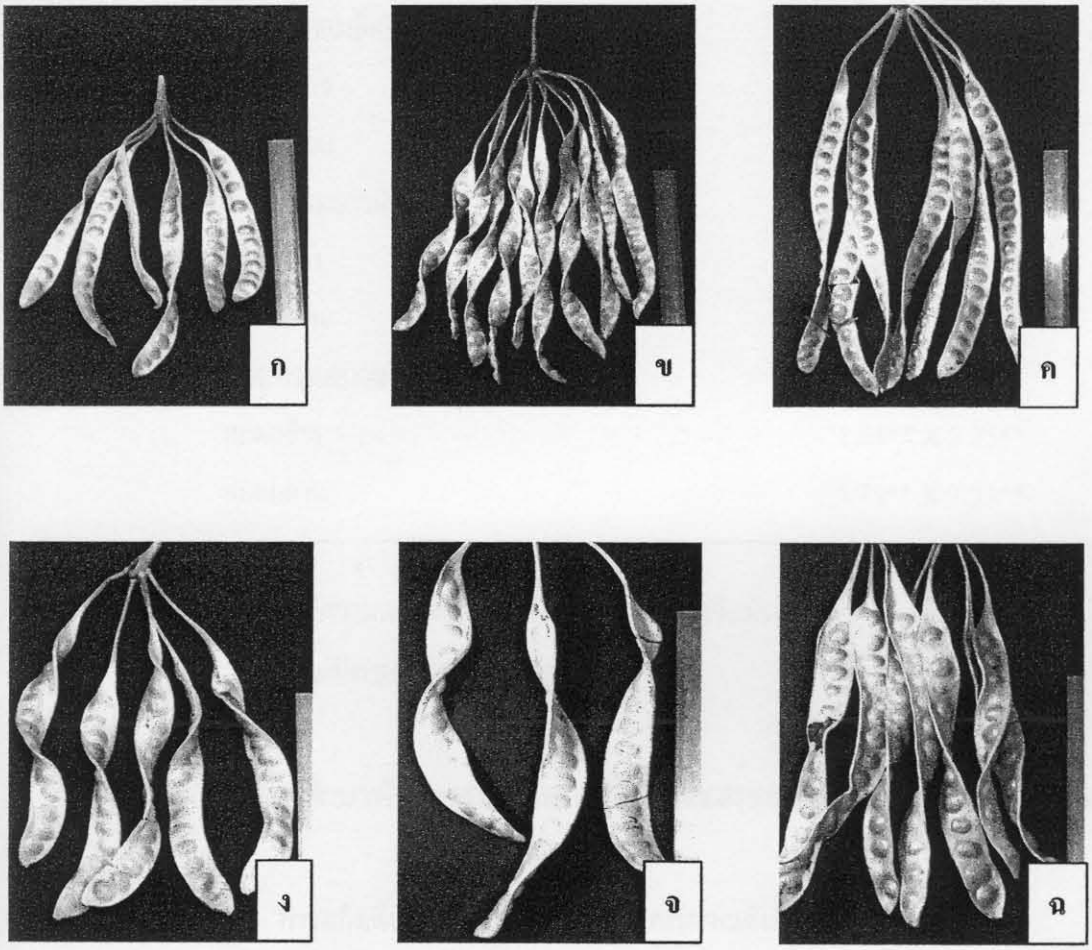
ผลการวิจัย

1. การศึกษาความแตกต่างระหว่างสะตอข้าว และสะตอดาน โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลจากการศึกษาข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของสะตอข้าว และสะตอดาน จากแหล่งเก็บต่างๆ พบว่า ลักษณะต้นและใบ ลักษณะดอกและช่อดอก ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ เนื่องจากมีลักษณะใกล้เคียงกันมาก

ลักษณะฝักและเมล็ด เป็นลักษณะเดียวที่เคยใช้แยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มสะตอข้าว และสะตอดาน แต่ปัจจุบันพบว่า การใช้ลักษณะดังกล่าวในการแยกกลุ่มสะตอทั้ง 2 กลุ่ม ทำได้ยากขึ้น เนื่องจากสะตอข้าว และสะตอดาน เป็นลูกผสมแบบเปิดตามธรรมชาติ ส่งผลให้ลักษณะฝักและเมล็ดของแต่ละกลุ่ม มีความแปรปรวนและความหลากหลายสูง จากการศึกษาสะตอ จำนวน 88 ต้น พบว่า ลักษณะฝักและเมล็ด ส่วนใหญ่มีลักษณะที่ก้ำกึ่งกันของลักษณะสะตอข้าว และสะตอดาน ไม่มีความแตกต่างชัดเจน ดังที่มีผู้รายงานไว้ ดังนั้นทำการคัดเลือกลักษณะฝัก และเมล็ด ที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างกันค่อนข้างมากระหว่างสะตอข้าว และสะตอดาน คือ ความยาวฝัก ขนาดเมล็ด เป็นต้น โดยทำการคัดเลือกจากตัวอย่างที่นำมาศึกษาในครั้งแรก จากศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง สวนเกษตรกร ตำบลทุ่งตำเสา อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และสวนเกษตรกรในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี คัดเลือกมา จำนวน

12 ต้น และเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจาก ตำบลควนมีด อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา อีก 19 ต้น รวมจำนวนทั้งหมด 31 ต้น (ภาพที่ 1) ทำการบันทึกลักษณะดังนี้ คือ จำนวนฝักต่อช่อ จำนวนเมล็ดต่อฝัก ความกว้างฝัก ความยาวฝัก และเมล็ด จากนั้นนำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มประชากร (T-Test) โดยใช้โปรแกรม SAS (วัชรินทร์, 2545) พบว่า ลักษณะของจำนวนฝักต่อช่อ จำนวนเมล็ดต่อฝัก ความยาวฝักของสะตอ จำนวน 31 ต้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนลักษณะความกว้างฝัก เมล็ด และความยาวเมล็ด พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 1 ลักษณะฝักของสะตอข้าว (ก-ค) และสะตอดาน (ง-ฉ) จากการคัดเลือกลักษณะฝัก ที่เห็นลักษณะภายนอกแตกต่างกันชัดเจน

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนฝักต่อซ่อ จำนวนเมล็ดต่อฝัก ความกว้าง – ความยาวฝัก และเมล็ดของสะตอข้าว และสะตอดาน จำนวน 31 ต้น วิเคราะห์โดยโปรแกรม SAS

ลักษณะ	ค่าเฉลี่ย
จำนวนฝักต่อซ่อ(ฝัก)	
สะตอข้าว	7.37^{ns}
สะตอดาน	7.00^{ns}
จำนวนเมล็ดต่อฝัก(เมล็ด)	
สะตอข้าว	13.07^{ns}
สะตอดาน	13.46^{ns}
ความกว้าง X ความยาวฝัก(ซม.)	
สะตอข้าว	3.50** X 46.10^{ns}
สะตอดาน	4.30** X 48.40^{ns}
ความกว้าง X ความยาวเมล็ด(ซม.)	
สะตอข้าว	1.54** X 2.25**
สะตอดาน	1.79** X 2.53**

หมายเหตุ ** = มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

2. การศึกษาพันธุกรรมของสะตอข้าว และสะตอดาน โดยอาศัยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

2.1 การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบสะตอข้าว และสะตอดาน โดยบดตัวอย่างร่วมกับสารละลาย CTAB พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ครั้งละประมาณ 2 – 3 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัม ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดีเพียงพอสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

2.2 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างสะตอข้าว และสะตอดาน โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ทำการทดสอบไพรเมอร์เบื้องต้น จำนวน 180 ไพรเมอร์ เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างสะตอข้าว และสะตอดาน จำนวน 69 ต้น ผลการทดลองพบว่า มีไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ จำนวน 91 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน จำนวน 26 ไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ไม่ให้แถบดีเอ็นเอเลย จำนวน 16 ไพรเมอร์ และจำนวน 47 ไพรเมอร์ ที่ให้ผลไม่ชัดเจน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการคัดเลือกไพรเมอร์เบื้องต้น จำนวน 180 ไพรเมอร์

DNA patterns	**No. of primers**	**(%)**
Polymorphic	91	50.56
Monomorphic	26	14.44
Not clear	47	26.11
Non amplified	16	8.89
Total	**180**	

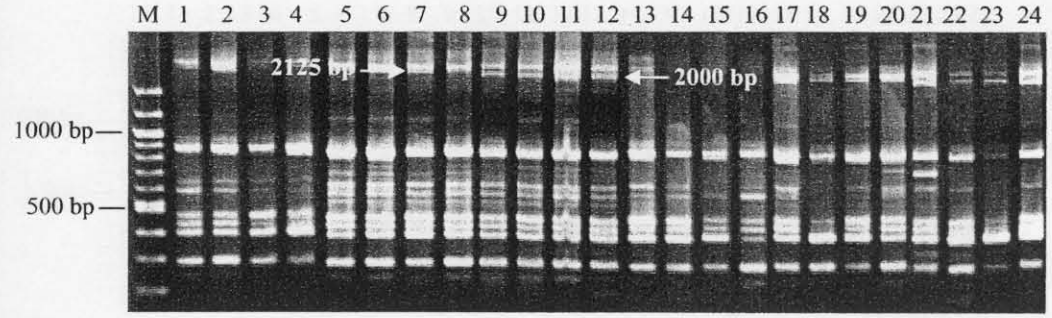
จากจำนวนไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเบื้องต้น ทั้งหมด 91 ไพรเมอร์ นำมาทดสอบรอบที่สอง เพื่อคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่ให้ผลชัดเจนที่สุด โดยเพิ่มตัวอย่างกลุ่มสะตอข้าว และสะตอดาน อย่างละ 4 ต้น จากแหล่งเก็บสองแหล่ง คือ ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จังหวัดตรัง และบริเวณเขตจังหวัดสงขลา จากจำนวน 91 ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลชัดเจนที่สุด จำนวน 8 ไพรเมอร์ คือ OPB – 04, OPB – 17, OPB – 18, OPC – 02, OPR – 01, OPR – 02 , OPT – 01 และ OPAB – 03 นำมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกลุ่มสะตอข้าว และสะตอดาน จำนวน 69 ต้น พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 112 แถบ เฉลี่ย 14 แถบต่อไพรเมอร์ ในจำนวนนี้มี 77 แถบ (68.75 เปอร์เซ็นต์) เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน และอีก 35 แถบ (31.25 เปอร์เซ็นต์) เป็นแถบที่ไม่มีความแตกต่างกัน ไพรเมอร์ OPT – 01 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด 19 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง จำนวน 14 แถบ หรือคิดเป็น 73.68 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ OPR – 02 มีจำนวนแถบ ดีเอ็นเอน้อยที่สุด เท่ากับ 9 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 5 แถบ นอกจากนี้พบว่าไพรเมอร์ OPB – 18 ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันน้อยสุด คิดเป็น 50.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงชนิดของไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในสะตอข้าวและสะตอดาน จำนวน 69 ตัวอย่าง

Primer	Sequence (5'->3')	Amplified fragments	Monomorphic fragments	Polymorphic fragments
OPB-04	GGACTGGAGT	15	4	11
OPB-17	AGGGAACGAG	16	5	11
OPB-18	CCACAGCAGT	12	6	6
OPC-02	GTGAGGCGTC	13	5	8
OPR-01	TGCGGGTCCT	16	4	12
OPR-02	CACAGCTGCC	9	4	5
OPT-01	GGGCCACTCA	19	5	14
OPAB-03	TGGCGCACAC	12	2	10
Total		**112**	**35**	**77**
Polymorphic (%)		-	-	**68.75**

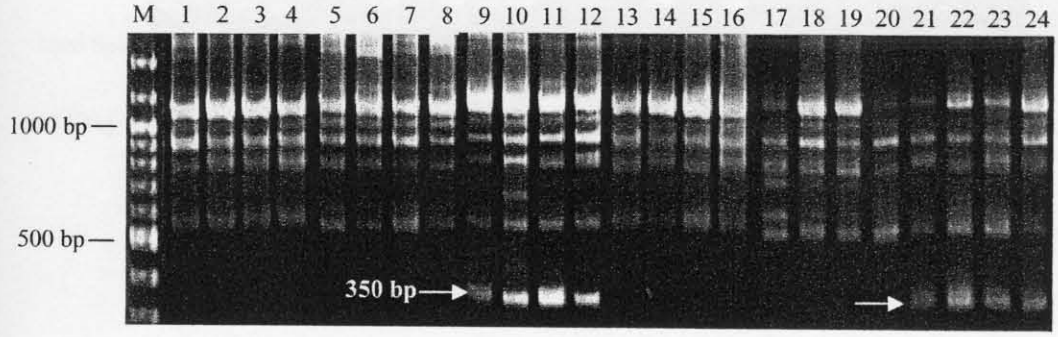
2.3 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอาร์เอพีดี – พีซีอาร์

ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอาร์เอพีดี – พีซีอาร์กับไพรเมอร์จำนวน 8 ไพรเมอร์ จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ พบว่า ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับสะตอข้าวหรือสะตอดาน (ภาพที่ 2-4) แต่เมื่อนำแหล่งที่เก็บในแต่ละจังหวัด ได้แก่ จังหวัดตรัง สงขลา และสุราษฎร์ธานี มาวิเคราะห์ร่วมด้วย พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับแหล่งที่เก็บดังนี้ คือ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2000 คู่เบส จากไพรเมอร์ OPB – 17 และ 350 คู่เบส จากไพรเมอร์ OPR – 02 ที่พบเฉพาะในสะตอข้าว และสะตอดาน จากแหล่งเก็บจังหวัดสงขลา และแถบดีเอ็นเอขนาด 2125 คู่เบส จากไพรเมอร์ OPB – 17 และ 600 คู่เบส จากไพรเมอร์ OPR – 01 ที่พบในสะตอข้าวและสะตอดาน จากแหล่งเก็บจังหวัดตรังและสุราษฎร์ธานี (ภาพที่ 2) เนื่องจากสะตอข้าวและสะตอดานที่เป็นตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ บางตัวอย่างมีลักษณะก้ำกึ่ง จึงเลือกสะตอข้าว และสะตอดาน ที่มีความแตกต่างของลักษณะสัณฐานฝักและเมล็ดชัดเจน จำนวน 31 ต้น มาวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างต้น แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะหรือสามารถใช้แยกสะตอทั้งสองกลุ่มออกจากกันได้ (ภาพที่ 5-7)



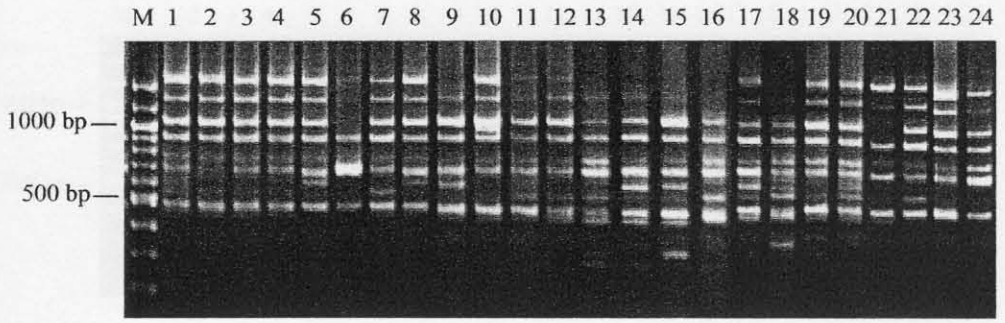
ก

ข

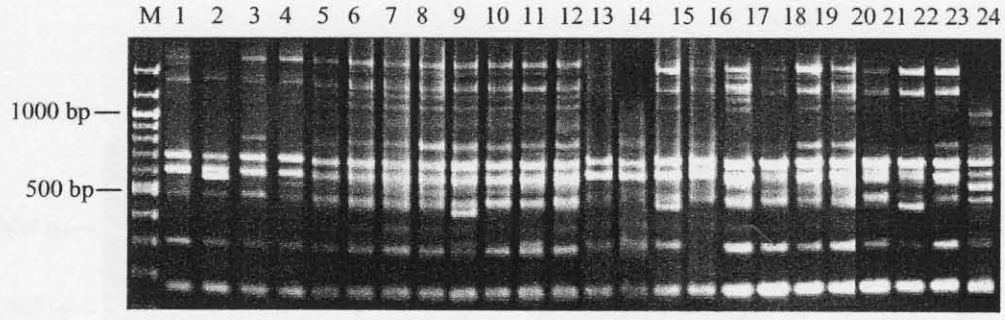


ค

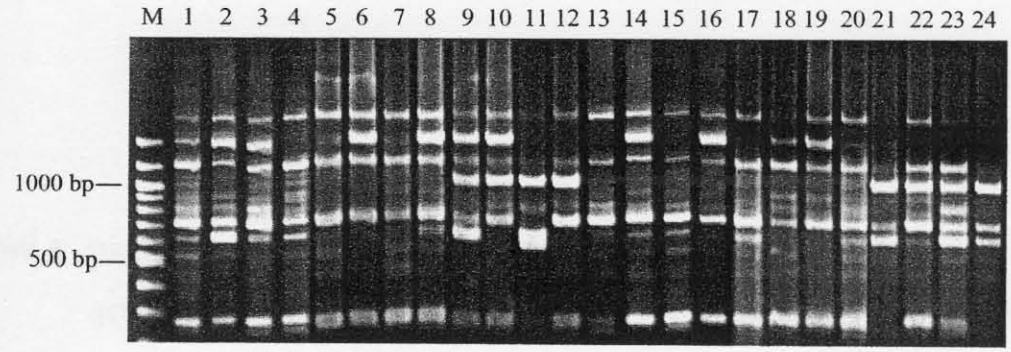
ภาพที่ 2 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างสะตอข้าว และสะตอดาน จากแหล่งเก็บในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี (lanes 1-4; 13-16) ตรัง (lanes 5-8; 17-20) และสงขลา (lanes 9-12; 21 -24) จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-17 (ก) OPR-01 (ข) และ OPR-02 (ค) M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



ก

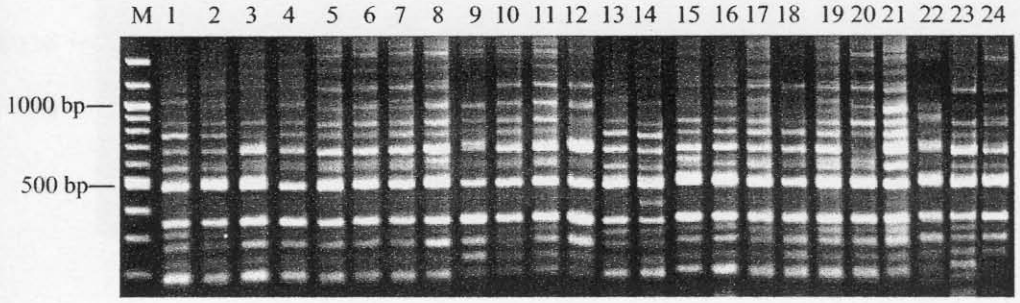


ข

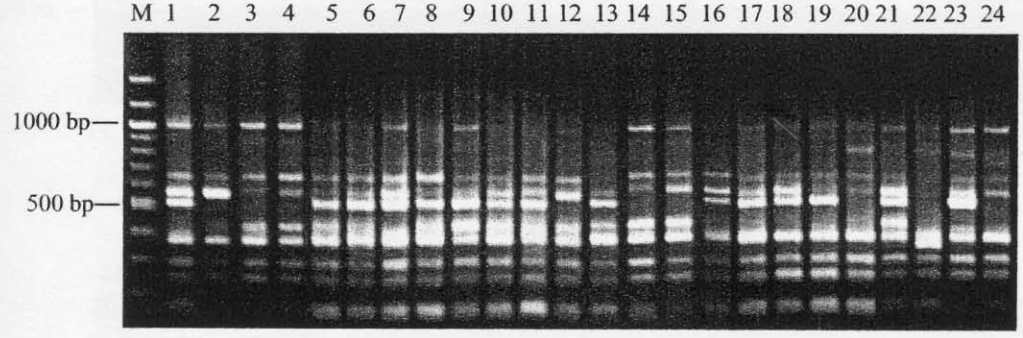


ค

ภาพที่ 3 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างสะตอข้าว และสะตอดาน จากแหล่งเก็บในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี (lanes 1-4; 13-16) ตรัง (lanes 5-8; 17-20) และสงขลา (lanes 9-12; 21 -24) จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAB-03 (ก) OPB-18 (ข) และ OPB-04 (ค) M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

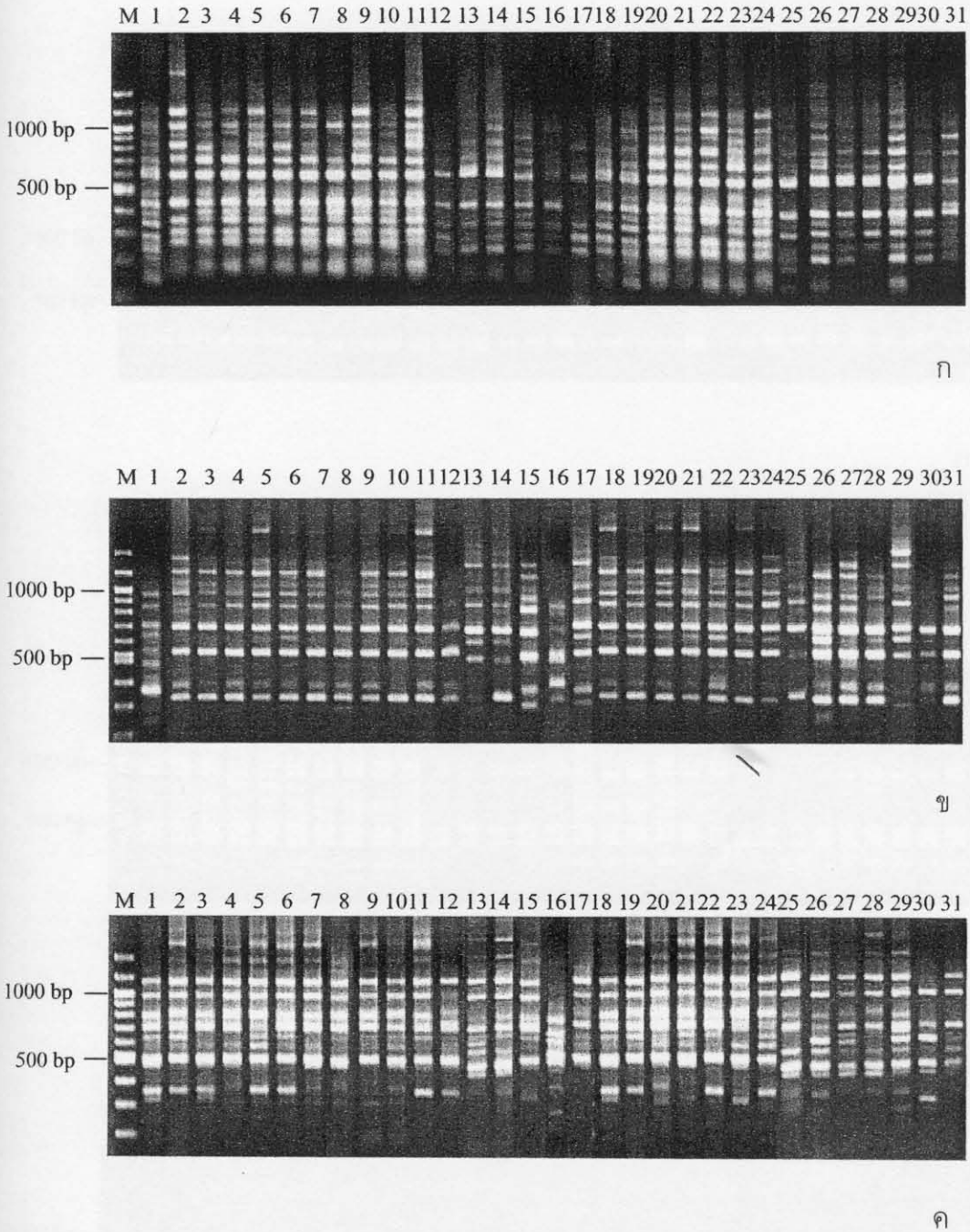


ก

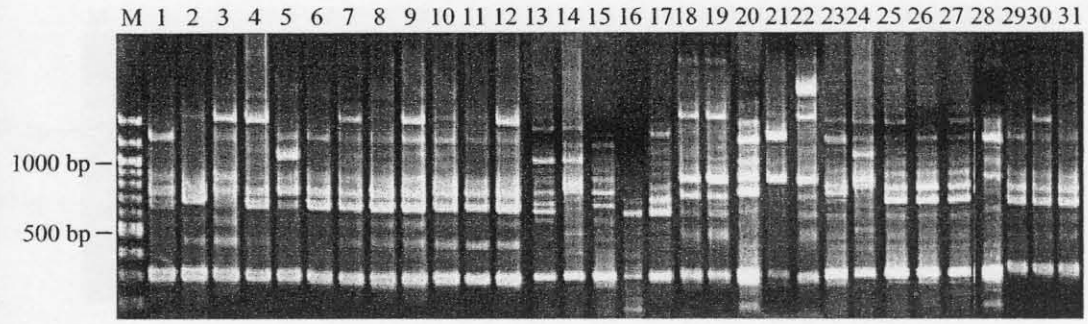


ข

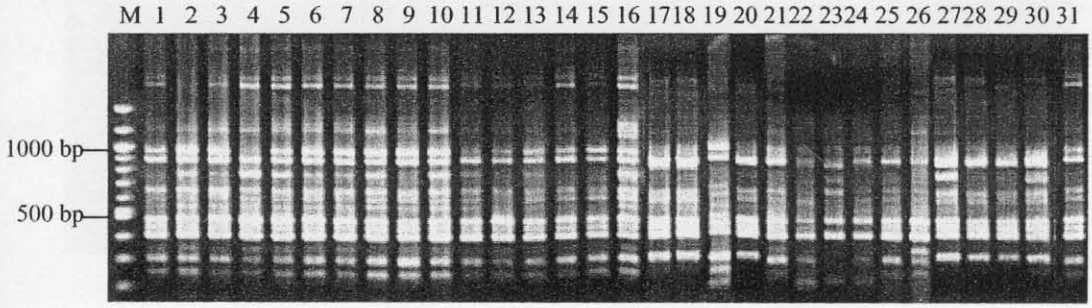
ภาพที่ 4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างสะตอข้าว และสะตอดาน จากแหล่งเก็บในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี (lanes 1-4; 13-16) ตรัง (lanes 5-8; 17-20) และสงขลา (lanes 9-12; 21 -24) จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPT-01 (ก) และ OPC-02 (ข) M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



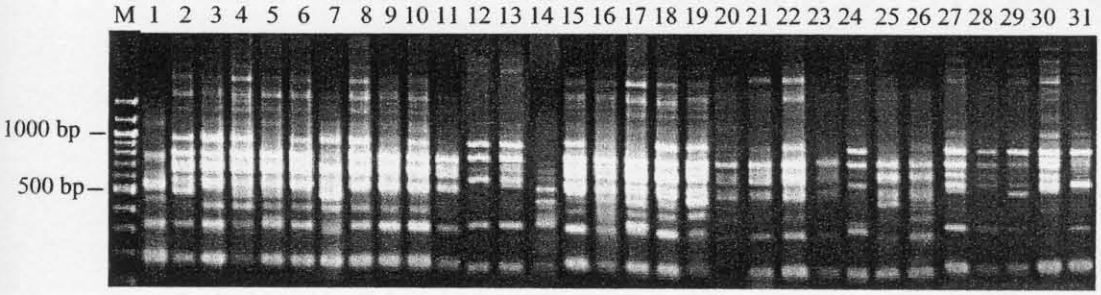
ภาพที่ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในสะตอข้าว (lanes 1-19) และสะตอดาน (lanes 20-31) ที่คัดเลือกลักษณะที่แตกต่างชัดเจนของฝักจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPT-01 (ก) OPR-01 (ข) และ OPAB-03 (ค) M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



ก

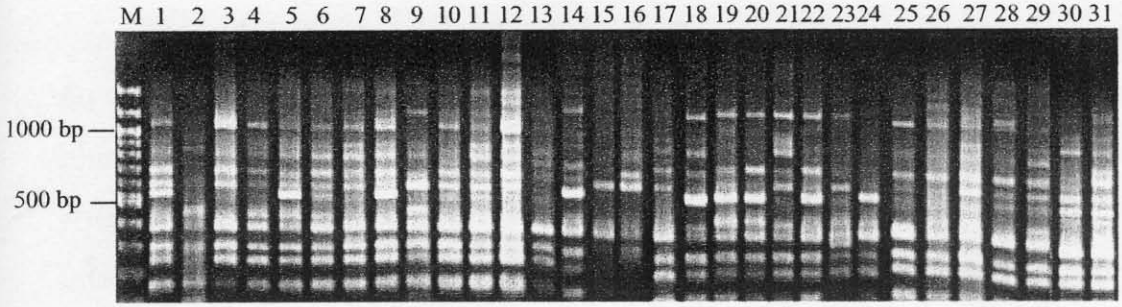


ข

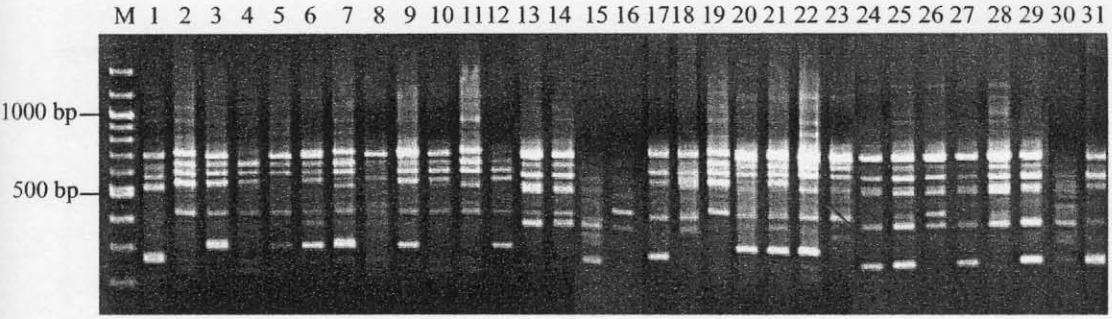


ค

ภาพที่ 6 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในสะตอข้าว (lanes 1-19) และสะตอดาน (lanes 20-31) ที่คัดเลือกลักษณะที่แตกต่างชัดเจนของฝัก จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-04 (ก) OPB-17 (ข) และ OPB-18 (ค) M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



ก



ข

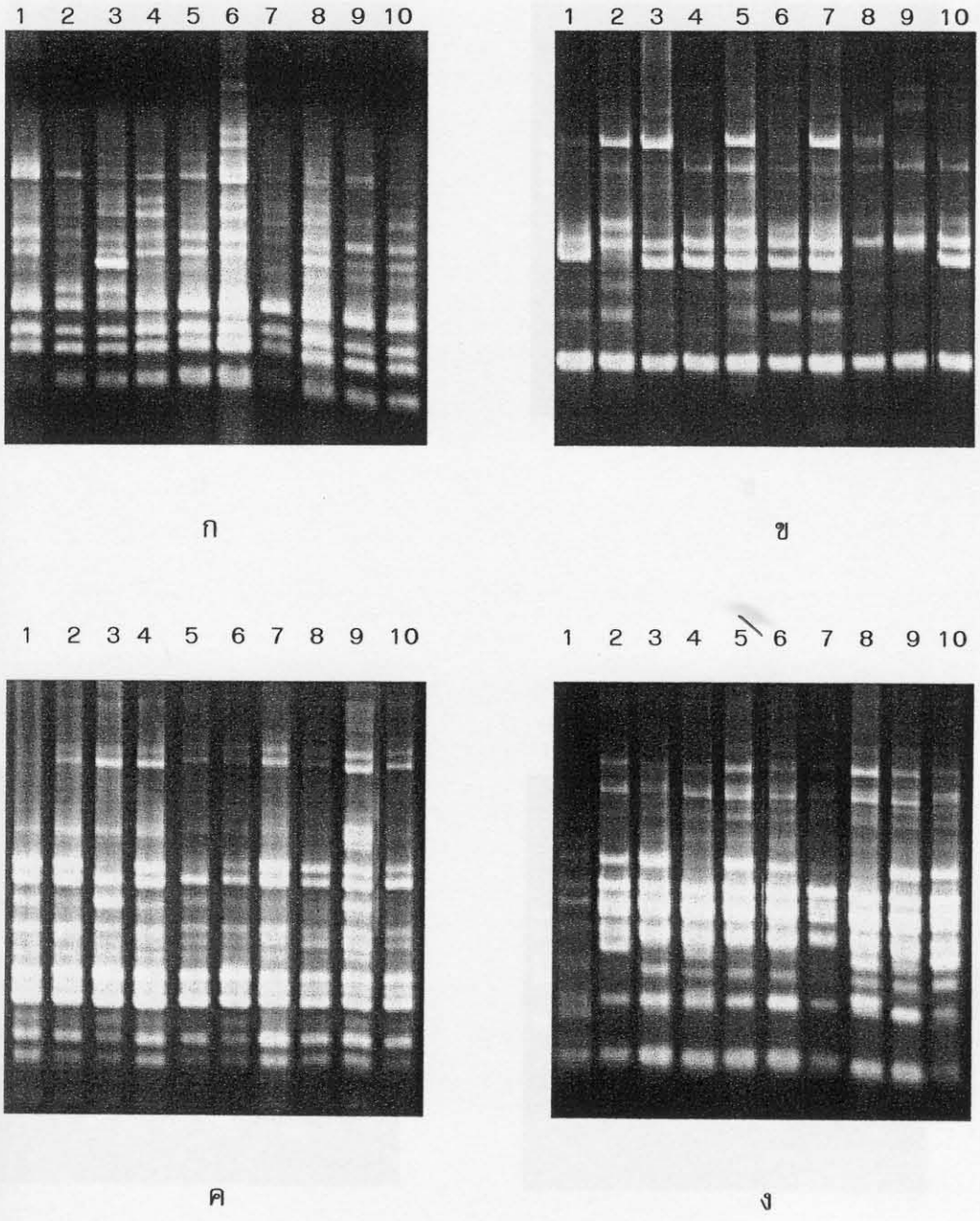
ภาพที่ 7 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในสะตอข้าว (lanes 1-19) และสะตอดาน (lanes 20-31) ที่คัดเลือกลักษณะที่แตกต่างชัดเจนของฝัก จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPC-02 (ก) และ OPR-02 (ข) M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

ทำการศึกษาตัวอย่างกลุ่มใหม่อีกครั้ง โดยคัดเลือกสะตอที่มีลักษณะฝักและเมล็ดที่แตกต่างกัน จากแหล่งเก็บในเขต ตำบลควนมีด อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา โดยคัดเลือกได้จำนวน 10 ตัวอย่าง เป็นสะตอข้าว จำนวน 7 ตัวอย่าง และสะตอดาน จำนวน 3 ตัวอย่าง บันทึกลักษณะฝัก และเมล็ด ที่ให้ความแตกต่างกันภายนอกชัดเจน (ตารางที่ 4) หลังจากนั้นนำสะตอทั้ง 10 ตัวอย่าง มาตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการทำอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ เพื่อที่จะนำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาเปรียบเทียบกับลักษณะที่เห็นภายนอกที่ได้ทำการบันทึกไว้ ผลจากการเปรียบเทียบ พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะแตกต่างกันในระหว่างตัวอย่างของแต่ละไพรเมอร์แต่แถบดีเอ็นเอดังกล่าวไม่จำเพาะเจาะจงกับลักษณะใดลักษณะหนึ่งที่ได้ทำการบันทึกไว้เลย (ภาพที่ 8-9)

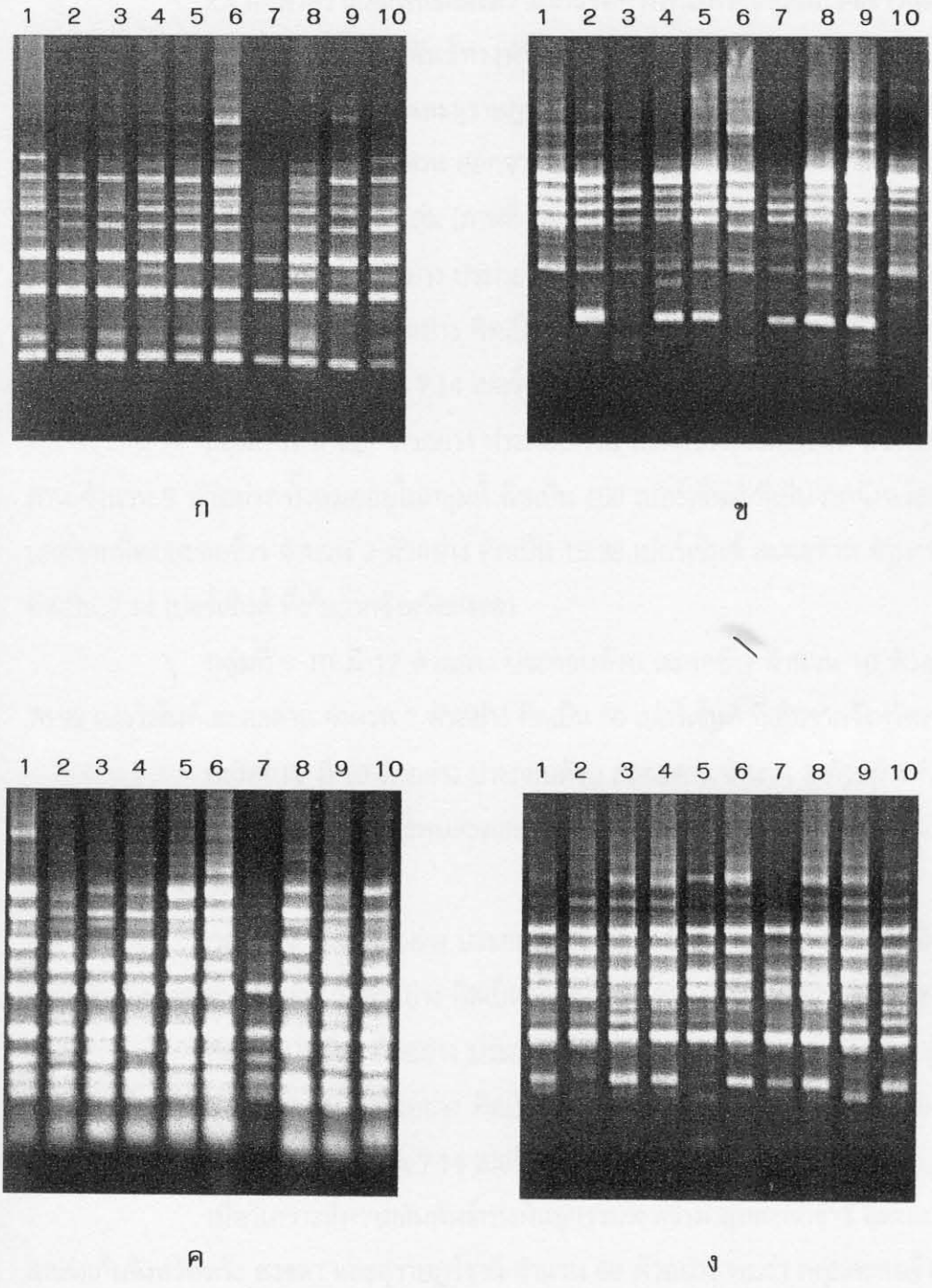
ตารางที่ 4 แสดงลักษณะแตกต่างภายนอกของสะตอข้าว และสะตอดาน จากแหล่งเก็บ ตำบลควนมีด อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา จำนวน 10 ตัวอย่าง

กลุ่ม	ขนาดฝัก				ขนาดเมล็ด		ช่องว่างระหว่างเมล็ด	
	สั้น	ยาว	แคบ	กว้าง	เล็ก	โต	ถี่	ห่าง
สะตอข้าว1	√		√		√			√
สะตอข้าว2		√	√		√			√
สะตอข้าว3		√	√		√		√	
สะตอข้าว4	√		√		√		√	
สะตอข้าว5		√	√		√			√
สะตอข้าว6		√	√		√			√
สะตอข้าว7	√			√		√	√	
สะตอดาน8	√			√		√	√	
สะตอดาน9		√		√		√		√
สะตอดาน10	√			√		√		√

หมายเหตุ √ = ลักษณะที่พบ



ภาพที่ 8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในสะตอข้าว (lanes 1-7) และสะตอดาน (lanes 8-10) ที่คัดเลือกลักษณะที่แตกต่างชัดเจนของฝักและเมล็ด จากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPC-02 (ก) OPB-04 (ข) OPB-17 (ค) และ OPB-18 (ง) ตามลำดับ



ภาพที่ 9 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในสะตอข้าว (lanes 1-7) และสะตอดาน (lanes 8-10) ที่คัดเลือกลักษณะที่แตกต่างชัดเจนของฝักและเมล็ด จากเทคนิคอาร์เอพีดีเมื่อใช้ไพรเมอร์ OPR-01 (ก) OPR-02 (ข) OPT-01 (ค) และ OPAB-03(ง) ตามลำดับ

2.4 ศึกษาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของสะตอข้าวและสะตอดาน

ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในสะตอข้าว และสะตอดาน จากแหล่งพันธุกรรมในเขตจังหวัดตรัง สงขลา และสุราษฎร์ธานี จำนวน 69 ตัวอย่าง จากเดนโดรแกรม พบว่าไม่สามารถแยกสะตอข้าว และสะตอดาน ออกจากกันได้อย่างชัดเจน แต่สามารถแยกสะตอข้าว และสะตอดานได้ตามแหล่งที่เก็บ เป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 10) ดังนี้

กลุ่มที่ I มี 13 ตัวอย่าง ประกอบด้วย สะตอข้าว จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็น 90.91 เปอร์เซ็นต์ สะตอดาน จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 16.67 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บจากจังหวัดตรัง และพบสะตอดาน จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.14 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บจากจังหวัดสงขลา

กลุ่มที่ II มี 22 ตัวอย่าง ประกอบด้วย สะตอข้าว จำนวน 12 ตัวอย่าง และสะตอดาน จำนวน 7 ตัวอย่าง ทั้งหมดอยู่ในกลุ่มนี้ คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี นอกจากนี้พบสะตอข้าว จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 15.38 เปอร์เซ็นต์ สะตอดาน จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.14 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บจากจังหวัดสงขลา

กลุ่มที่ III มี 17 ตัวอย่าง ประกอบด้วย สะตอข้าว จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็น 76.92 เปอร์เซ็นต์ สะตอดาน จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บจากจังหวัดสงขลา

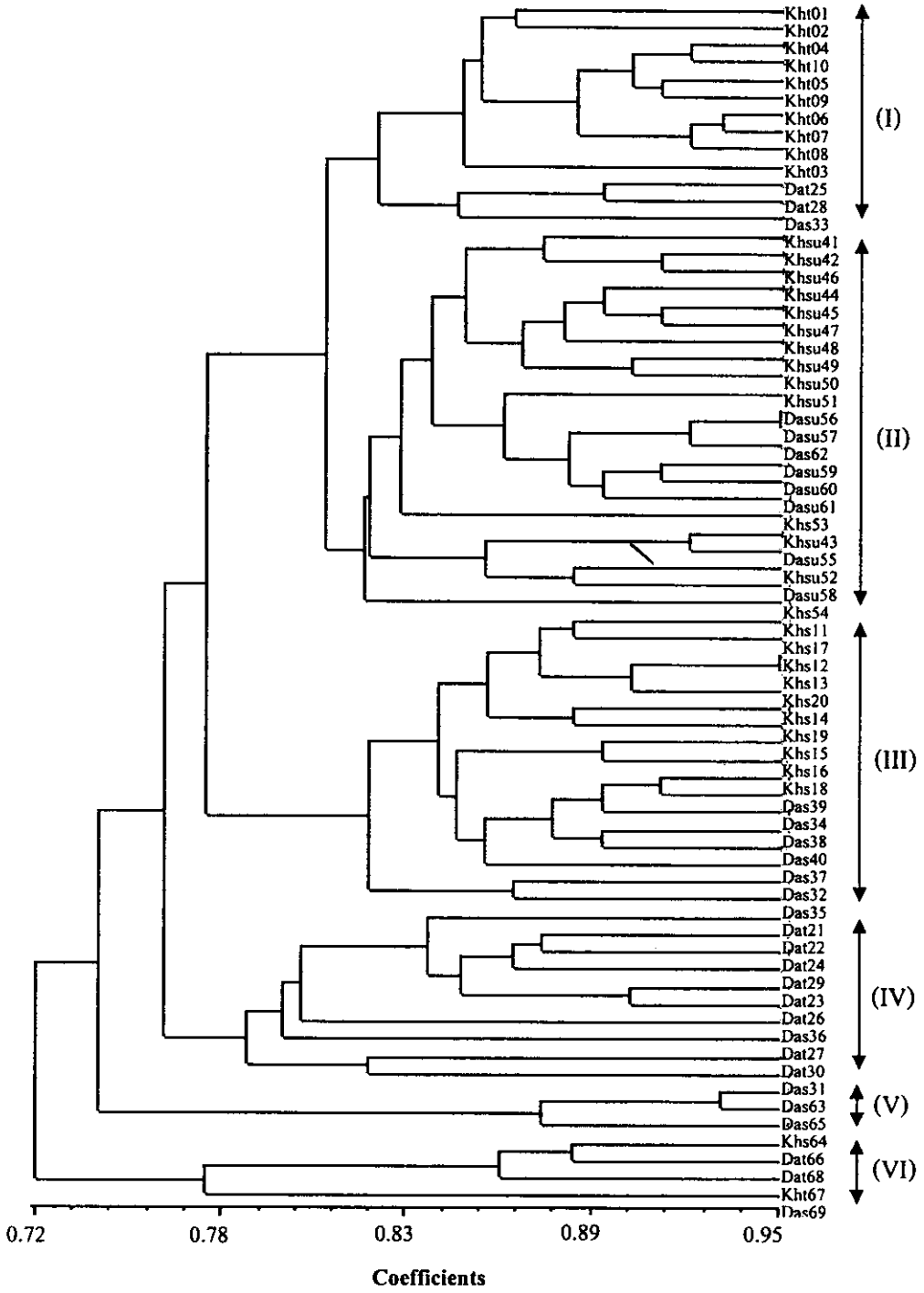
กลุ่มที่ IV มี 10 ตัวอย่าง ประกอบด้วย สะตอดาน จำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 88.33 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บจากจังหวัดตรัง และพบสะตอดาน จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 14.26 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บจากจังหวัดสงขลา

กลุ่มที่ V มี 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วย สะตอข้าว จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 15.38 เปอร์เซ็นต์ สะตอดาน จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.14 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บจากจังหวัดสงขลา

กลุ่มที่ VI มี 4 ตัวอย่าง ประกอบด้วย สะตอข้าว จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 9.09 เปอร์เซ็นต์ สะตอดาน จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 16.67 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บจากจังหวัดตรัง และพบสะตอดาน จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.14 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บจากจังหวัดสงขลา

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มสะตอข้าว และสะตอดาน จากแหล่งเก็บจังหวัดตรัง สงขลา และสุราษฎร์ธานี จำนวน 69 ตัวอย่าง พบว่า กลุ่มสะตอข้าวจากจังหวัดตรัง สะตอข้าวและสะตอดาน จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่ากลุ่มสะตอข้าวและสะตอดาน จากจังหวัดสงขลา รวมทั้งสะตอดานจากจังหวัดตรัง (ตารางที่ 5) เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมภายในกลุ่มสะตอทั้งหมด จำนวน 69 ตัวอย่าง พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 0.533 – 0.946 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.708 สำหรับค่าดัชนีเฉลี่ยในแต่ละแหล่งเก็บมีดังนี้ สะตอข้าวจากแหล่งเก็บจังหวัดตรัง สงขลา และสุราษฎร์ธานี มีค่าดัชนีเฉลี่ยเท่ากับ 0.837 0.819 และ 0.850

ตามลำดับ ส่วนสะตอดาน มีค่าดัชนีเฉลี่ยเท่ากับ 0.792 0.787 และ 0.872 จากแหล่งเก็บจังหวัดตรัง สงขลา และสุราษฎร์ธานี ตามลำดับ



ภาพที่ 10 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสะตอข้าว และสะตอดาน จาก จังหวัดตรัง สงขลา และสุราษฎร์ธานี จำนวน 69 ต้น สร้างด้วย UPGMA โปรแกรม NTSYS version 2.1

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

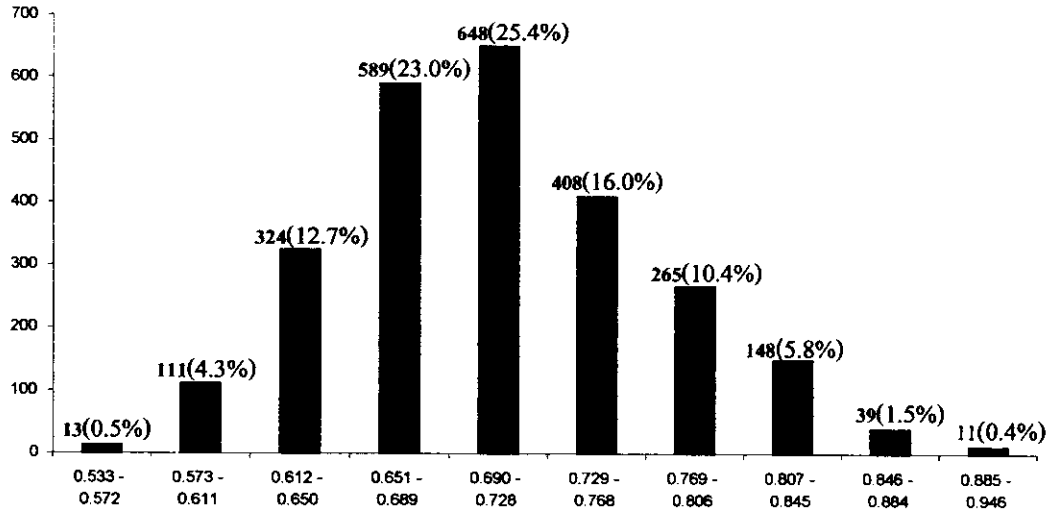
เมื่อพิจารณาความถี่ในการกระจายตัวภายในกลุ่มสะตอ ส่วนใหญ่พบว่ามีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม อยู่ในช่วง 0.651 – 0.768 คิดเป็น 64.40 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 11) โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.946 พบระหว่างกลุ่มสะตอดาน จากแหล่งพันธุกรรมจังหวัดตรัง ตัวอย่างที่ 12 และ 13 และกลุ่มสะตอดาน จากแหล่งพันธุกรรมจังหวัดสุราษฎร์ธานี ตัวอย่างที่ 56 และ 57 ค่าต่ำสุดมีค่าเท่ากับ 0.533 พบระหว่างกลุ่มสะตอดาน จากแหล่งพันธุกรรมจังหวัดตรัง ตัวอย่างที่ 66 และกลุ่มสะตอข้าว จากแหล่งพันธุกรรมจังหวัดสงขลา ตัวอย่างที่ 11

ตารางที่ 5 ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของสะตอข้าว และสะตอดาน จำนวน 69 ต้น

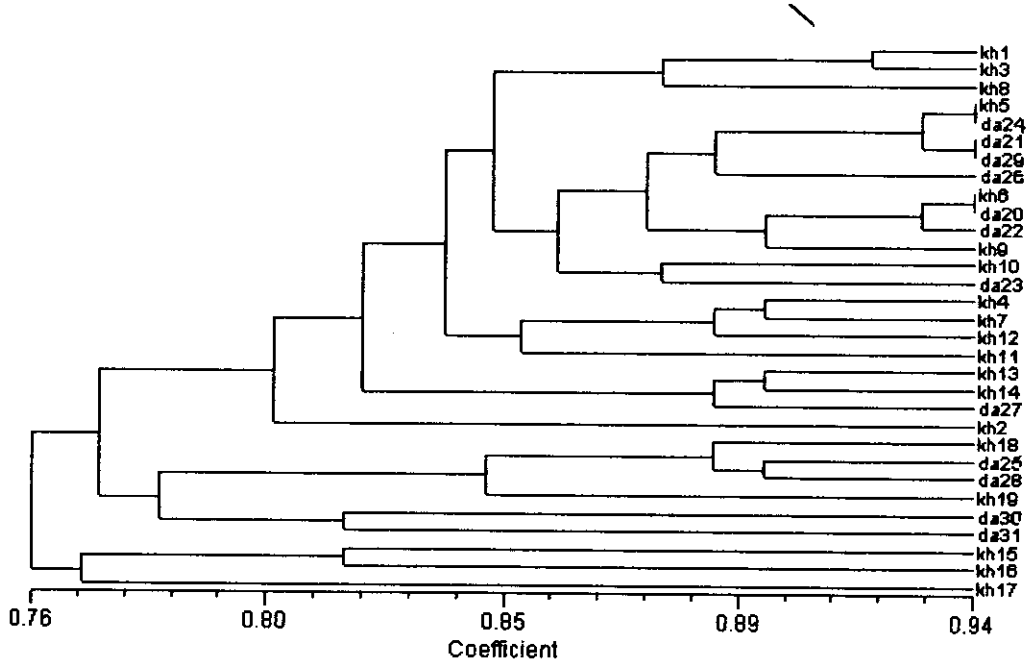
	Kht	Khs	Khsu	Dat	Das	Dasu
Kht	1.000					
Khs	0.776	1.000				
Khsu	0.786	0.763	1.000			
Dat	0.769	0.735	0.763	1.000		
Das	0.762	0.789	0.765	0.749	1.000	
Dasu	0.798	0.754	0.836	0.783	0.768	1.000

หมายเหตุ Kht = สะตอข้าวจาก จังหวัดตรัง Dat = สะตอดานจาก จังหวัดตรัง
Khs = สะตอข้าวจาก จังหวัดสงขลา Dat = สะตอดานจาก จังหวัดสงขลา
Khsu = สะตอข้าวจาก จังหวัดสุราษฎร์ธานี Dasu = สะตอดานจาก จังหวัดสุราษฎร์ธานี

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสะตอข้าว และสะตอดาน จำนวน 31 ต้น ที่ได้จากการคัดเลือกลักษณะฝัก และเมล็ด ที่เห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งสองชัดเจน ผลจากการวิเคราะห์เดนโดรแกรม พบว่า ความแตกต่างของลักษณะฝักและเมล็ด ที่ใช้แยกระหว่างสะตอข้าว และสะตอดาน ไม่ได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เพราะว่าไม่สามารถแบ่งแยกกลุ่มทั้งสองชนิดได้ชัดเจน จะเห็นได้ว่าจากสะตอดานยังคงอยู่ปะปนในกลุ่มสะตอข้าว จากเดนโดรแกรมในภาพที่ 12



ภาพที่ 11 เปรียบเทียบการกระจายตัวของค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรสะตอจำนวน 69 ตัวอย่าง



ภาพที่ 12 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มสะตอข้าว และสะตอดาน ที่คัดเลือกลักษณะแตกต่างชัดเจนของฝัก จำนวน 31 ตัวอย่าง สร้างด้วย UPGMA โปรแกรม NTSYS version 2.1

วิจารณ์ผล

1.การศึกษาความแตกต่างระหว่างสะตอข้าว และสะตอดาน โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จารุ (2541) รายงานว่า สะตอที่นิยมบริโภคและเห็นวางขายตามท้องตลาดมีเพียง 2 กลุ่ม คือ สะตอข้าวและสะตอดาน โดยการจำแนกลักษณะของฝัก รสชาติ และกลิ่น คือ สะตอข้าว ขอบฝักชิดเมล็ด รสชาติมัน กลิ่นไม่ฉุนจัด ส่วนสะตอดาน ขอบฝักห่างจากเมล็ด รสชาติค่อนข้างเผ็ด กลิ่นฉุนจัด ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะภายนอกที่เกษตรกรใช้แยกความแตกต่าง อย่างไรก็ตามจะมีความผันแปรค่อนข้างสูง วิชาญ (2548) ได้ทำการสำรวจและคัดเลือกพันธุ์สะตอจากแหล่งปลูกและป่าในภาคใต้ของไทย โดยเก็บรวบรวมฝักสะตอทั้ง 29 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และตรัง ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของฝักสะตอ 15 ลักษณะ คือ จำนวนฝักเฉลี่ยต่อช่อ ความยาวเฉลี่ยของฝักรวมก้านฝัก ความกว้างเฉลี่ยของฝัก การบิดตัวของฝัก ความหนาเฉลี่ยของฝัก รูปร่างของปลายฝัก การเรียงตัวของเมล็ด จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อฝัก รูปร่างของเมล็ด ความห่างเฉลี่ยเมล็ดแรกวัดจากโคนฝัก ความห่างเฉลี่ยของเมล็ด ความกว้างเฉลี่ยของเมล็ดวัดรวมเปลือกฝัก ความยาวเฉลี่ยของเมล็ดวัดรวมเปลือกฝัก ความหนาเฉลี่ยของเมล็ดวัดรวมเปลือกฝัก ความกว้างสม่ำเสมอของฝัก และทำการวิเคราะห์หาความผันแปรทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะเหล่านั้นด้วยการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis หาค่า Similarity coefficient ของ Jaccard กับโปรแกรม NTSYS ผลการวิเคราะห์พบว่า สะตอทั้ง 29 โคลน สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มสะตอป่า ซึ่งมีเพียง 1 โคลน และกลุ่มสะตอปลูก (cultivated type) จำนวน 28 โคลน ซึ่งแบ่งย่อยได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มสะตอดาน สะตอข้าว และกลุ่มที่ปะปนกันระหว่างสะตอดานและสะตอข้าว สำหรับการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาในกลุ่มสะตอข้าว และสะตอดาน ที่เก็บมาจากแหล่งพันธุกรรมในเขตจังหวัดตรัง สงขลา และสุราษฎร์ธานี พบว่า ลักษณะของฝักและเมล็ด มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง ลักษณะฝักภายนอกมีความแตกต่างกัน ยากที่จะบอกได้ว่าเป็นสะตอข้าวหรือสะตอดานตามการแยกกลุ่มข้างต้น ทั้งนี้เนื่องจากสะตอเป็นพืชผสมข้ามในธรรมชาติ โอกาสเกิดการผสมข้ามระหว่างสะตอข้าวและสะตอดาน สามารถเกิดขึ้นได้ จึงเห็นลักษณะของฝักและเมล็ด มีความผันแปร และมีลักษณะก้ำกึ่ง ทำให้ยากที่จะระบุชัดเจน ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำการคัดเลือกลักษณะฝัก และเมล็ดที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน เช่น เมล็ดเล็ก เมล็ดใหญ่ ฝักยาว ฝักสั้น จากทั้งสองกลุ่ม บันทึกความกว้างและความยาวของฝัก ความกว้างและความยาวของเมล็ด จำนวนเมล็ดต่อฝัก ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า เฉพาะความกว้างของฝัก ความกว้างและความยาวของเมล็ด ที่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99% และตัวอย่างใบของต้นเหล่านี้ถูกนำไปวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดย

เทคนิคอาร์เอพีดีต่อไป ผลจากความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มสะตอที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ทำให้มีรายงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับสะตออื่นๆ อีกหลายชนิดที่พบในธรรมชาติ เช่น สะตอแต (นพรัตน์, 2536) สะตอตอแหล (มนูญ, 2531) และสะตอเชือกหรือสะตอก้านฝักยาว (วิชาญ, 2548) อย่างไรก็ตาม จารุ (2541) รายงานว่า สะตอแตหรือสะตอตอแหล น่าจะเป็นชนิดเดียวกัน แต่อาจเรียกชื่อต่างกันตามท้องถิ่นที่พบ สำหรับการใช้ลักษณะภายนอกในการจำแนกสายพันธุ์ของพืช บางชนิดสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ได้ชัดเจน เนื่องจากมีลักษณะที่ค่อนข้างจำเพาะและแตกต่างชัดเจน เช่น พืชสกุล *Ficus* spp. (วิศัย และ สมบูรณ์, 2548) มะเขือ (Szczerbakowa *et al.*, 2002) มะกอก (Ozkaya *et al.*, 2006) เป็นต้น แต่บางพืชอาจทำได้ยาก เพราะมีความคล้ายคลึงกัน อีกทั้งในธรรมชาติเมื่อเกิดการผสมข้ามทำให้พืชมีลักษณะก้ำกึ่ง ไม่มีความเป็นเอกลักษณ์ จึงทำให้ไม่สามารถใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นตัวบ่งชี้ได้

2.การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสะตอข้าว และสะตอดาน โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

การสกัดดีเอ็นเอของใบสะตอข้าว สะตอดาน โดยใช้สารละลาย CTAB พบว่า ให้ปริมาณดีเอ็นเอจำนวนที่เพียงพอและคุณภาพดีพอสำหรับการทำพีซีอาร์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สารละลาย CTAB ในพืชหลายชนิด เช่น คาร์เนชั่น (Onozaki *et al.*, 2004) ข้าว (Wu *et al.*, 2004) Snap bean (Cunha *et al.*, 2004) ลำไย (Yonemoto *et al.*, 2006) เป็นต้น การเลือกใบพืชมาสกัดดีเอ็นเอ พบว่าสามารถใช้ได้ทั้งใบอ่อนและใบแก่ แต่ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จะแตกต่างกัน โดยใบอ่อนจนถึงระยะใบเพสลาด จะให้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณมากและคุณภาพดี การนำใบแก่มาสกัดดีเอ็นเอ พบว่า ได้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย และมีสีน้ำตาล เนื่องจากมีสาร Phenolic compound สูง (Prakash *et al.*, 2002) ไม่เหมาะสำหรับการนำมาทำพีซีอาร์ พืชบางชนิดใบแก่มักมีปริมาณเส้นใยสูงทำให้การสกัดดีเอ็นเอทำได้ยากขึ้น ตัวอย่างเช่น มะพร้าว (Upadhyay *et al.*, 2004) ตาลโตนด (รัฐพร, 2549) เป็นต้น

เมื่อเปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสะตอข้าว และสะตอดาน จำนวน 69 ตัวอย่าง หลังจากทดสอบด้วยไพรเมอร์ จำนวน 8 ไพรเมอร์ ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะหรือแยกความแตกต่างระหว่างสะตอทั้ง 2 กลุ่มออกจากกันได้ ซึ่งให้ผลสอดคล้องจากเดนโดรแกรม ที่พบว่าสะตอทั้งสองชนิดอยู่ปะปนกันในแต่ละกลุ่ม ถึงแม้จะทำการศึกษาเพิ่มเติมอีกครั้งโดยการคัดเลือกลักษณะฝัก และเมล็ด ที่ให้ความแตกต่างระหว่างสะตอข้าว และสะตอดานอย่างชัดเจน จำนวน 31 ต้น ที่มีผลการวิเคราะห์สถิติโดยโปรแกรม SAS ยืนยัน หลังจากทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของสะตอทั้ง 31 ต้น มาสร้างเป็นเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ ก็ไม่สามารถแยกสะตอข้าว และสะตอดาน ออกจากกันได้ เห็นได้จากสะตอทั้งสองกลุ่มยังอยู่ปะปนกัน และยืนยันผลอีกครั้ง โดยเก็บตัวอย่างเพิ่มเติม

และทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะแตกต่างกันในระหว่างตัวอย่างของแต่ละไพรเมอร์ แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงกับลักษณะภายนอกที่ได้ทำการบันทึกไว้ ผลที่ได้ดังกล่าวอาจเป็นเพราะไพรเมอร์ ทั้ง 8 ไพรเมอร์ ที่คัดเลือกได้ ยังมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการแยกความแตกต่างระหว่างสะตอข้าว และสะตอดาน หรืออาจเป็นเพราะไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างแถบดีเอ็นเอกับลักษณะภายนอกลักษณะใดลักษณะหนึ่งที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ ดังเช่นรายงานของรัฐพร (2549) ที่ศึกษาในกลุ่มประชากรตาลโตนด และพบว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกลุ่มประชากรกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งอย่างชัดเจน ซึ่งจำเป็นจะต้องทำการคัดเลือกไพรเมอร์เพิ่มขึ้นอีก หรืออาจต้องใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นที่มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่านี้ศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า พันธุกรรมของสะตอมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของตัวอย่างพืช โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 2125 คู่เบส จากไพรเมอร์ OPB – 17 และ 600 คู่เบส จากไพรเมอร์ OPR – 01 ที่สามารถแยกสะตอจากแหล่งเก็บจังหวัดตรัง และจังหวัดสุราษฎร์ธานีออกจากแหล่งเก็บจังหวัดสงขลาได้ และแถบดีเอ็นเอขนาด 2000 คู่เบส จากไพรเมอร์ OPB – 17 และ 350 คู่เบส จากไพรเมอร์ OPR – 02 ที่ใช้แยกสะตอจากจังหวัดสงขลาออกจากแหล่งอื่นได้ การที่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแหล่งที่เก็บตัวอย่างพืช อธิบายได้ว่า อาจเกิดจากความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ ประชากรเหล่านี้จึงถูกแยกกัน เนื่องจากระยะทางและสภาพภูมิศาสตร์ ยังผลให้ขาดความต่อเนื่องทางการสืบพันธุ์ และการแลกเปลี่ยนพันธุกรรม (gene flow) ซึ่งกันและกัน ถ้าสภาวะการแบ่งแยกของประชากรดังกล่าวดำเนินไปเป็นเวลานาน ทำให้ประชากรที่แยกจากกันนั้นพัฒนาและสั่งสมความแปรผันทางพันธุกรรมตามกาลเวลา และสภาวะแวดล้อมของถิ่นอาศัยที่เปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ (วิสุทธิ์, 2540) ด้วยเหตุผลนี้ น่าจะส่งผลให้ประชากรจากแหล่งต่างกันมีความห่างไกลทางพันธุกรรมมากกว่าแหล่งใกล้เคียง แต่ถ้าจะให้ชัดเจนควรเพิ่มแหล่งที่เก็บตัวอย่างมากกว่านี้ เพราะจากการศึกษาครั้งนี้มีเพียง 3 แหล่งเท่านั้น จากการวิเคราะห์เดนโดรแกรม พบว่าสะตอข้าว และสะตอดานทั้งสองกลุ่มจากแหล่งเก็บเดียวกัน คือ จังหวัดสงขลา และสุราษฎร์ธานี มีความใกล้ชิดกัน ยกเว้นแหล่งเก็บจังหวัดตรัง ที่พบว่าสะตอข้าว และสะตอดาน มีความห่างไกลทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า สะตอข้าวและสะตอดานจากแหล่งจังหวัดตรังได้มาจากศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ซึ่งต้นส่วนใหญ่ได้มาจากการเก็บรวบรวมพันธุ์จากจังหวัดต่างๆ ทั่วภาคใต้ ไม่ใช่พันธุ์ที่ปลูกต่อๆ กันมาในเขตจังหวัดตรัง จากการพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงในการแยกแหล่งเก็บต่างๆ ออกจากกัน น่าจะเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาประวัติวิวัฒนาการของพืชได้ ดังมีรายงานการศึกษาความหลากหลายของประชากรเหรียง ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในเมือง Manipur ของประเทศอินเดีย พบว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส จากไพรเมอร์ OPP – 05 สามารถแยกความแตกต่างของเหรียงแต่ละ

แหล่งเก็บได้ (Thangjam *et al.*, 2003) หรือมีการศึกษาในพืชพวกกระชาย (Ngamriabsakul and Techaprasan, 2005) *Andrographis paniculatai* (Padmesh *et al.*, 1999) และข้าวหอม (Fukuoka *et al.*, 2006) ด้วยการใช้ไพรเมอร์ นอกจากนี้สาเหตุที่ไม่สามารถแยกกลุ่มสะตอข้าว และสะตอดาน ออกจากกันได้โดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดี หรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับชนิดใดชนิดหนึ่ง อาจเนื่องมาจากในธรรมชาติ พบว่า สะตอเป็นพืชผสมข้าม โอกาสเกิดการผสมข้ามระหว่างสะตอข้าว และสะตอดาน สามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา พันธุกรรมพื้นฐานของพันธุ์สะตอ จึงมีความเป็น heterozygosity สูง ดังนั้นโอกาสที่จะมีความจำเพาะเจาะจงจึงเป็นไปได้ค่อนข้างน้อย

เอกสารอ้างอิง

จรัสศรี นวลศรี สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม. 2543. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นลองกอง (*Lansium domesticm* Corr.) ที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยเทคนิค RAPD. (Random Amplified Polymorphic DNA) รายงานการวิจัย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จารุ ไชยแขวง. 2541. การพัฒนาสะตอแบบครบวงจร. ฝ่ายพัฒนาการผลิตพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: 61 หน้า.

นพรัตน์ บำรุงรักษ์. 2536. พืชหลักปักษ์ใต้. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ต้นอ้อ. 184 หน้า.

มนูญ ศิรินุพงศ์. 2531. การปลูกสะตอ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม. 63 หน้า.

รัฐพร พรหมแก้ว. 2549. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรตาลโตนด (*Borassus flabellifer* Linn.) โดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) และ ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิชาญ เอียดทอง. 2548. การคัดเลือกพันธุ์สะตอในประเทศไทย ตอนที่ 1 การพิจารณาลักษณะสัณฐานของฝักต่อการนำไปคัดเลือกพันธุ์. รายงานการสัมมนาทางวนวัฒนวิทยา ครั้งที่ 7 ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2540. ความแปรผันทางพันธุกรรม. วารสารราชบัณฑิตยสถาน 22: 112 – 120.

วิศัย พรหมเทพ และ สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย. 2548. การวิเคราะห์พันธุกรรมพืชสกุล *Ficus* spp. โดยเทคนิค HAT – Random Amplified Polymorphic DNA. วารสารศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร 2: 39 – 52.

วัชรินทร์ ชุ้นสุวรรณ. 2545. การใช้โปรแกรม SAS เพื่อการวิเคราะห์ข้อมูล. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 179 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักส่งเสริมฝึกอบรม มหาวิทยัยเกษตรศาสตร์.

สมพร จันทเดช. 2534. การขยายพันธุ์สะตอโดยวิธีการไม่อาศัยเพศบางวิธี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 6: 14 – 20.

Cunha, C., Hintz, T. and Griffiths, P. 2004. Genetic diversity of snap bean cultivars determined using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. HortScience 39: 481 – 484.

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

Fukuoka, S., Tran, S.D., Ebana, K., Luu, T.N., Nagamine, T. and Okuno, K. 2006. Genetic organization of aromatic rice as revealed by RAPD marker: A case study in conserving crop genetic resources on farm. Euphytica 149: 61 – 71.

Jaccard, P. 1908. Nouvellers recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44: 223 – 270.

Jensen, M. 1995. Tree commonly cultivated in Southeast Asia: An illustrated field guide. FAO Regional Office for Asia and the Pacific (RAP). Bangkok, Thailand: 229.

Nielsen, I.C. 1985. Leguminosae – Mimosoideae in Thailand. Flora of Thailand 4: 131 – 222.

Ngamriabsakul, C. and Techaprasan, J. 2005. The phylogeny of Thai *Boesenbergia* (Zingiberaceae) based on *petA – psbJ* spacer (chloroplast DNA). Songklanakarin J. Sci. Technol. 28: 49 – 57.

Onozaki, T., Tanikawa, N., Taneya, M., Kudo, K., Funayama, T., Ikeda, H. and Shibata, M. 2004. A RAPD-derived STS marker is linked to a bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*) resistance gene in carnation. Euphytica 138: 255 – 262.

Ozkaya, M.T., Cakir, E., Gokbayrak, Z., Ercan, H. and Taskin, N. 2006. Morphological and molecular characterization of Derik Halhali olive (*Olea europaea* L.)

accessions grown in Derik-mardin provine of Turkey. Scientia Horticulturae 108: 205 – 209.

Padmesh, P., Sabu, K.K., Seeni, S. and Pushpangadan, P. 1999. The use of RAPD in assessing genetic variability in *Andrographis paniculatai* Nee, a hepatoprotective drug. Curr. Sci. 76: 833 – 835.

Prakash, D.P., Narayanaswamy, P. and Sondur, S.N. 2002. Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. J. Hort. Sci. Biotech. 77: 287 – 293.

Rohlf, F.J. 2002. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistics Inc., Setauket, NY.

Szczerbakowa, A., Maciejewska, U., Guzowska, E.Z. and Wielgat, B. 2002. Somatic hybrids *Solanum nigrum* (+) *S. Tuberosum*: morphological assessment and verification of hybridity. Plant Cell Reports 21: 577 – 584.

Thangjam, R., Maibam, D. and Sharma, J.G. 2003. Detection of genetic diversity in *Parkia timoriana* (DC) Merr. using randomly amplified polymorphic DNA analysis. Food, Agriculture & Environment 1: 46 – 49.

Upadhyay, A., Jayadev, K., Manimekalai, R. and Parthasarathy, V.A. 2004. Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers. Scientia Horticulturae 99: 353 – 362.

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

Wu, C.T., Cheng, Z.Q., Huang, X.Q., Yin, S.H., Cao, K.M. and Sun, C.R. 2004. Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulate* from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of the endangered species. Plant Science 167: 35 – 42.

Yonemoto, Y., Chowdhury, A.K., Kato, H. and Macha, M.M. 2006. Cultivars identification and their genetic relationships in *Dimocarpus longan* subspecies based on RAPD markers. Scientia Horticulturae 109: 147 – 152.

accessions grown in Derik-mardin provine of Turkey. Scientia Horticulturae 108: 205 – 209.

Padmesh, P., Sabu, K.K., Seeni, S. and Pushpangadan, P. 1999. The use of RAPD in assessing genetic variability in *Andrographis paniculatai* Nee, a hepatoprotective drug. Curr. Sci. 76: 833 – 835.

Prakash, D.P., Narayanaswamy, P. and Sondur, S.N. 2002. Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. J. Hort. Sci. Biotech. 77: 287 – 293.

Rohlf, F.J. 2002. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistics Inc., Setauket, NY.

Szczerbakowa, A., Maciejewska, U., Guzowska, E.Z. and Wielgat, B. 2002. Somatic hybrids *Solanum nigrum* (+) *S. Tuberosum*: morphological assessment and verification of hybridity. Plant Cell Reports 21: 577 – 584.

Thangjam, R., Maibam, D. and Sharma, J.G. 2003. Detection of genetic diversity in *Parkia timoriana* (DC) Merr. using randomly amplified polymorphic DNA analysis. Food, Agriculture & Environment 1: 46 – 49.

Upadhyay, A., Jayadev, K., Manimekalai, R. and Parthasarathy, V.A. 2004. Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers. Scientia Horticulturae 99: 353 – 362.

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

Wu, C.T., Cheng, Z.Q., Huang, X.Q., Yin, S.H., Cao, K.M. and Sun, C.R. 2004. Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulate* from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of the endangered species. Plant Science 167: 35 – 42.

Yonemoto, Y., Chowdhury, A.K., Kato, H. and Macha, M.M. 2006. Cultivars identification and their genetic relationships in *Dimocarpus longan* subspecies based on RAPD markers. Scientia Horticulturae 109: 147 – 152.