แบบ 2

รายงานผลวิจัยเรื่องเต็มโครงการสิ้นสุด

ชื่อเรื่อง ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเทียมจากแหล่งปลูกต่างๆ

ชื่อผู้ดำเนินงาน นางสาวรัชนี ศิริยาน[1/] นางสาวศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล[2/] นางจิรภา ออสติน[1/]
นางสาวจันทนา โชคพาชื่น[1/] นางสาวเสาวนี เขตสกุล[1/] ว่าที่ร้อยตรีอรรถพล รุกขพันธ์[1/]
[1/]ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ ต.หนองไผ่ อ.เมือง จ.ศรีสะเกษ
[2/]ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ต.ศิลา อ.เมือง จ.ขอนแก่น

บทคัดย่อ

กระเทียมเป็นพืชผักที่มีการปลูกกันมานานในประเทศไทย โดยมีแหล่งปลูกที่สำคัญในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งแต่ละแหล่งปลูกจะมีพันธุ์ที่เรียกชื่อตามแหล่งปลูก แต่ยังไม่มีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของกระเทียมจากแหล่งปลูกต่างๆ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเทียมในแหล่งปลูกที่สำคัญ โดยเก็บตัวอย่างกระเทียมจากภาคเหนือ ได้แก่ เชียงราย พะเยา ลำพูนและลำปาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจากจังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 11 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Random amplified polymorphism DNA (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 80 ไพรเมอร์ ผลการศึกษา สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกไพรเมอร์ และมีไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระเทียมที่นำมาศึกษาทั้งหมด 76 ไพรเมอร์ และมี 4 ไพรเมอร์ ที่ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของกระเทียม โดยข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอแต่ละขนาด พบว่าเมื่อนำมาหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน เพื่อจัดกลุ่มและสร้างเดนโดรแกรมพบว่า สามารถจัดกลุ่มของกระเทียมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกระเทียม 6 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ GA55002, GA55007, GA55008, GA55009 และ GA55005 มีแหล่งที่มาจากจังหวัดศรีสะเกษ ส่วนสายพันธุ์ GACHI เป็นกระเทียมจีน จึงมีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่น้อยกับสายพันธุ์อื่นๆ ภายในกลุ่ม กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยกระเทียม 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ GA55010, GA55016, GA55011, GA55012 และ GA55016/3 ซึ่งมีแหล่งที่มาจาก จังหวัดลำพูน พะเยา เชียงราย และลำปาง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีแหล่งปลูกอยู่ในภาคเหนือทั้งหมด ดังนั้นการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นในกระเทียม จึงสามารถแยกกระเทียมได้เป็น 2 กลุ่มคือ กระเทียมจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และกระเทียมจากภาคเหนือ

คำนำ

กระเทียม (garlic, *Allium sativum* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ Alliaceae เป็นพืชล้มลุก มีลำต้นหรือหัวอยู่ใต้ดิน หัวมีลักษณะกลมแป้น แต่ละหัวประกอบด้วยกลีบเรียงซ้อนกันประมาณ 4-15 กลีบ บางพันธุ์จะมีเพียงกลีบเดียว เรียกว่า “กระเทียมโทน” แต่ละกลีบมีกาบเป็นเยื่อบางๆสีขาวอมชมพูหุ้มอยู่โดยรอบ กระเทียมมีรากไม่ยาวนัก ใบมีลักษณะยาวแบน ปลายใบแหลมแคบ โคนมีใบหุ้มซ้อนกัน ดอกออกเป็นช่อ มีสีขาวติดเป็นกระจุกที่ปลาย

ก้านช่อ กระเทียมมีกลิ่นหอมฉุน รสชาติเผ็ดร้อน สารสำคัญที่ทำให้กระเทียมมีกลิ่นหอมฉุนเผ็ดร้อน คือ เอนไซม์อัลลิเนส (Allinase) ที่เปลี่ยนสารอินทรีย์กำมะถันอัลลิอิน (Alliin) ให้เป็นน้ำมันหอมระเหยอัลลิซิน (Allicin) และเมื่อนำหัวกระเทียมสดมากลั่นด้วยไอน้ำจะได้น้ำมันกระเทียม (Garlic oil) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอาหาร น้ำ กรดไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล กรดอะมิโน เหล็ก แคลเซียม วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และวิตามินซี ฯลฯ (http://www.the-than.com/samonpai/sa_12.html)

การจำแนกพันธุ์กระเทียมในประเทศไทย อาศัยหลักเกณฑ์ต่างๆ เช่น อายุเก็บเกี่ยว สามารถแบ่งพันธุ์กระเทียมได้ ดังนี้

1. พันธุ์เบา เป็นกระเทียมที่มีอายุการเก็บเกี่ยวสั้นมาก ประมาณ 75 วัน ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หรือประมาณ 80-90 วันในภาคเหนือ เรียกชื่อตามแหล่งที่มาว่า เป็นกระเทียมพื้นเมืองของศรีสะเกษ หรือพันธุ์จากศรีสะเกษ มีลักษณะตั้งแต่เป็นต้นอ่อนดังนี้ คือ มีลำต้นแข็งเหนียว ขนาดเล็ก และช่วงลำต้นสูงกว่าทุกพันธุ์ มีช่วงระหว่างใบกว้างมาก และเมื่อแก่จัดลำต้นจะหักล้มเอนราบไปกับพื้นดิน การเรียงของใบ (phyllotaxy) จะอยู่ตรงกันข้าม (opposite) แยกกันไป 2 ข้าง มองคล้ายรูปพัดที่กางออก แผ่นใบเล็ก แคบและยาว หัวกระเทียมขนาดปานกลาง เมื่อเทียบอัตราส่วนระหว่างหัวกับลำต้นและใบ ส่วนหัวจะเบากว่า แต่ละหัวประกอบด้วยจำนวนกลีบมากกว่าพันธุ์หนัก คือ มีประมาณ 11-13 กลีบ และมีขนาดกลีบต่างๆ กัน ตรงปลายกลีบจะมีเส้นยาวเหนือกลีบ บางครั้ง เรียกว่า มีหางที่กลีบ ซึ่งเป็นลักษณะเด่นในการตรวจสอบพันธุ์กระเทียมอีกวิธีหนึ่ง สีของหัวเป็นสีขาวขุ่นหรืออมเหลือง หัวกระเทียมแห้งมีความแน่นแข็งมาก กลิ่นฉุนจัด ผลผลิตสดเฉลี่ยต่อไร่ 400-4,500 กก./ไร่ ความชื้นเมื่อแห้งจะหายไป 60-90%

2. กระเทียมพันธุ์กลาง เป็นกระเทียมที่มีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 100 วันขึ้นไป หรือ 100-120 วัน ปกติถ้าจะใช้กระเทียมแห้งทำพันธุ์ปลูกปีถัดไป เกษตรกรจะเก็บเกี่ยวกระเทียมพันธุ์นี้อายุ 120 วัน ซึ่งเชื่อว่าแก่จัดและคุณภาพดี เก็บรักษาได้นาน ถ้าเป็นกระเทียมขายสดจะเก็บเกี่ยวไว้ประมาณ 100 วัน จึงเป็นสาเหตุให้คุณภาพของกระเทียมแห้งในท้องตลาดมีคุณภาพการเก็บรักษาไม่ดี กล่าวคือ ฝ่อ แห้งง่าย กระเทียมพันธุ์กลางมีหลายพันธุ์หลายชื่อ เช่น กระเทียมพื้นเมืองของเชียงใหม่ เรียก กระเทียมเชียงใหม่ กระเทียมพื้นเมืองของภาคกลาง เรียก กระเทียมบางช้าง ลักษณะของกระเทียมพันธุ์กลางมีดังนี้ ลำต้นใหญ่อวบและเตี้ยกว่าพันธุ์เบา ใช้บริโภคได้เมื่อแก่จัด ไม่ล้มเอนและมีใบ ลำต้นแห้งเหี่ยว มีหัวเล็กๆ ที่เรียกว่าดอกเกิดขึ้นที่ลำต้น การเรียงของใบ เวียนเป็นวงกลมไปรอบๆ ลำต้น ใบแบนกว้าง ปลายใบโน้มลงดิน เมื่ออากาศร้อนจัดขึ้น ใบก็จะยังอ่อนและโค้งลงมากขึ้นตามไปด้วย สีใบเขียวเข้มกว่าพันธุ์เบา หัวกระเทียมมีขนาดใหญ่กว่าพันธุ์เบาเมื่อปลูกดูแลในสภาพเดียวกัน ในหนึ่งหัว มีกลีบขนาดต่างๆ กันเรียงซ้อนเป็นชั้นๆ ประมาณ 2-3 ชั้น กลีบชั้นนอกมีขนาดโตกว่ากลีบชั้นใน ขนาดกลีบไล่เลี่ยกับกลีบของพันธุ์เบา จำนวนกลีบต่อหัวประมาณ 9-15 กลีบ มักมีรูปร่างเป็นเหลี่ยมตามขอบ และกลีบมักงอโค้ง สีของเปลือกหุ้มห่อหัว มีสีม่วงปนแดงหรือชมพูอ่อน อายุการเก็บเกี่ยว 100-120 วัน กลิ่นฉุนปานกลาง ผลผลิตเฉลี่ยสด 2,000-3,500 กก./ ไร่ เมื่อเก็บเกี่ยวแก่จัดนาน 3 เดือน ความชื้นจะหายไป 35-50% ถ้าเก็บเกี่ยวไม่แก่จัด ทิ้งไว้จนแห้ง น้ำหนักจะเหลือ 25% เท่านั้น

3. กระเทียมพันธุ์หนัก เป็นกระเทียมจากต่างประเทศเป็นส่วนใหญ่ มักมีอายุการเก็บเกี่ยวนานตั้งแต่ 150 วันขึ้นไป ถ้าปลูกในท้องถิ่นที่อากาศเย็นไม่มาก อายุการแก่ก็จะลดลงประมาณ 135 วันขึ้นไปก็เริ่มแก่ แต่ถ้าเก็บ

เกี่ยวเร็วเกินไป ผลผลิตแห้งที่ได้จะเสียหาย ฝ่อ เน่า แห้งเร็วมากกว่าพันธุ์เบาและพันธุ์กลาง เท่าที่พบในท้องตลาดเรียกว่า กระเทียมพันธุ์จีน มีลักษณะดังนี้ คือ ลำต้นอวบอ้วน มีขนาดใหญ่กว่าพันธุ์กลาง ใบมีสีเขียวขนาดใหญ่และหนากว่าทั้ง 2 พันธุ์ข้างต้น ช่วงระหว่างใบต่อใบ สั้น แคบ มองดูคล้ายโคนใบทั้งหมดเรียงซ้อนกัน ชอบอากาศเย็นจัดและช่วงอากาศเย็นยาวนานกว่าปกติ ขนาดหัวใหญ่ ตรงโคนหรือคอของหัวใหญ่เช่นกัน แต่ละหัวมีจำนวนกลีบประมาณ 4-8 กลีบ ขนาดกลีบใหญ่ รูปร่างของกลีบอ้วนเกือบกลม และไม่มีเหลี่ยมคม ตามสันกลีบเลย กลิ่นฉุนปานกลาง สีของเปลือกนอกที่หุ้มห่อหัวสีขาวหรือปนม่วง อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 150 วัน ผลผลิตสดเฉลี่ย 4,000 กก./ไร่ ความชื้นลดลง เมื่อเก็บรักษาไว้นานเกิน 3 เดือน ประมาณ 40-60%

นอกจากอายุเก็บเกี่ยวแล้ว ยังมีการเรียกพันธุ์กระเทียมตามแหล่งที่มาของพันธุ์ เช่น กระเทียมจากจีนหรือไต้หวัน เรียก กระเทียมจีน กระเทียมจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียก พันธุ์ศรีสะเกษ กระเทียมจากภาคกลาง เรียก พันธุ์บางช้าง และกระเทียมจากภาคเหนือ เรียก พันธุ์พื้นเมืองเชียงใหม่ เป็นต้น กระเทียมยังแบ่งโดยอาศัยฤดูปลูกและฤดูการเก็บเกี่ยวเป็นเกณฑ์ เช่น ภาคเหนือมีกระเทียม 2 รุ่น คือ รุ่นแรกเรียกกระเทียมดอ หมายถึง กระเทียมที่เกษตรกรปลูกและเก็บเกี่ยวก่อนฤดูปลูก หรือฤดูเก็บเกี่ยวตามปกติ และรุ่นหลังเรียกกระเทียมปี หมายถึง กระเทียมที่เกษตรกรปลูกและเก็บเกี่ยวตามปกติของฤดูการปลูกกระเทียมส่วนมาก คือ หลังฤดูการทำนาหรือเกี่ยวข้าวแล้ว มีที่ดินและฟางข้าว เป็นวัตถุคลุมหลังแปลงที่ได้จากการทำนาในปีนั้นๆ เป็นต้น (http://www.thaikasetsart.com) จากข้อมูลจะเห็นว่ายังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการจำแนกสายพันธุ์กระเทียมในประเทศไทยโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรม และยังไม่มีข้อมูลความสัมพันธ์ของลักษณะสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรมของกระเทียมจากแหล่งปลูกต่างๆ ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จะทำให้สามารถทราบข้อมูลทางพันธุกรรม เพื่อใช้ในเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบสายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์และการตรวจสอบสายพันธุ์ของกระเทียมได้

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค Random amplified polymorphism DNA (RAPD) ของพืชในวงศ์ Alliaceae รายงานไว้โดย Ebrahimi et al. (2009) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอมเปอร์เชียน (Persian shallot, *Allium hirtifolium*) โดยเก็บรวบรวมหอมจากแหล่งต่างๆในอิหร่าน จำนวน 17 สายพันธุ์ เก็บข้อมูลด้านสัณฐานวิทยา และศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค RAPD เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ random decamer primer จำนวน 100 ไพรเมอร์ ผลการศึกษาพบว่า มีจำนวน 15 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ การจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลด้านสัณฐานวิทยา สามารถจัดกลุ่มหอมได้ 3 กลุ่ม ส่วนการใช้ข้อมูล RAPD จัดกลุ่มโดยใช้ cluster analysis สามารถจัดกลุ่มหอมได้ 8 sub-cluster และข้อมูล RAPD ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับข้อมูลด้านสัณฐานวิทยา

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กระเทียมจากแหล่งปลูกต่างๆที่สำคัญของประเทศไทย ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
2. สารเคมีในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ dNTP, Taq DNA polymerase, agarose gel, primers, boric acid ฯลฯ

3. เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ เครื่อง PCR, gel electrophoresis, water baht, เครื่องปั่นเหวี่ยง

วิธีการ

1. การเตรียมต้นกล้า

นำกระเทียมจากแหล่งปลูกต่างๆ (ตารางที่ 1) ปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาด 12 นิ้ว โดยปลูกพันธุ์ละ 7 หัวต่อกระถาง รดน้ำ 2 วัน ต่อ 1 ครั้ง จนกระทั่งต้นกล้ามีอายุประมาณ 20 วัน ตัดใบอ่อนของกระเทียมแต่ละสายพันธุ์ไปสกัดดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 1 สายพันธุ์กระเทียมจากแหล่งปลูกต่างๆที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	พันธุ์	แหล่งที่มา
1	GA55002	ศรีสะเกษ
2	GA55005	ศรีสะเกษ
3	GA55007	ศรีสะเกษ
4	GA55008	ศรีสะเกษ
5	GA55009	ศรีสะเกษ
6	GA55010	ลำพูน
7	GA55011	เชียงราย
8	GA55012	ลำปาง
9	GA55016	พะเยา
10	GA55016/3	พะเยา
11	GACHI	จีน

2. วิธีการสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

การสกัดดีเอ็นเออ้างอิงตามวิธีการของ Doyle & Doyle (1987) โดยชั่งตัวอย่างใบกระเทียมหนัก 0.2 กรัม บดในโกร่งปลอดเชื้อ โดยเติมไนโตรเจนเหลว บดจนละเอียด เติม extraction buffer 1,000 มิลลิลิตร และเติม 2-mercaptoethanal ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วเทลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที โดยพลิกหลอดไปมา จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) จนเต็มหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol ที่เย็นจัด 0.7 เท่าของปริมาตรเดิม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนบนทิ้งไป แล้วเติมเอทานอล 75% ที่มี ammonium acetate 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาให้ตะกอนละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้งคว่ำหลอดทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมง หรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะแห้ง เติม TE buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ RNase A (10 mg/ml) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเก็บดีเอ็นเอไว้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

3. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของของดีเอ็นเอ

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ โดยวิธีการเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (lambda DNA) ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟริซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 µg/ml เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ โดยส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของกระเทียมด้วยเทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 80 ไพรเมอร์ โดยแต่ละเส้นของไพรเมอร์ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 10 เบส ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มีส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาจำนวน 25 ไมโครลิตร โดยดัดแปลงจาก Meryem and Ipek (2006) ดังนี้ ดีเอ็นเอ 25 นาโนกรัม, 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 1 µM primer, 1.25 unit *Taq* DNA polymerase นำส่วนประกอบต่างๆ ผสมให้เข้ากันแล้วใส่ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Biometra รุ่น T Gradient จากประเทศเยอรมัน) มีโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นที่ 1 Predenaturation อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 Denaturation อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นที่ 3 Annealing อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ขั้นที่ 4 Extension

อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที 45 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 40 รอบ ขั้นที่ 5 Final Extension อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด นำผลผลิตพีซีอาร์ไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้วุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5% ใช้ Novel juice เพื่อย้อมแถบดีเอ็นเอ ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 75 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตในเครื่อง gel documentation เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน ขั้นตอนการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD มีดังนี้ พิจารณาแถบดีเอ็นเอในแต่ละขนาด หากตัวอย่างใดปรากฏแถบดีเอ็นเอ ให้คะแนนเป็น 1 หากไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ให้คะแนนเป็น 0 ทำการบันทึกให้ครบทุกตำแหน่งในแต่ละไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่า similarity coefficient โดยใช้โปรแกรม NTSYS pc 2.1 วิเคราะห์การจัดกลุ่ม แล้วสร้างเดนโดรแกรมเพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระเทียมที่นำมาศึกษา

เวลาและสถานที่

สถานที่ดำเนินงาน ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2556

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้นำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD จำนวน 80 ไพรเมอร์ มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระเทียมจำนวน 11 สายพันธุ์ และทำการจัดกลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรม พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD ทั้ง 80 ไพรเมอร์สามารถสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ได้ และมีไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรม (polymorphic) ระหว่างกระเทียมที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีทั้งหมด 76 ไพรเมอร์ และมี 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ OPS10, OPP2, OPX11 และ OPX12 ที่ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (monomorphic) ระหว่างกระเทียมที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 379 แถบ คิดเป็น 4.7 แถบต่อไพรเมอร์ ซึ่งเป็น polymorphic band 322 แถบ และมี monomorphic band 57 แถบ โดยแถบที่มีขนาดใหญ่ที่สุดประมาณ 2000 คู่เบส ขนาดเล็กที่สุด 250 คู่เบส

ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ซึ่งไพรเมอร์แต่ละชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน หลังจากตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซิส โดยใช้วุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแต่ละไพรเมอร์มีความสามารถในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้จำนวนแถบแตกต่างกันดังตารางที่ 1 โดยแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่มีขนาดอยู่ระหว่าง 250 – 2000 คู่เบส ซึ่งไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ ไพรเมอร์ OPX7 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ ส่วนไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือไพรเมอร OPS10 และ OPX12

ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1 แถบ และไพรเมอร์ OPS10, OPP2, OPX11 และ OPX12 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกระเทียมและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์

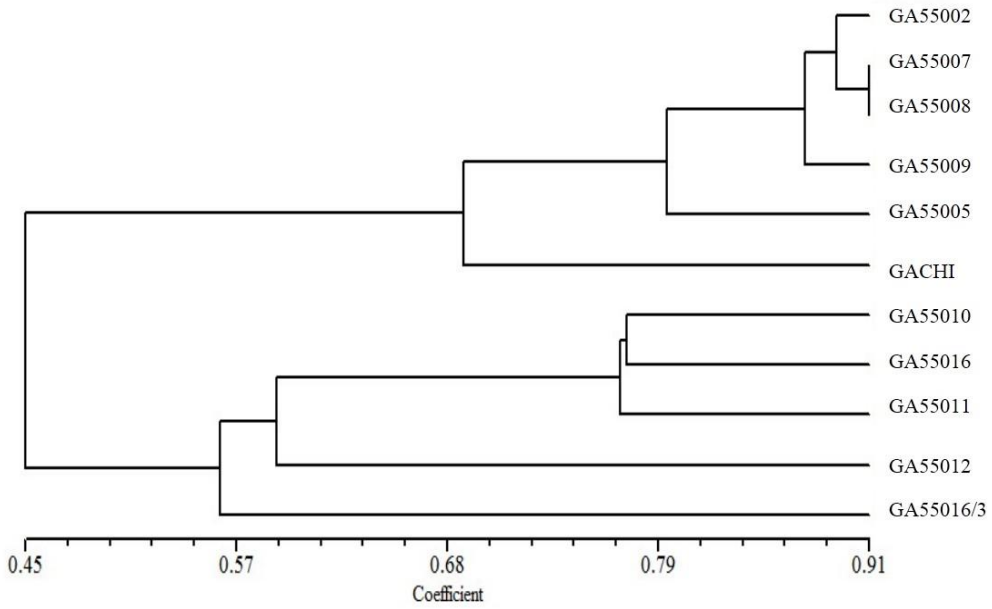
ลำดับที่	ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	ลำดับที่	ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ
1	OPS1	6	41	OPF6	2
2	OPS3	3	42	OPF7	5
3	OPS5	5	43	OPF9	6
4	OPS6	6	44	OPF10	5
5	OPS7	6	45	OPF12	6
6	OPS8	3	46	OPF16	6
7	OPS9	4	47	OPC5	7
8	OPS10	1	48	OPC7	3
9	OPP1	7	49	OPC8	4
10	OPP2	2	50	OPC9	6
11	OPP3	5	51	OPC11	4
12	OPP4	5	52	OPC15	3
13	OPP5	5	53	OPC20	4
14	OPP6	5	54	OPX1	6
15	OPP7	5	55	OPX4	4
16	OPP8	6	56	OPX6	4
17	OPP9	5	57	OPX7	8
18	OPP10	2	58	OPX11	2
19	OPQ1	4	59	OPX12	1
20	OPQ2	5	60	OPX13	7
21	OPQ3	5	61	OPX17	6
22	OPQ4	4	62	OPX18	4
23	OPQ5	5	63	OPX19	4
24	OPQ6	4	64	OPY1	5
25	OPQ8	6	65	OPY2	5
26	OPQ9	5	66	OPY4	5
27	OPQ10	6	67	OPY14	4
28	OPN1	4	68	OPY15	5
29	OPN2	5	69	OPY16	5
30	OPN3	5	70	OPY17	5
31	OPN4	4	71	OPY18	5
32	OPN5	4	72	OPY20	3
33	OPN6	6	73	OPS2	5
34	OPN7	4	74	OPS4	7
35	OPN8	2	75	OPQ7	6

36	OPN9	6	76	OPF1	5
37	OPN10	7	77	OPF13	7
38	OPF3	5	78	OPF19	4
39	OPF4	7	79	OPC12	2
40	OPF5	5	80	OPC19	5

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของกระเทียม โดยข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอหรือปรากฏแถบดีเอ็นเอแต่ละขนาด พบว่าเมื่อนำมาหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน โดยใช้โปรแกรม NTSYS pc 2.1 เพื่อจัดกลุ่มและการสร้างเดนโดรแกรมพบว่า สามารถจัดกลุ่มของกระเทียมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.45 (ภาพที่ 1) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีความหลากหลายของสายพันธุ์กระเทียมมากกว่า ประกอบด้วยกระเทียม 6 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ GA55002, GA55007, GA55008, GA55009, GA55005 และสายพันธุ์ GACHI โดยที่กระเทียมสายพันธุ์ GA55007 และ GA55008 มีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด เท่ากับ 0.91 ถือว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์มีแหล่งที่มาจาก จังหวัดศรีสะเกษเหมือนกัน เช่นเดียวกับกระเทียมสายพันธุ์ GA55002, GA55009, GA55005 ก็มีแหล่งที่มาจาก จังหวัดศรีสะเกษเหมือนกัน ส่วนสายพันธุ์ GACHI เป็นกระเทียมจีน มีแหล่งที่มาจากประเทศจีน จึงมีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่น้อยกับสายพันธุ์อื่นๆ ภายในกลุ่มคือมีค่าเท่ากับ 0.62-0.72

กลุ่มที่ 2 มีความหลากหลายของสายพันธุ์กระเทียมน้อยกว่า ประกอบด้วยกระเทียม 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ GA55010, GA55016, GA55011, GA55012 และ GA55016/3 ซึ่งมีแหล่งที่มาจาก จังหวัดลำพูน พะเยา เชียงราย พะเยา และพะเยา ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีแหล่งเพาะปลูกอยู่ในภาคเหนือทั้งหมดและมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แยกออกมาจากกระเทียมจากแหล่งเพาะปลูกอื่นๆ อย่างชัดเจน



	GA55002	GA55005	GA55007	GA55008	GA55009	GA55010	GA55011	GA55012	GA55016	GA55016/3	GACHI
GA54002	1.00										
GA54005	0.83	1.00									
GA54007	0.90	0.78	1.00								
GA54008	0.88	0.78	0.91	1.00							
GA54009	0.88	0.80	0.88	0.87	1.00						
GA55010	0.50	0.47	0.50	0.50	0.52	1.00					
GA55011	0.48	0.47	0.49	0.49	0.48	0.78	1.00				
GA55012	0.40	0.43	0.37	0.39	0.39	0.59	0.60	1.00			
GA55016	0.50	0.45	0.50	0.49	0.50	0.78	0.77	0.57	1.00		
GA55016/3	0.45	0.43	0.44	0.43	0.42	0.60	0.59	0.47	0.57	1.00	
GACHI	0.70	0.62	0.72	0.72	0.70	0.47	0.42	0.38	0.46	0.40	1.00

ภาพที่ 1 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกระเทียมทั้งหมด 11 สายพันธุ์

ตารางที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์ความหมือนของลักษณะทางพันธุกรรมของกระเทียมที่นำมาศึกษา

จากตารางที่ 3 พบว่า กระเทียมสายพันธุ์ GA55007 กับ GA55008 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ใกล้กันมากที่สุดเท่ากับ 0.91 โดยทั้งสองสายพันธุ์มาจากจังหวัดศรีสะเกษ แสดงว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมาก และกระเทียมสายพันธุ์ GA55007 กับ GA55012 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ใกล้กันน้อยที่สุด เท่ากับ 0.37 โดยสายพันธุ์ GA55012 มีแหล่งที่มาจากจังหวัดลำปาง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระเทียมจากแหล่งปลูกต่างๆในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค RAPD เพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเทียมเปรียบเทียบกับกระเทียมจีน ดำเนินการในตัวอย่างกระเทียม 11 ตัวอย่าง ผลการศึกษาสามารถแบ่งกระเทียมออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของกระเทียมจากจังหวัดศรีสะเกษ 5 ตัวอย่าง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง 0.78-0.91 ซึ่งมีความใกล้ชิดกันมากที่สุด

และเกษตรกรมีการเก็บหัวพันธุ์ไว้ปลูกเอง สำหรับกระเทียมจีนก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้เช่นกัน แต่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนน้อยที่สุดกับกระเทียมในกลุ่ม และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยกระเทียมจากแหล่งปลูกในภาคเหนือทั้งหมด ได้แก่ ลำพูน เชียงราย ลำปางและพะเยา โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง 0.47-0.78 ซึ่งกระเทียมสายพันธุ์ GA55016/3 มีค่าความเหมือนน้อยที่สุดกับกระเทียมสายพันธุ์ GA55012 จากจังหวัดลำปาง โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 0.47

การที่กระเทียมของแหล่งปลูกจากจังหวัดศรีสะเกษ มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากกระเทียมของแหล่งอื่นๆ เนื่องจากในการปลูกกระเทียม เกษตรกรส่วนมากเก็บหัวพันธุ์ไว้ใช้เอง ไม่มีการซื้อหัวพันธุ์จากแหล่งอื่นเข้ามาปลูก ซึ่งนอกจากการปลูกกระเทียมในสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน จะทำให้เกิดความแตกต่างของลักษณะทางกายภาพแล้ว การปลูกกระเทียมจากหัวพันธุ์โดยไม่มีการผสมพันธุ์เป็นเวลานาน ทำให้สายพันธุ์กระทียมจากแต่ละแหล่งปลูกมีความแตกต่างกันทั้งทางพันธุกรรมด้วย ดังนั้นการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเทียม สามารถสรุปได้ว่า กระเทียมจากจังหวัดศรีสะเกษมีลักษณะแตกต่างจากระเทียมในแหล่งปลูกอื่นๆ

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ อ.ดร.จิรวัฒน์ สนิทชน สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอและคำปรึกษาด้านวิชาการ

เอกสารอ้างอิง

กระเทียม (ออนไลน์). 2553. สืบค้นจาก: http://www.the-than.com/samonpai/sa_12.html[22 เมษายน 2553].

คุณประโยชน์ของกระเทียม (ออนไลน์) 2557. สืบค้นจาก: http://www.thaikasetsart.com [21 เมษายน 2557].

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19: 11 – 15.

Ebrahini, R., Z. Zamani and A. Kashi. 2009. Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD markers. Scientia Horticulturae. 119: 345-351.

Meryem, I and A. Ipek. 2003. Comparison of AFLPs, RAPD marker, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. Amer. Soc. Hort. Sci. 128 (2): 246-252.