รายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. **แผนงานวิจัย** วิจัยและพัฒนาการผลิตพืชเศรษฐกิจเฉพาะพื้นที่ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน
2. **โครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตกล้วยเล็บมือนางในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน
   กิจกรรมที่ 3 การศึกษาพันธุกรรมของกล้วยเล็บมือนางในระดับดีเอ็นเอ
3. **ชื่อการทดลองที่ (ภาษาไทย)** 3.1 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการจำแนกกล้วยเล็บมือนางด้วยเทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) DNA fingerprinting and Identification of *Musa,* AA group 'Kluai leb mu nang' Using Inter Simple Sequence Repeat Technique

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

นายอุดมพร เสือมาก[1] นายสมคิด ดำน้อย[2]

นางสาวสุธีรา ถาวรรัตน์[3] นางสาวอรุโณทัย ซาววา[4]

5. **บทคัดย่อ**

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยเล็บมือนาง (*Musa,* AA group 'Kluai leb mu nang') จำนวน 21 ตัวอย่าง ร่วมกับ กล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยป่า และกล้วยน้ำว้า ด้วยเครื่องหมาย ISSR พบว่า จากการทดสอบไพรเมอร์ จำนวน 64 ชนิด มีไพรเมอร์ 23 ชนิด ที่ให้แถบดีเอ็นเอในช่วง 4-15 แถบ จึงได้นำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 236 แถบ มีแถบดีเอ็นเอต่าง จำนวน 218 แถบ (92.37%) ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) อยู่ระหว่าง 0.40 ถึง 0.99 เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างกล้วยด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) สามารถจำแนกกล้วยเล็บมือนางทั้ง 21 ตัวอย่าง เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 001 002 003 004 006 007 008 009 010 011 012 013 015 016 017 018 และ 021 สำหรับกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 005 014 019 และ 020 นอกจากนี้ยังสามารถแยกกล้วยเล็บมือนางออกจากกล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยป่า และกล้วยน้ำหว้าอย่างชัดเจน ซึ่งผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงให้เห็นว่ากล้วยเล็บมือนางมีความใกล้ชิดกับกล้วยหอมมากที่สุด เมื่อเทียบกับกล้วยไข่ กล้วยป่า และกล้วยน้ำว้า

The DNA fingerprinting was studied in 21 samples of *Musa,* AA group 'Kluai Leb Mu Nang' with *Musa* (AAA group) 'Kluai Hom', *Musa* (AAgroup) 'Kluai Khai', *Musa acuminate* Colla, and *Musa* (ABB group) 'Kluai Namwa' using ISSR technique. The 64 ISSR primers were used for screening the amplified DNA bands. Twenty-three primers were used for amplification, which generated 4-15 bands, and selected for diversity diagnostics among 25 banana samples. A total

of primers yielded 236 DNA fragments, of which 218 (92.37%) were found to be polymorphic bands. The similarity index ranged from 0.40 to 0.99. The dendogram was generated by unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) method, Kluai Leb Mu Nang clustered to two groups. First group was clustered the samples of 001 002 003 004 006 007 008 009 010 011 012 013 015 016 017 018 and 021 together. The samples of 005 014 019 and 020 clustered in the second group. Moreover, the Kluai Hom, Kluai Khai, *Musa acuminate* Colla, and Kluai Namwa were out group with Kluai Leb Mu Nang, it's closer related to Kluai Hom than the other.

รหัสการทดลอง 02-17-59-01-03-00-01-59

[1/] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรชุมพร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7

[2/] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกระบี่ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7

[3/] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7

[4/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

6. คำนำ

กล้วยเล็บมือนาง มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Musa* (AA group) ชื่อสามัญ Kluai Leb Mu Nang ทั่วไปเรียกกล้วยเล็บมือนาง เป็นพืชเศรษฐกิจท้องถิ่นทางภาคใต้ของประเทศไทย โดยเฉพาะจังหวัดชุมพร และนครศรีธรรมราช (Srangsam and Kanchanapoom, 2007) ชื่อทางภาคใต้จะเรียกหลากหลาย ได้แก่ กล้วยเล็บมือ (ชุมพร และสุราษฎร์ธานี) กล้วยข้าว (พังงา และภูเก็ต) กล้วยทองดอกหมาก (พัทลุง) กล้วยกินดิบ (กล้วยเล็บมือนางที่มีขน) กล้วยหมาก (กล้วยเล็บมือนางที่ไม่มีขน) เป็นต้น มีถิ่นกำเนิดในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อาทิ พม่า ไทย กัมพูชา มาเลเซีย อินโดเนีย และฟิลิปปินส์ เป็นกล้วยประจำท้องถิ่นของภาคใต้ที่ได้รับความนิยมมาก เนื่องจากผลกล้วยมีลักษณะเรียวเล็ก ทำให้มีขนาดเหมาะแก่การเคี้ยว ผลมีสีเหลืองทอง เนื้อมีความนุ่มคล้ายกับกล้วยหอม มีรสหวาน และมีกลิ่นหอม สายพันธุ์กล้วยเล็บมือนางที่พบในภาคใต้ แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กาบใบสีเขียวผลไม่มีขน กาบใบสีเขียวผลมีขน กาบใบสีเขียวปนแดงผลไม่มีขน กาบใบสีเขียวปนแดงผลมีขน กาบใบสีแดงผลไม่มีขน และกาบใบสีแดงผลมีขน สายพันธุ์ที่ผลมีขน พบขนเกิดขึ้นตั้งแต่ผลยังอ่อน และคงอยู่จนผลแก่ ผลดิบจะมีขนอ่อนสีขาว แล้วค่อยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมากขึ้นตามอายุผล ทำให้ผลกล้วยที่สุกมีสีเหลืองปนน้ำตาลหรือสีเหลืองอ่อน ซึ่งสีจะเข้มมากว่าสายพันธุ์ที่ไม่มีขน สายพันธุ์กาบใบสีเขียวพบทุกจังหวัดในภาคใต้ตอนบน กาบใบสีแดงพบมากที่จังหวัดชุมพร และพังงา และกาบใบสีเขียวปนแดงพบมากที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ภูเก็ต พังงาและสุราษฎร์ธานี ส่วนลักษณะผล พบผลมีขนที่จังหวัดนครศรีธรรมราช และภูเก็ต ซึ่งเป็นลักษณะที่นิยมของตลาดในพื้นที่ เนื่องจากมีรสชาติหวาน เนื้อแน่น ส่วนผลไม่มีขนพบทุกจังหวัดที่ทำการสำรวจ และเป็นที่นิยมของตลาดในพื้นที่จังหวัดชุมพร และสุราษฎร์ธานี (อาพร และคณะ, 2557)

กล้วยเล็บมือนางจัดอยู่ในกลุ่มกล้วยที่เป็นพันธุ์แท้ของกล้วยป่าหรือพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ไปจากพันธุ์แท้ แต่ยังมีลักษณะพันธุ์แท้อยู่มาก ลำต้นเทียมสูงไม่เกิน 2.5 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 15 เซนติเมตร กาบลำต้นด้านนอกเป็นสีชมพูอมแดงมีปื้นดำ ด้านในเป็นสีชมพูอมแดง ก้านใบสีชมพูอมแดงตั้งขึ้น มีร่องกว้าง มีครีบเส้นกลางใบเป็นสีชมพุอมแดง เนื้อใบหนา สีเขียวสด ก้านช่อดอกมีขน ในประดับเป็นรูปไข่ค่อยข้างยาว ม้วนงอขึ้นปลายแหลม ด้านบนสีแดงอมม่วง ด้านล่างสีแดงซีด เครือหนึ่งมี 7-8 หวี หวีหนึ่งมี 10-16 ผล ลักษณะผลเล็กกว้าง 2-2.5 เซนติเมตร ยาว 11-12 เซนติเมตร รูปผลโค้งงอ ปลายเรียวยาวคล้ายนิ้วมือดูสวยงาม จึงถูกตั้งชื่อตามลักษณะว่า “กล้วยเล็บมือนาง” ก้านผลสั้น เปลือกผลหนา เมื่อสุกเป็นสีทองเหลืองและมีก้านเกสรเพศเมียติด เป็นที่รู้จักของคนทั่วไปโดยเฉพาะคนภาคใต้ เนื่องจากเป็นกล้วยปลูกเฉพาะถิ่น และนิยมรับประทานกันแพร่หลายทั้งแบบสุกและแบบดิบ โดยผลดิบสามารถนำไปผ่าปอกเปลือกหั่นเนื้อในเป็นชิ้นเล็กๆ ปรุงรวมกับแกงไตปลา แกงเหลือง รสชาติอร่อย ส่วนผลสุกจะมีรถหอมหวานเป็นเอกลักษณ์ไม่เหมือนกล้วยชนิดใด นิยมซื้อเป็นของฝากซึ่งก็เป็นสัญลักษณ์อีกอย่างหนึ่งของชาวภาคใต้ (วันดี, 2554)

ในปี 2558 กล้วยเล็บมือนางมีพื้นที่ปลูกทั้งสิ้น 9,557 ไร่ จำนวนผู้ปลูก 2,265 ราย พื้นที่ปลูก 9 จังหวัด ผลผลิตรวม 13,074 ตัน ผลผลิตต่อไร่ 1,654 กิโลกรัม ราคาขายต่อกิโลกรัม 5.66 บาท ปลูกมากที่สุดในจังหวัดชุมพร มีเนื้อที่ถึง 8,968 ไร่ (กุหลาบ, 2559) ตั้งแต่ปี 2554-2557 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรชุมพร ได้สำรวจและรวบรวมสายต้นกล้วยเล็บมือนางในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน และจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และนิเวศวิทยา ได้ 21 สายต้น คือ 001, 002, 003, 004, 005, 006, 007, 008, 009, 010, 011, 012, 013, 014, 015, 016, 017, 018, 019, 020 และ 021 รายละเอียดดังตารางที่ 1 (อุดมพร และคณะ, 2557)

ตารางที่ 1 แหล่งปลูกเดิม และลักษณะบางประการของกล้วยเล็บมือนาง 21 สายต้น

สายต้น	แหล่งปลูกเดิม	สีกาบใบ	การมีขนที่ผล	ผลผลิตจำนวนหวี/เครือ
001	อ.ปะทิว จ.ชุมพร	แดง	ไม่มี	8
002	อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	เขียว	ไม่มี	10
003	อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	เขียวปนแดง	ไม่มี	9
004	อ.สวี จ.ชุมพร	เขียวปนแดง	ไม่มี	8
005	อ.สวี จ.ชุมพร	แดง	ไม่มี	10
006	อ.ทุ่งตะโก จ.ชุมพร	เขียว	ไม่มี	10
007	อ.ทุ่งตะโก จ.ชุมพร	เขียวปนแดง	ไม่มี	9
008	อ.สวี จ.ชุมพร	เขียว	ไม่มี	12
009	อ.หลังสวน จ.ชุมพร	เขียวปนแดง	ไม่มี	8
010	อ.นาสาร จ.สุราษฎร์ธานี	แดง	ไม่มี	8
011	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	เขียว	ไม่มี	10
012	อ.บ้านตาขุน จ.สุราษฎร์ธานี	เขียวปนแดง	ไม่มี	8
013	อ.พรหมคีรี จ.นครศรีธรรมราช	เขียว	มี	8

สายต้น	แหล่งปลูกเดิม	สีกาบใบ	การมีขนที่ผล	ผลผลิตจำนวนหวี/เครือ
014	อ.พรหมคีรี จ.นครศรีธรรมราช	แดง	มี	7
015	อ.นพพิตำ จ.นครศรีธรรมราช	เขียว	ไม่มี	9
016	อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช	แดง	ไม่มี	7
017	อ.กะปง จ.พังงา	เขียวปนแดง	ไม่มี	9
018	อ.กะปง จ.พังงา	เขียว	ไม่มี	8
019	อ.กะปง จ.พังงา	แดง	ไม่มี	8
020	อ.กะทู้ จ.ภูเก็ต	เขียว	ไม่มี	10
021	อ.ถลาง จ.ภูเก็ต	แดง	มี	7

ที่มา : อุดมพร และคณะ, 2557

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรชุมพร ได้นำกล้วยเล็บมือนางทั้ง 21 สายต้น ปลูกเปรียบเทียบในพื้นที่ของศูนย์ฯ พบว่าสายต้น 008 ให้ผลผลิตสูงสุด น้ำหนัก 5.90 กิโลกรัม/เครือ มีจำนวนหวี 8.30 หวี/เครือ การเจริญเติบโตทั้งความสูง และเส้นรอบวงลำต้นดีมาก 238 และ 50.1 เซนติเมตรตามลำดับ ส่วนความหวาน (25.4 บริกซ์) ไม่แตกต่างกับสายต้นอื่น เหมาะที่จะพัฒนาเป็นกล้วยเล็บมือนางสำหรับการแปรรูป ส่วนสายต้น 015 ให้ความแน่นเนื้อสูงสุด 5.30 นิวตัน รสชาติอร่อย เหมาะที่จะพัฒนาเป็นพันธุ์รับประทานผลสด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโต ผลผลิต และคุณภาพผลผลิตกล้วยเล็บมือนาง ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรชุมพร ปี 2555-2557

สายต้น	ความสูง (ซม.)	เส้นรอบวงลำต้น (ซม.)	อายุการเก็บเกี่ยว (วัน)	น้ำหนักเครือ (กก.)	จำนวนหวี/เครือ (หวี)	ความหวาน (บริกซ์)	ความแน่นเนื้อ (นิวตัน)
001	208ab	42.4abc	56.3a-d	4.59abc	7.67ab	25.9a	2.90b
002	218a	42.5abc	57.4a-d	4.98Ab	7.44ab	26.4a	2.90b
003	216ab	44.7ab	59.8d	4.03Bc	7.44ab	25.1ab	2.87b
004	180ab	35.0bc	54.3abc	3.32 C	6.55b	26.8a	2.81b
005	164ab	35.6abc	58.9Cd	3.87Bc	7.33ab	26.3a	3.40ab
006	233a	42.5abc	53.4Ab	3.63Bc	7.22ab	26.4a	3.50ab
007	218a	41.7abc	57.0a-d	4.53abc	7.56ab	25.0ab	2.90b
008	238a	50.1a	55.9a-d	5.87A	8.34a	25.4ab	2.93b
009	139b	28.8c	59.4Cd	3.73bc	7.11ab	25.3ab	3.57ab
010	199ab	34.1bc	56.9a-d	3.27c	6.66b	26.4a	3.50ab
011	174ab	35.2bc	53.6Ab	3.72bc	7.11ab	26.6a	2.93b

สายต้น	ความสูง (ซม.)	เส้นรอบวงลำต้น (ซม.)	อายุการเก็บเกี่ยว (วัน)	น้ำหนักเครือ (กก.)	จำนวนหวี/เครือ (หวี)	ความหวาน (บริกซ์)	ความแน่นเนื้อ (นิวตัน)
012	213ab	39.9abc	55.4a-d	3.31c	6.67b	25.7a	2.93b
013	182ab	40.3abc	55.8a-d	3.97bc	7.44ab	26.8a	3.38ab
014	207ab	40.9 abc	56.4a-d	3.83bc	6.89ab	26.6a	3.90ab
015	198ab	40.4 abc	54.8a-d	3.49bc	7.00ab	24.9ab	5.33a
016	189ab	34.6bc	58.5bcd	3.07c	6.67b	26.2a	3.15b
017	175ab	32.7bc	53.0A	4.20bc	7.22ab	25.7a	3.83ab
018	192ab	41.4abc	55.0a-d	3.36c	7.22ab	24.7ab	2.53b
019	166ab	41.4abc	56.3a-d	4.12bc	7.33ab	26.0a	2.57 b
020	195ab	40.5abc	53.6Ab	4.02bc	7.22ab	22.5b	3.14b
021	199ab	35.6abc	56.7a-d	4.12bc	7.44ab	25.4ab	3.06b
ค่าเฉลี่ย	195	39.1	56.1	3.95	7.2	25.7	3.24
CV. (%)	15.28	14.35	4.71	25.99	9.11	6.26	24.52

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

ที่มา : อุดมพร และคณะ, 2557

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger printing) เริ่มขึ้นตั้งแต่ปี 1988 ด้วยวิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นด้วยเทคนิคการโพรบจับดีเอ็นเอ (southern blot) ร่วมกับเทคนิคการตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ที่เรียกว่า Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) หลังจากนั้นได้พัฒนาการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยอาศัยพื้นฐานและหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุล Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) และ Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) (Weising *et al*., 2005) การใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 เทคนิคมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และความต้องการใช้งานของผู้ใช้ เทคนิค AFLP เป็นวิธีที่ให้แถบดีเอ็นเอต่าง (polymorphism) ที่มากที่สุด แต่มีขั้นตอนที่ซับซ้อนมากกว่าและสารเคมีที่ใช้ค่อนข้างอันตรายกว่าเทคนิค RAPD และ ISSR อย่างไรก็ตามเทคนิค ISSR สามารถทำซ้ำได้ดีกว่าเทคนิค RAPD เนื่องจาก ISSR เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในส่วนของลำดับเบสซ้ำบนโครโมโซมของพืชที่มีความยาวอยู่ในช่วง 15-19 เบส ซึ่งยาวกว่าเครื่องหมาย RAPD ที่มีความยาวเพียง 10 เบส (Manimekalai *et al*., 2006) นอกจากนี้เครื่องหมาย ISSR ยังให้แถบดีเอ็นเอต่างที่สูงกว่า RAPD เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างดีเอ็นเอเดียวกัน (Kuras *et al*., 2004; Costa *et al*., 2016) ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้นำเอาเทคนิค ISSR มาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นของ

กล้วยเล็บมือนางที่เก็บรวบรวมไว้ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรชุมพร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7 กรมวิชาการเกษตร เพื่อช่วยในการอนุรักษ์สายพันธุ์ท้องถิ่นและวางแผนการปรับปรุงพันธุ์กล้วยเล็บมือนางต่อไป

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

<u>อุปกรณ์</u>

1. สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุล ได้แก่ CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), เจลอะกาโรส (Agarose gel), TBE Buffer, Taq DNA Polymerase, DNA Ladder และ Edthidium Bromide ฯลฯ
2. วัสดุวิทยาศาสตร์และวัสดุห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Thermal Paper, ถุงมือ, Mask, โกร่ง, หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร, หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร, หลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร, ไปเปตทิปขนาดต่างๆ, ขวดดูแรน ฯลฯ
3. เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
6. ชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)
7. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

<u>วิธีดำเนินการ</u>

1. การเตรียมตัวอย่างกล้วยและการสกัดดีเอ็นเอ

นำใบกล้วย จำนวน 25 ตัวอย่าง คือ กล้วยเล็บมือนาง 001, กล้วยเล็บมือนาง 002, กล้วยเล็บมือนาง 003, กล้วยเล็บมือนาง 004, กล้วยเล็บมือนาง 005, กล้วยเล็บมือนาง 006, กล้วยเล็บมือนาง 007, กล้วยเล็บมือนาง 008, กล้วยเล็บมือนาง 009, กล้วยเล็บมือนาง 010, กล้วยเล็บมือนาง 011, กล้วยเล็บมือนาง 012, กล้วยเล็บมือนาง 013, กล้วยเล็บมือนาง 014, กล้วยเล็บมือนาง 015, กล้วยเล็บมือนาง 016, กล้วยเล็บมือนาง 017, กล้วยเล็บมือนาง 018, กล้วยเล็บมือนาง 019, กล้วยเล็บมือนาง 020, กล้วยเล็บมือนาง 021, กล้วยหอม, กล้วยไข่, กล้วยป่า และกล้วยน้ำหว้า มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีของอรุโณทัยและคณะ (2552) ดังนี้

เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide)] เติม 0.2% β-mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งใบกล้วย 5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Choroform:Isoamyl alcohol(24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000

รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Choroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAC 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นด้วยไพรเมอร์ ISSR เพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ทดสอบไพรเมอร์ ISSR จำนวนทั้งหมด 64 ไพรเมอร์ โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร 10x PCR buffer($(NH_4)_2SO_4$) 2 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (5 uM) 2 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง themal cycle Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 50-55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส (electropholesis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD) นำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์ผล โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนน 0 และปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนน 1 แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.1 ตามวิธีการของ Rohlf (2000)

<u>ระยะเวลาการทดลอง</u> (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2560 รวม 1 ปี

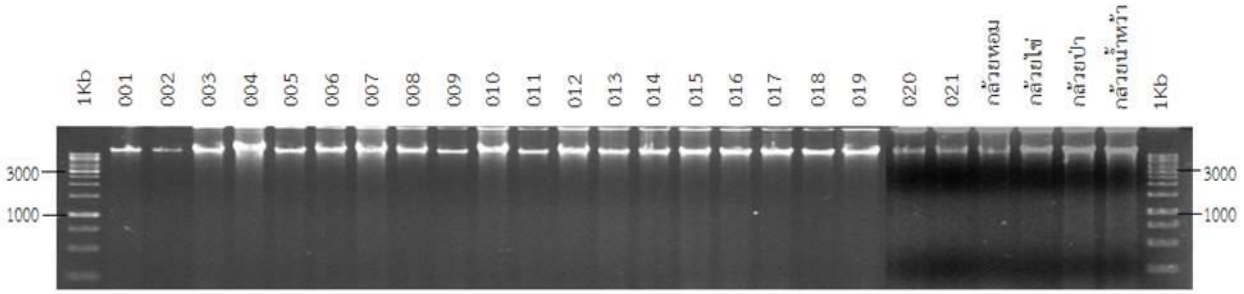
<u>สถานที่ดำเนินการทดลอง</u>

ห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของกล้วย จำนวน 25 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CTAB เมื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร บนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่กระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ นาน 30 นาที พบว่า วิธีการนี้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดี และมีปริมาณมาก (ภาพที่ 1) แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB มีความเหมาะสมในการเป็นต้นแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี ISSR-PCR ของตัวอย่างกล้วย อย่างไรก็ตาม Shankar และคณะ (2011) พบว่า วิธี CTAB หากทำการสกัดในใบแก่ของกล้วยที่มีสารโพลีแซคคาไลด์หรือโพลีฟีนอลสูง ให้เพิ่มปริมาณเกลือและสาร polyvinyl pyrrolidone (PVP) จะทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์และมีคุณภาพมากขึ้น



ภาพที่ 1 ดีเอ็นเอของกล้วยจำนวน 25 ตัวอย่าง คือ กล้วยเล็บมือนาง 001-021, กล้วยหอม, กล้วยไข่, กล้วยป่า และกล้วยน้ำหว้า ที่สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR

เครื่องหมายโมเลกุล ISSR เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและนิยมนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วย (Silva *et al*., 2017) ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบไพรเมอร์ชนิด ISSR จำนวน 64 ไพรเมอร์ ด้วยการรวมดีเอ็นเอของกล้วยทั้ง 25 ตัวอย่าง พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยได้ 41 ไพรเมอร์ แต่มีเพียง 23 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนตั้งแต่ 4 แถบขึ้นไป จึงถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างกล้วยในการทดลองนี้ (ภาพภาคผนวก 1-3) จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 236 แถบ มีแถบดีเอ็นเอต่าง 218 แถบ คิดเป็น 92.37% ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 100-1,400 คู่เบส (bp, base pair) ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ UBC835 และ UBC810 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 15 แถบ (ภาพที่ 2) ซึ่ง UBC 835 มีแถบดีเอ็นเอต่างคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ UBC 810 มีแถบดีเอ็นเอต่าง 14 แถบ คิดเป็น 93.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไพรเมอร์ UBC822 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 4 แถบ แต่ให้แถบดีเอ็นต่าง 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) จากการทดลองของ Lamare และ Rao (2015) รายงานถึงเทคนิคการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยป่า (*Musa acuminate* colla) ที่เก็บรักษาไว้ในแปลงอนุรักษ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD ISSR และ DAMD พบว่า ไพรเมอร์ของเทคนิค ISSR ให้แถบดีเอ็นเอต่างมากกว่าในเทคนิคอื่น และไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุด

คือ UBC835 คิดเป็นแถบดีเอ็นเอต่าง 100 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทดลองนี้ที่ทำการศึกษาในกล้วยเล็บมือนางและมีกล้วยป่าเป็นตัวเปรียบเทียบและให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุด นอกจากนี้ยังรายงานไว้ว่าค่าดัชนีความเหมือนของ ISSR สูงกว่า RAPD จึงแสดงให้เห็นว่าเทคนิค ISSR เหมาะสมกับการประเมินความหลากทางพันธุกรรมของกล้วยมากกว่าเทคนิค RAPD อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ UBC835 ไม่ได้ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดในกล้วยทุกสายพันธุ์ เนื่องจาก Das และคณะ (2018) พบว่า ในกล้วยไฮบริด UBC835 ให้แถบดีเอ็นเอเพียง 7 แถบ แต่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอสูงสุดคือ UBC811 (GAG AGA GAG AGA GAG AC) ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอสูงสุดถึง 18 แถบ สำหรับการทดลองนี้ไม่ได้นำไพรเมอร์นี้มาทดสอบ แต่ไพรเมอร์ดังกล่าวมีความน่าสนใจในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมหากมีการศึกษาในกล้วยเล็บมือนางต่อไปในอนาคต

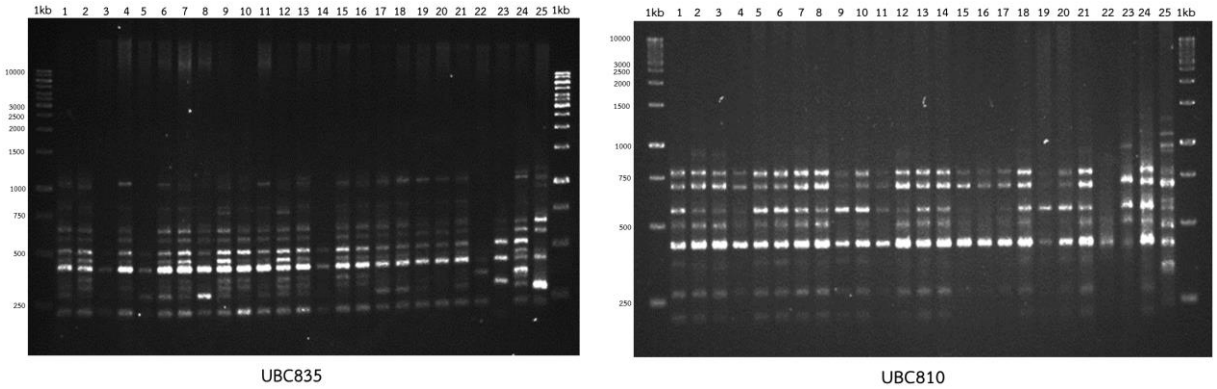
ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ชนิด ISSR ที่ใช้ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของกล้วยเล็บมือนาง

ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5’-3’)	Ta (°C)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ		
				ทั้งหมด	แบนต่าง	% polymorphism
1.	UBC807	5’-AGA GAG AGA GAG AGA GT-3’	50	9	9	100
2.	UBC810	5’-GAG AGA GAG AGA GAG AT-3’	50	15	14	93.33
3.	UBC814	5’-CTC TCT CTC TCT CTC TA-3’	55	8	8	100
4.	UBC836	5’-AGA GAG AGA GAG AGA GYA-3’	50	11	10	90.91
5.	UBC856	5’-ACA ACA ACA CAC ACA CYA-3’	55	8	8	100
6.	UBC861	5’-ACC ACC ACC ACC ACC ACC-3’	50	10	10	100
7.	UBC889	5’-DBD ACA CAC ACA CAC AC-3’	55	11	8	72.73
8.	(AGC)5AY	5’-AGC AGC AGC AGC AGC AY-3’	55	12	12	100
9.	(AGC)5Y	5’-GCT GCT GCT GCT GCT Y-3’	50	11	10	90.91
10.	UBC822	5’-TCT CTC TCT CTC TCT CTC A-3’	50	4	4	100
11.	UBC824	5’-TCT CTC TCT CTC TCT CTC G-3’	50	8	7	87.50
12.	UBC866	5’-CTC CTC CTC CTC CTC CTC-3’	55	9	8	88.89
13.	UBC808	5’-AGA GAG AGA GAG AGA GC-3’	55	12	10	83.33
14.	UBC818	5’-CAC ACA CAC ACA CAC AG-3’	55	11	10	90.91
15.	UBC880	5’-GGA GAG GAG AGG AGA-3’	50	11	11	100
16.	UBC888	5’-BDB CAC ACA CAC ACA CA-3’	55	14	12	85.71
17.	UBC890	5’-VHV GTG TGT GTG TGT GT-3’	55	14	14	100
18.	UBC891	5’-HVH TGT GTG TGT GTG TG-3’	50	11	9	81.82
19.	(ATG)6G	5’-ATG ATG ATG ATG ATG ATG G-3’	55	13	13	100
20.	UBC835	5’-AGA GAG AGA GAG AGA GY-3’	50	15	15	100
21.	UBC843	5’-CTC TCT CTC TCT CTC TRA-3’	50	5	5	100
22.	UBC817	5’-CAC ACA CAC ACA CAC AA-3’	50	6	5	83.33

23.	(CAG)5	5’-CAG CAG CAG CAG CAG-3’	50	10	9	90

Degenerated primers: B=(C,G,T), D=(A,G,T), Y=(C,T), R=(A,G), V=(A,C,G), H=(A,C,T)

*Ta = annealing temperatures



ภาพที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR ได้แก่ UBC835 และ UBC810 บนเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์

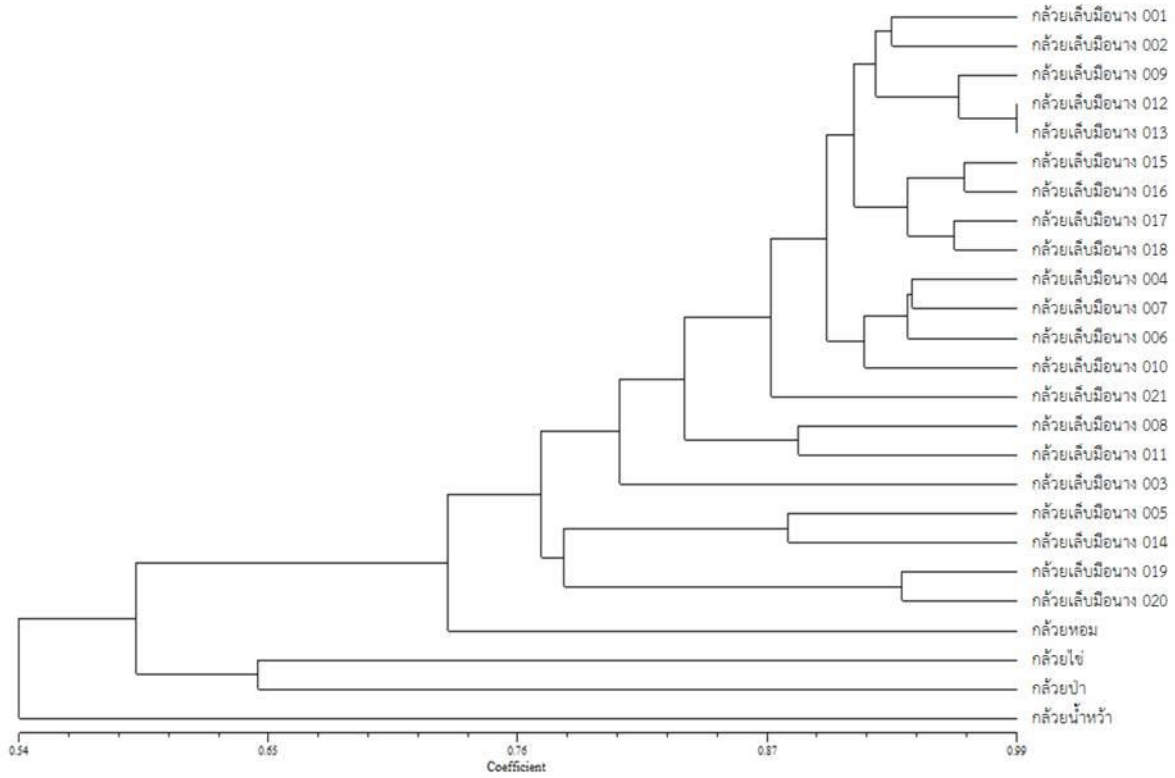
3. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยเล็บมือนาง

ผลจากการวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.1 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) พบว่า สามารถจำแนกกล้วยเล็บมือนางทั้ง 21 ตัวอย่าง เป็น 2 กลุ่มหลัก กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 001 002 003 004 006 007 008 009 010 011 012 013 015 016 017 018 และ 021 สำหรับกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 005 014 019 และ 020 นอกจากนี้ยังสามารถแยกกล้วยเล็บมือนางออกจากกล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยป่า และกล้วยน้ำหว้า อย่างชัดเจน ซึ่งผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยเล็บมือนางแสดงให้เห็นว่ามีความใกล้ชิดกับกล้วยหอมมากที่สุดเมื่อเทียบกับกล้วยไข่ กล้วยป่า และกล้วยน้ำว้า (ภาพที่2) จากแผนภูมิความสัมพันธ์จะเห็นได้ว่าการแบ่งกลุ่มของทุกตัวอย่างจะแยกออกจากกล้วยน้ำหว้า ซึ่งการแบ่งกลุ่มสอดคล้องกับจีโนมของกล้วย เนื่องจากกล้วยน้ำว้ามีจีโนม ABB ส่วนตัวอย่างที่เหลือประกอบด้วยกล้วยที่มีจีโนม AA และ AAA (ตารางที่ 4) เมื่อวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างกล้วยทั้ง 25 ตัวอย่าง ค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์มีค่าอยู่ระหว่าง 0.40 ถึง 0.99 (ภาพที่ 3) โดยกล้วยเล็บมือนาง 012 และกล้วยเล็บมือนาง 013 มีค่าดัชนีความเหมือนมากที่สุดคือ 0.99 ในขณะที่กล้วยน้ำหอมและกล้วยน้ำหว้ามีค่าดัชนีความเหมือนน้อยที่สุดคือ 0.40

ตารางที่ 4 ลักษณะจีโนมของกล้วยแต่ละชนิด

ตัวอย่างกล้วย	ลักษณะจีโนม	เอกสารอ้างอิง
1. กล้วยเล็บมือนาง (*Musa* ‘Kluai Leb Mu Nang’)	AA	Srangsam และ Kanchanapoom (2007)
2. กล้วยหอม (*Musa* ‘Kluai Hom’)	AAA	Racharak และ Eiadthong (2007)
3. กล้วยไข่ (*Musa* ‘Kluai Khai’)	AA	Racharak และ Eiadthong (2007)
4. กล้วยป่า (*Musa acuminate* Colla)	AA	Lamare และ Rao (2015)
5. กล้วยน้ำหว้า (*Musa* ‘Kluai Namwa’)	ABB	Racharak และ Eiadthong (2007)

อย่างไรก็ตาม Swain และคณะ (2016) พบว่า การใช้ ISSR 10 ไพรเมอร์ ไม่สามารถจำแนกกลุ่มของจีโนมและแหล่งกำเนิดของกล้วย 22 สายต้นที่มีจีโนม AB AAA AAB และ ABB ได้ แต่การทดลองนี้สามารถจำแนกกลุ่มของจีโนมกล้วยได้เนื่องจากใช้ไพรเมอร์จำนวน 23 ไพรเมอร์ จะเห็นได้ว่าการเพิ่มจำนวนไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนแถบดีเอ็นเอต่างที่นำมาวิเคราะห์ให้มากขึ้น จึงสามารถแยกกลุ่มของจีโนมได้ หากเราต้องการแยกแหล่งกำเนิดและลักษณะทางกายภาพของกล้วยเล็บมือนาง อาจจะต้องใช้ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอต่างจำนวนมากขึ้น ดังนั้นการนำแถบดีเอ็นต่างที่ได้จากเทคนิคอื่น เช่น RAPD หรือ AFLP มาร่วมวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Lamare และ Rao (2015) ที่นำเอาแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค ISSR RAPD และ DAMP มาวิเคราะห์ร่วมกัน เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยจำแนกแหล่งกำเนิดและลักษณะทางกายภาพของกล้วยเล็บมือนางได้



ภาพที่ 2 แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วย จำนวน 25 ตัวอย่าง ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 23 ไพรเมอร์ และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.1

	กล้วยเล็บมือนาง 001	กล้วยเล็บมือนาง 002	กล้วยเล็บมือนาง 003	กล้วยเล็บมือนาง 004	กล้วยเล็บมือนาง 005	กล้วยเล็บมือนาง 006	กล้วยเล็บมือนาง 007	กล้วยเล็บมือนาง 008	กล้วยเล็บมือนาง 009	กล้วยเล็บมือนาง 010	กล้วยเล็บมือนาง 011	กล้วยเล็บมือนาง 012	กล้วยเล็บมือนาง 013	กล้วยเล็บมือนาง 014	กล้วยเล็บมือนาง 015	กล้วยเล็บมือนาง 016	กล้วยเล็บมือนาง 017	กล้วยเล็บมือนาง 018	กล้วยเล็บมือนาง 019	กล้วยเล็บมือนาง 020	กล้วยเล็บมือนาง 021	กล้วยหอม	กล้วยไข่	กล้วยป่า	กล้วยน้ำว้า
กล้วยเล็บมือนาง 001	1.00																								
กล้วยเล็บมือนาง 002	0.93	1.00																							
กล้วยเล็บมือนาง 003	0.85	0.88	1.00																						
กล้วยเล็บมือนาง 004	0.89	0.87	0.81	1.00																					
กล้วยเล็บมือนาง 005	0.73	0.71	0.73	0.81	1.00																				
กล้วยเล็บมือนาง 006	0.88	0.86	0.79	0.93	0.83	1.00																			
กล้วยเล็บมือนาง 007	0.92	0.89	0.82	0.94	0.80	0.94	1.00																		
กล้วยเล็บมือนาง 008	0.79	0.74	0.70	0.85	0.87	0.87	0.82	1.00																	
กล้วยเล็บมือนาง 009	0.92	0.90	0.82	0.89	0.78	0.89	0.93	0.81	1.00																
กล้วยเล็บมือนาง 010	0.87	0.84	0.79	0.93	0.84	0.92	0.91	0.89	0.88	1.00															
กล้วยเล็บมือนาง 011	0.82	0.79	0.71	0.87	0.82	0.89	0.87	0.89	0.83	0.90	1.00														
กล้วยเล็บมือนาง 012	0.94	0.93	0.86	0.90	0.77	0.90	0.94	0.79	0.96	0.88	0.85	1.00													
กล้วยเล็บมือนาง 013	0.93	0.92	0.85	0.91	0.76	0.91	0.94	0.80	0.96	0.89	0.84	0.99	1.00												
กล้วยเล็บมือนาง 014	0.76	0.73	0.75	0.80	0.88	0.80	0.79	0.80	0.80	0.80	0.77	0.78	0.78	1.00											
กล้วยเล็บมือนาง 015	0.93	0.90	0.83	0.91	0.74	0.89	0.94	0.79	0.93	0.88	0.84	0.94	0.95	0.78	1.00										
กล้วยเล็บมือนาง 016	0.92	0.89	0.81	0.90	0.74	0.90	0.93	0.80	0.92	0.89	0.86	0.92	0.93	0.76	0.96	1.00									
กล้วยเล็บมือนาง 017	0.90	0.88	0.81	0.92	0.78	0.92	0.93	0.83	0.90	0.92	0.88	0.91	0.93	0.77	0.95	0.94	1.00								
กล้วยเล็บมือนาง 018	0.90	0.89	0.81	0.90	0.79	0.92	0.93	0.83	0.90	0.91	0.87	0.92	0.92	0.78	0.92	0.93	0.96	1.00							
กล้วยเล็บมือนาง 019	0.74	0.69	0.67	0.79	0.79	0.79	0.74	0.82	0.71	0.81	0.83	0.73	0.73	0.75	0.72	0.75	0.77	0.78	1.00						
กล้วยเล็บมือนาง 020	0.76	0.71	0.68	0.80	0.82	0.80	0.76	0.83	0.72	0.82	0.85	0.75	0.75	0.78	0.74	0.76	0.78	0.79	0.93	1.00					
กล้วยเล็บมือนาง 021	0.87	0.84	0.79	0.90	0.81	0.88	0.88	0.87	0.85	0.92	0.88	0.87	0.87	0.79	0.86	0.87	0.89	0.89	0.82	0.86	1.00				
กล้วยหอม	0.50	0.46	0.46	0.56	0.68	0.56	0.54	0.67	0.52	0.58	0.64	0.50	0.50	0.67	0.51	0.52	0.53	0.53	0.72	0.71	0.59	1.00			
กล้วยไข่	0.58	0.55	0.52	0.60	0.69	0.62	0.59	0.70	0.59	0.65	0.65	0.57	0.57	0.63	0.56	0.58	0.60	0.62	0.71	0.71	0.66	0.65	1.00		
กล้วยป่า	0.78	0.73	0.71	0.75	0.67	0.75	0.74	0.74	0.74	0.75	0.72	0.76	0.76	0.66	0.74	0.73	0.73	0.75	0.68	0.71	0.75	0.53	0.65	1.00	
กล้วยน้ำว้า	0.57	0.55	0.56	0.54	0.53	0.57	0.57	0.53	0.56	0.56	0.52	0.58	0.57	0.53	0.57	0.57	0.57	0.58	0.48	0.50	0.57	0.40	0.48	0.50	1.00

ภาพที่ 3 ค่าดัชนีความเหมือนของกล้วย จำนวน 25 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย ISSR จำนวน 23 ไพรเมอร์

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

เครื่องหมายโมเลกุล ISSR เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและนิยมนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วย เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการให้ความหลากหลายทางพันธุกรรม เป็นเทคนิคที่มีวิธีง่ายและมีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก จากการสกัดดีเอ็นเอใบอ่อนของกล้วยด้วยวิธี CTAB แสดงให้เห็นว่ามีความบริสุทธิ์เพียงพอในการเป็นต้นแบบสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี ISSR-PCR งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบไพรเมอร์ ISSR จำนวน 64 ไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอรวมของกล้วยทั้ง 25 ตัวอย่าง พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 41 ไพรเมอร์ แต่มีเพียง 23 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนตั้งแต่ 4 แถบขึ้นไป จึงถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 236 แถบ มีแถบดีเอ็นเอต่าง 218 แถบ คิดเป็น 92.37% ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 100-1,400 คู่เบส ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ UBC835 และ UBC810 ส่วนไพรเมอร์ UBC822 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 4 แถบ ผลจากการวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.1 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่า สามารถจำแนกกล้วยเล็บมือนางทั้ง 21 ตัวอย่าง เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 001 002 003 004 006 007 008 009 010 011 012 013 015 016 017 018 และ 021 สำหรับกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 005 014 019 และ 020 นอกจากนี้ยังสามารถแยกกล้วยเล็บมือนางออกจากกล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยป่า และกล้วยน้ำหว้า ซึ่งผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยเล็บมือนางแสดงให้เห็นว่ามีความใกล้ชิดกับกล้วยหอมมากที่สุดเมื่อเทียบกับกล้วยไข่ กล้วยป่า และกล้วยน้ำว้า จากแผนภูมิความสัมพันธ์จะเห็นได้ว่าการแบ่งกลุ่มของทุกตัวอย่างจะแยกออกจากกล้วยน้ำหว้า ซึ่งการแบ่งกลุ่มสอดคล้องกับจีโนมของกล้วย เนื่องจากกล้วยน้ำหว้ามีจีโนม ABB ส่วนตัวอย่างกล้วยที่เหลือประกอบด้วยจีโนม AA และ AAA มีค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์อยู่ระหว่าง 0.40 ถึง 0.99 ซึ่งข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยเล็บมือนางที่ได้ จะถูกนำไปใช้วางแผนในการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยเล็บมือนางต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การทดลองนี้ได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR จำนวน 23 ไพรเมอร์ สามารถจำแนกกล้วยได้ตามลักษณะของจีโนม แต่ไม่สามารถจำแนกแหล่งที่มาและลักษณะทางกายภาพของกล้วยเล็บมือนางได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการจำแนกลักษณะทางกายภาพต้องใช้จำนวนแถบดีเอ็นเอต่างเป็นจำนวนมาก ซึ่งแถบดีเอ็นเอต่างที่ได้จากการทดลองนี้ยังไม่เพียงพอต่อการจำแนก อีกทั้งกลไกการแสดงออกของยีนให้ได้ลักษณะทางกายภาพ เช่น สีกาบใบและขนของผลของกล้วยเล็บมือนางนั้น มีกลไกอื่นที่สามารถควบคุมได้อีกนอกจากลำดับดีเอ็นเอ เช่น กระบวนการเหนือพันธุกรรม (epigenetic) ซึ่งเป็นกระบวนการนอกเหนือจากการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอ ได้แก่ การเติมหมู่เมธิลบนดีเอ็นเอหรือการถอนหมู่อะเซทิลออกจากฮิสโตน เป็นการยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นๆ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ลักษณะ polymorphic จำนวนมาก และสามารถทราบกลไกการเกิด epigenetic นั้น ปัจจุบันนิยมใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่เรียกว่า Single Nucleotide Polymorphisms หรือ SNPs ในการศึกษาและจำแนก และการศึกษาพืชทั้งจีโนมนั้นจะเป็นผลดีต่อการจำแนก

ลักษณะจีโนไทป์ให้สัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพ แต่ค่าใช้จ่ายในการศึกษาค่อนข้างสูง หากจำเป็นต้องศึกษาก็น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถจำแนกแหล่งที่มาและลักษณะทางกายภาพของกล้วยเล็บมือนางได้

10. เอกสารอ้างอิง

กุหลาบ หมายสุขกลาง. 2559. กล้วยเล็บมือนาง: ระบบจัดเก็บและรายงานข้อมูลภาวการณ์ผลิตพืชรายเดือนระดับตำบล. ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมส่งเสริมการเกษตร. http://www.agriinfo.doae.go.th/year60/plant/rortor/fruit1/banana4.pdf ค้นหาวันที่ 18 ตุลาคม 2561

วันดี แก้วสุวรรณ. 2554. โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์กล้วยแผ่นและกล้วยม้วนจากกล้วยเล็บมือนาง. คลินิกเทคโนโลยีเครือข่าย มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช. 87 หน้า.

อรุโณทัย ซาววา, สุภาวดี ง้อเหรียญ, อัญชลี ศรีสุวรรณ, ประพิศ วองเทียม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-118.

อาพร คงอิสโร อุดมพร เสือมาก สโรชา กรีธาพล และสุธีรา ถาวรรัตน์. 2557. สำรวจและศึกษาเชื้อพันธุ์กล้วยเล็บมือนางในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน. รายงานโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกล้วยเล็บมือนางในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน กรมวิชาการเกษตร. 120 หน้า

อุดมพร เสือมาก สโรชา กรีธาพล สุธีรา ถาวรรัตน์ และอาพร คงอิสโร. 2557. ความสัมพันธ์ของระยะปลูกกับการไว้หน่อต่อการให้ผลผลิตกล้วยเล็บมือนางคุณภาพ. หน้า 122-130. *ใน :ผลงานวิจัย ประชุมสัมมนาวิชาการประจำปี 2557.* 1-3 พฤษภาคม 2557 ณ โรงแรมกรีนเนอรี่รีสอร์ท เขาใหญ่ จ.นครราชสีมา.

อุดมพร เสือมาก สโรชา กรีธาพล สุธีรา ถาวรรัตน์ อาพร คงอิสโร อารมณ์ โรจน์สุจิตร และสุรกิตติ ศรีกุล. 2557. วิจัยและพัฒนากล้วยเล็บมือนางในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน. หน้า 338-346 *ใน : ผลงานวิจัย ประชุมสัมมนาวิชาการประจำปี 2557*. 1-3 พฤษภาคม 2557 ณ โรงแรมกรีนเนอรี่รีสอร์ท เขาใหญ่ จ.นครราชสีมา.

Costa, R., G. Pereira, I. Garrido, M. M. Tavares-de-Sousa and F. Espinosa. 2016. Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP Molecular Markers to Reveal and Classify Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) Germplasm Variations. PLoS ONE, 11(4), e0152972. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0152972 ค้นหาวันที่ 18 ตุลาคม 2561

Das, S.C., T.N. Balamohan, K. Poornima and I.V.D. Bergh. 2018 .Evaluation of Genetic Diversity in Some Banana Hybrids using ISSR Markers. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 7(1): 146-157.

Kuras, A., M. Korbin and E.Zurawicz. 2004. Comparison of suitability of RAPD and ISSR techniques for determination of strawberry (*Fragaria ×ananassa*Duch.) relationship. Plant Cell, Tissue and Organ Cultule 79: 189-193.

Lamare, A. and S.R. Rao. 2015. Efficacy of RAPD, ISSR and DAMD markers in assessment of genetic variability and population structure of wild *Musa acumminata* colla. Physiol Mol Biol Plants 21(3): 349-358.

Manimekalai, R., P. Nagarajan and P.M. Kumara. 2006. Comparison of effectiveness of RAPD, ISSR and SSR markers for analysis of coconut (Cocos nucifera L.) germplasm accessions. Tropical Agricultural Research Vo.18, https://www.pgia.ac.lk/files/Annual_congress/journel/v18/22.pdf ค้นหาวันที่ 11 ตุลาคม 2560.

Racharak, P. and W. Eiadthong. Genetic relationship among subspecies of Musa acuminata Colla and A-genome consisting edible cultivated bananas assayed with ISSR markers Songklanakarin J. Sci. Technol., 2007, 29(6): 1479-1489.

Rohlf, F.J. 2000. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1 User Guide F. James Rohlf Department of Ecology and Evolution State University of New York Stony Brook, NY 11794-5245. 44 pages.

Shankar, K., L. Chavan, S. Shinde and B. Patil. 2011. An Improved DNA Extraction Protocol from Four *in vitro* Banana Cultivars. Asian Journal of Biotechnology, 3: 84-90.

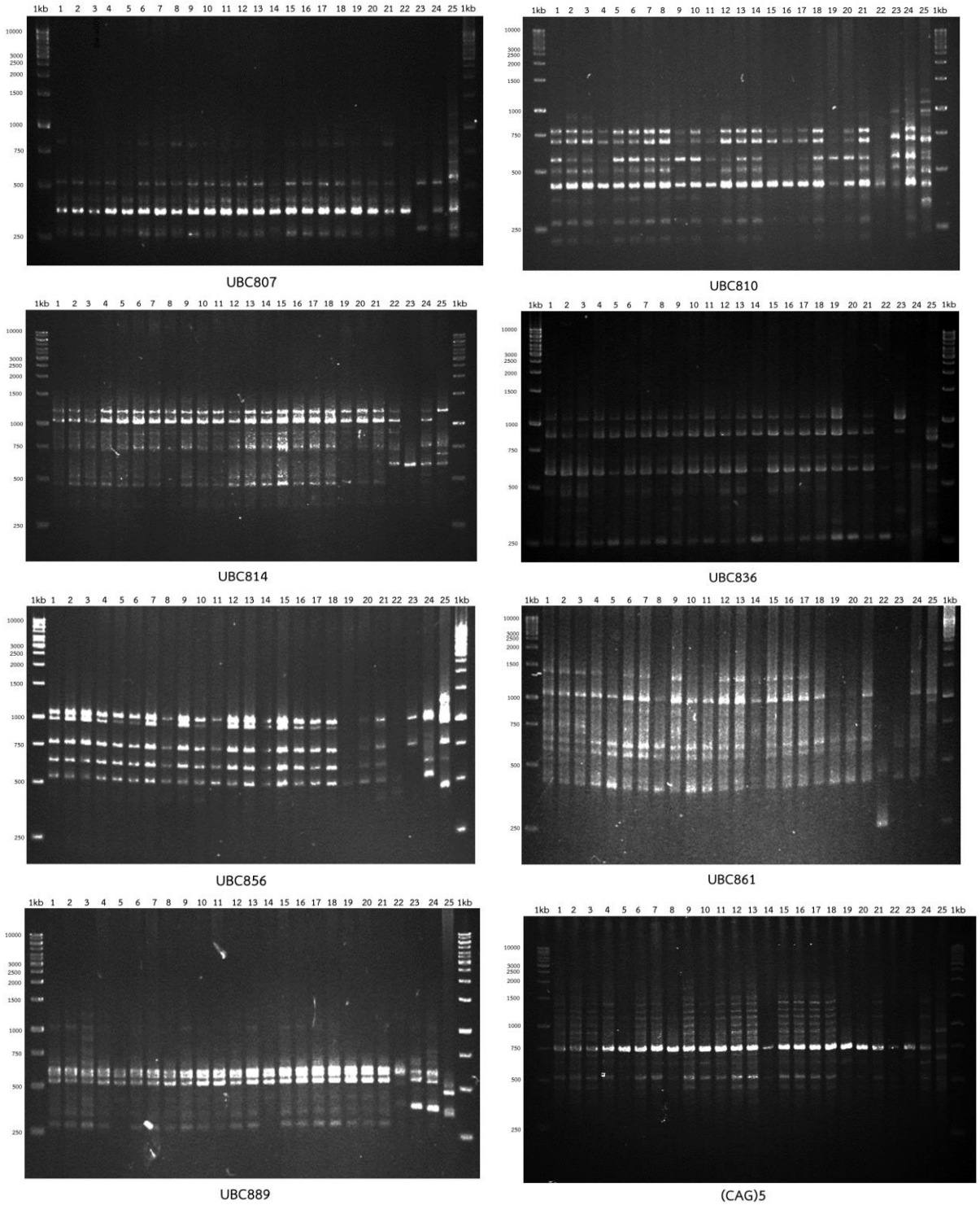
Silva, A.V.C., A.L.S. Nascimento, M.F. Vitoria, A.R.C. Rabbani, A.N.R. Soares and A.S. Ledo. 2017. Diversity and genetic stability in banana genotypes in a breeding program using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. Genetics and Molecular Reserch 16(1): gmr 16019402. 9 pages.

Srangsam, A. and K. Kanchanapoom, 2007. Establishment of in vitro Culture of Musa AA Group ‘Kluai Sa’ and Musa AA Group ‘Kluai Leb Mue Nang’ and the Analysis of Ploidy Stability. Science Asia 33: 437-442.

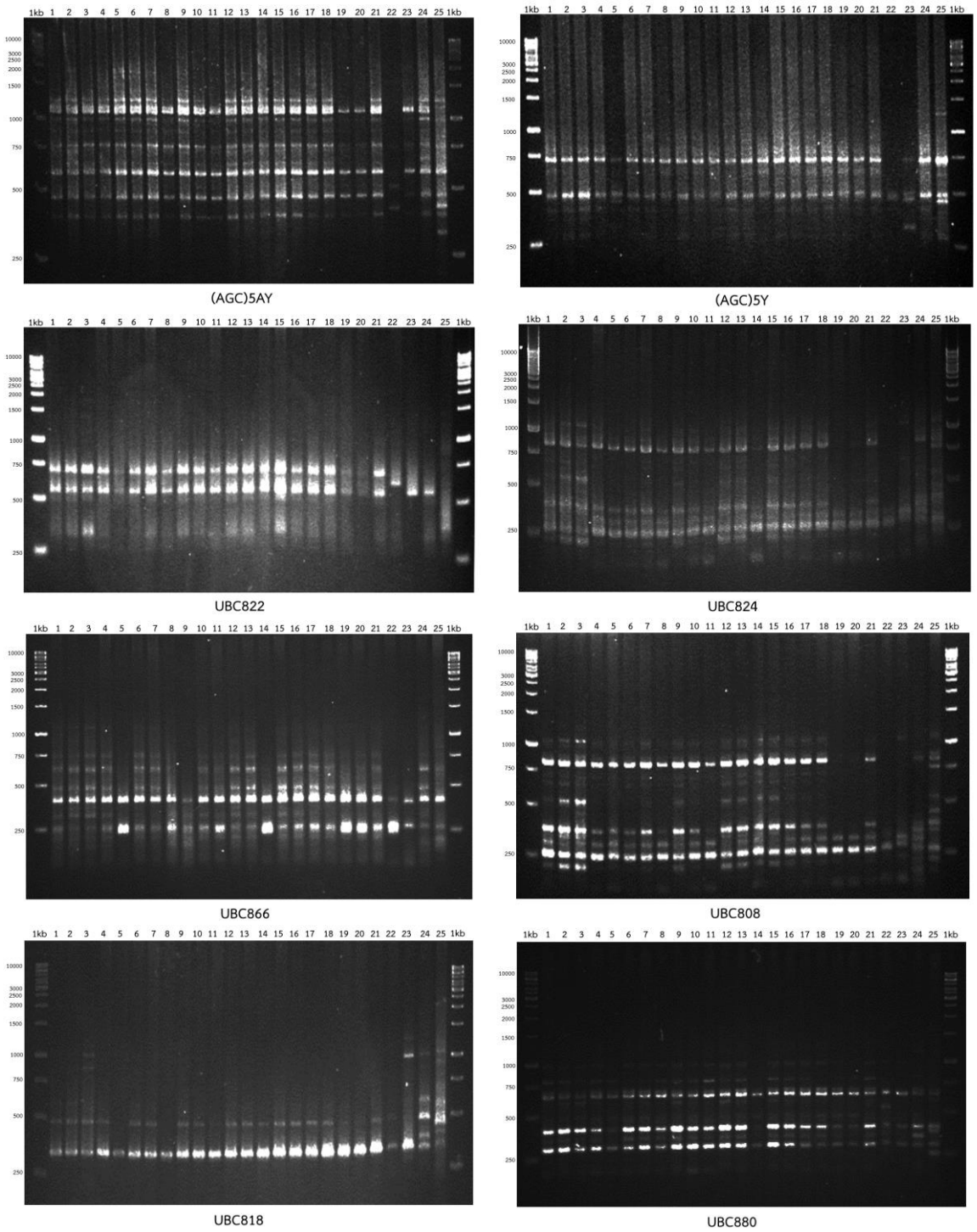
Swain, S., S. Das, P.S. Munsi, P.C. Lenka, G.R. Rout and D. Swain. 2016. Molecular diversity study on dessert banana genotypes (Musa spp.) from Odisha using ISSR markers. GENETICS AND PLANT BREEDING, 9(4): 513-523.

Weising, K. H. Nybom, K. Wolff and G. Kahl. 2005. DNA Fingerprinting in Plants Principles, Methods, and Applications Second Edition. CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW Boca Raton, FL 33487-2742. 444 pages

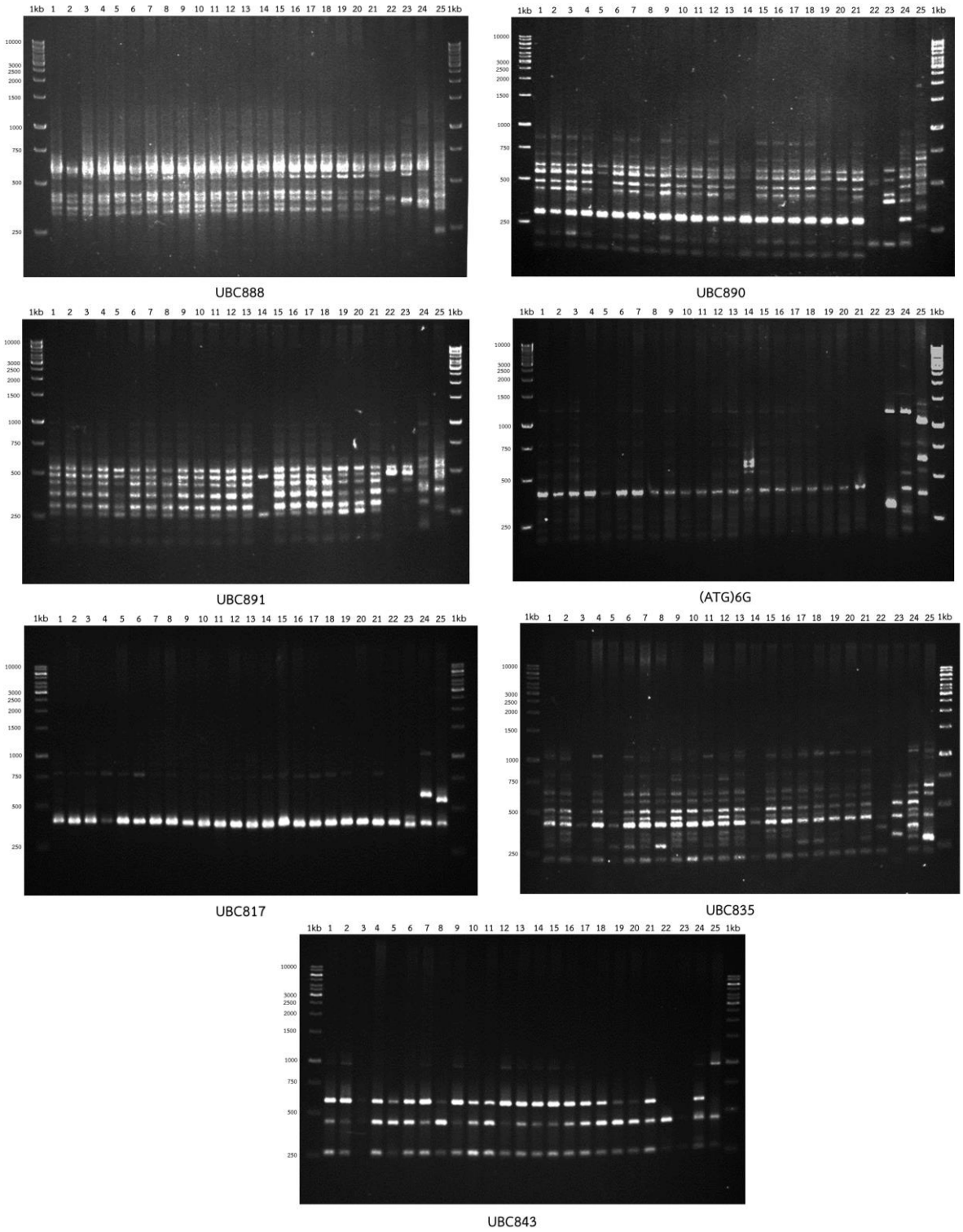
11. ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR ได้แก่ UBC807 UBC810 UBC814 UBC836 UBC856 UBC861 UBC889 และ (CAG)5 บนเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์



ภาพผนวกที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR ได้แก่ (AGC)5AY (AGC)5Y UBC822 UBC824 UBC866 UBC808 UBC818 และ UBC880 บนเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์



ภาพผนวกที่ 3 แสดงแถบดีเอ็นที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR ได้แก่ UBC888 UBC890 UBC891 (ATG)6G UBC817 UBC835 และ UBC843 บนเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์