

การจัดจำแนกทุเรียน (*Durio zibethinus* Merr.) โดยใช้เทคนิค AFLP

จิตาภรณ์ สุขโหด¹ อินทิรา จารุเพ็ง¹ ประไพ โมจรินทร์¹ อภิรดี เพิ่มผล² อรุณนี สระแก้ว² ศิริวรรณ เทียนมงคล² ปิยรัชฎ์ ปริญญางพงษ์¹ และ พรชัย จุฑามาศ¹

¹โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สวนจิตรลดา ดุสิต กรุงเทพฯ 10303 ²ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี ต. พลับ อ. แหลมสิงห์ จ. จันทบุรี 22190

Identification and classification of Durian (*Durio zibethinus* Merr.) using AFLP analysis

Thitaporn Sukhotu¹, Intira Jarupeng¹, Prapai Mojarin¹, Apiradee Peampol², Arunnee Srakoa²
Siriwan Teinmongkol², Piyarat Parinyapong¹ and Pornchai Chuthamas¹

¹Plant Genetic Conservation Project, Chitralada Palace, Dusit, Bangkok 10303; ²Chanthaburi Horticultural Research Center, Chanthaburi 22190

บทคัดย่อ

เทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนโดยใช้เทคนิค AFLP ยังไม่ได้มีการศึกษาและทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาก่อน ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนในพื้นที่จังหวัดจันทบุรีที่เก็บรวบรวมพันธุ์ไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และพันธุ์ที่นำมาจากภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งเก็บรวบรวมไว้ที่ ห้วยสะพานหิน จังหวัดจันทบุรี โดยใช้ทุเรียนจำนวน 130 พันธุ์ มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP (Amplified fragment length polymorphism) ใช้ไพรเมอร์ 8 คู่ ได้แถบที่แตกต่างกัน 138 ตำแหน่ง จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages) สามารถจัดกลุ่มของทุเรียนได้ 2 กลุ่ม

Abstract

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis is a rapid and efficient method for producing DNA fingerprints. The AFLP diversity of Durian has not yet been described and fingerprinted. In this study, one hundred and thirty clones of Durian from Chanthaburi and South of Thailand were analyzed by using AFLP analysis to differentiate Durian genotypes and to explore their genetic relationships. A total of 138 polymorphic markers were generated from eight selective primer-pair combinations. The data obtained were employed to construct dendrograms using an unweighted pair-group method with arithmetical averages (UPGMA). The UPGMA analysis classified Durian into two groups.

บทนำ

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Merr.) เป็นผลไม้เมืองร้อนที่เก่าแก่ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตอนใต้ ในปัจจุบันแหล่งปลูกทุเรียนของประเทศไทยส่วนใหญ่อยู่ในทางภาคใต้และภาคตะวันออกภาคใต้ มีปลูกกันมากตั้งแต่ชุมพรลงไป ภาคกลางมีปลูกที่นนทบุรี กรุงเทพมหานคร และมีปลูกบ้างเล็กน้อยที่ชัยนาท ภาคเหนือปลูกที่อุตรดิตถ์ พิษณุโลก ทางด้านภาคตะวันออกปลูกได้ทุกจังหวัด เรียงตามลำดับความสำคัญคือ จันทบุรี ระยอง ตราด ปราจีนบุรี ในสมัยแรกๆทุเรียนพันธุ์ดีมีไม่กี่พันธุ์ ต่อมาเมื่อเกิดน้ำท่วมใหญ่ในกรุงเทพมหานคร 2 ครั้งทำให้ต้นทุเรียนตายและสูญพันธุ์ไปเป็นจำนวนมาก และเนื่องจากกิ่งตอนหายากและมีราคาแพง ชาวสวนจึงมักเอาเมล็ดทุเรียนมาเพาะปลูกใหม่ ทำให้เกิดทุเรียนพันธุ์ใหม่ๆขึ้นมาอีกมากมาย เกิดการตั้งชื่อพันธุ์อีกมากมาย เพราะทุเรียนพันธุ์หนึ่งๆเมื่อนำเมล็ดมาปลูกแล้วมีลักษณะดีและผิดแปลกไปจากต้นเดิมเล็กน้อย ทุเรียนต้นใหม่อาจตั้งชื่อตามพันธุ์เดิม แต่เดิมชื่อผู้เพาะลงไปด้วย เช่น พันธุ์กบตาขำ เป็นทุเรียนที่เพาะจากเมล็ดทุเรียนกบ โดยมีผู้เพาะชื่อขำ เลยให้ชื่อว่า “กบตาขำ” ในขณะนี้มีพันธุ์ทุเรียนจำนวนประมาณ 200 พันธุ์และมีเพียงประมาณ 80 พันธุ์ที่มีชื่ออยู่ในวงการค้า (คู่มือการปลูกทุเรียน)

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายในการศึกษาความสัมพันธ์ของหายพันธุ์ต่าง ๆ นั้นเป็นวิธีการศึกษาความแตกต่างของดีเอ็นเอของพืชซึ่งไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมและฤดูกาลมาเกี่ยวข้องจึงเป็นที่นิยมใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชต่างๆ เทคนิคดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการจำแนกพันธุ์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้แก่ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Wiesman, 1998) RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Weber and Helentjaris, 1989) STS (Sequence-Tagged Site) (Daniel *et al.*, 1998)

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism DNA) (Vos *et al.*, 1995) เป็นการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI, *Mse* I จากนั้นก็นำมาเชื่อมต่อด้วย *Eco* RI adapter และ *Mse* I adapter และนำไปทำปฏิกิริยาด้วย PCR จากนั้นนำ PCR Product ไปตรวจสอบด้วย Polyacrylamide Gel จากเทคนิคดังกล่าวทำให้ได้แถบดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก

เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนโดยใช้เทคนิค AFLP ยังไม่ได้มีการศึกษาและทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาก่อน ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนในพื้นที่จังหวัดจันทบุรีที่เก็บรวบรวมพันธุ์ไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และพันธุ์ที่นำมาจากภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งเก็บรวบรวมไว้ที่ ห้วยสะพานหิน จังหวัดจันทบุรี

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การทดลองครั้งนี้ใช้ใบทุเรียนจากแปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จ.จันทบุรี จำนวน 130 ตัวอย่าง รหัสดีเอ็นเอ 5D1-5D130

การทำปฏิกิริยา AFLP

นำใบทุเรียนมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ใช้วิธีการของ Vos และคณะ (1995) นำดีเอ็นเอของทุเรียนประมาณ 0.5 ไมโครกรัม มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco* RI และ *Tru* 9I (*Tru* 9I เป็นเอนไซม์ที่ตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกับ *Mse* I) จากนั้นนำมาต่อด้วย adapter ที่มีลำดับเบสตรงกับที่จดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง

2 ชนิด (*Eco* RI-adapter และ *Mse* I-adapter) แล้วนำมาทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เลือกใช้ไพรเมอร์ (Primer) ที่มี selective โดยใช้ไพรเมอร์ ด้าน *Eco* RI และ *Mse* I ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 8 คู่ ดังแสดงไว้ใน Table1 นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบโดยการผ่าน 4.5 % denatured polyacrylamide gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 40 วัตต์ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 และนำไปย้อมด้วย silver staining

Table 1: Eighth primers which are using for DNA fingerprint

	<i>Eco</i> RI adapter	<i>Mse</i> I adapter
1	ER-AGC	MS-CAA
2	ER-AGC	MS-CAC
3	ER-ACA	MS-CTA
4	ER-AGC	MS-CGT
5	ER-AAC	MS-CTG
6	ER-ACA	MS-CGT
7	ER-ACA	MS-CAC
8	ER-ACA	MS-CTG

Table2: Polymorphic bands after analyze with 4.5% acrylamide gel

Primer	Polymorphic band
ER-AGC/MS-CAA	16
ER-AGC/MS-CAC	17
ER-ACA/MS-CTA	24
ER-AGC/MS-CGT	13
ER-AAC/MS-CTG	17
ER-ACA/MS-CGT	11
ER-ACA/MS-CAC	22
ER-ACA/MS-CTG	18
Total	138

การวิเคราะห์ข้อมูล

เลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างสายต้น (polymorphic bands) โดยให้ 1 แทนแถบที่ปรากฏในตำแหน่ง(loci) นั้นๆ และ 0 แทนตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาหาค่า Similarity coefficient โดยใช้ค่าสหสัมพันธ์ของ Dice (1945) และจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Averages) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.11T (Rohlf, 1997)

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

การใช้ AFLP 8 คู่ไพรเมอร์ ในการศึกษาความสัมพันธ์ของทุเรียนพันธุ์ต่างๆ จำนวน 130 ตัวอย่าง จากแปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จ. จันทบุรี โดยทั้ง 8 คู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 165 แถบ เฉลี่ย 21 แถบต่อหนึ่งคู่ไพรเมอร์ มีจำนวนแถบที่แสดงความแตกต่างจากจำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ (polymorphic band) 138 แถบ ขนาดตั้งแต่ 66-500 คู่เบส คิดเป็น 83.64% จากจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (Table 2, Figure 1)

เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอ 138 แถบ ไปหาความสัมพันธ์ของทุเรียนทั้ง 130 ตัวอย่าง โดยสร้างเป็น dendrogram (Figure 2) สามารถจัดได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 จำนวน 106 ตัวอย่าง คือ 5D1-5D11, 5D13, 5D14, 5D16, 5D17, 5D19-5D23, 5D25, 5D27, 5D29-5D33, 5D37, 5D39, 5D40, 5D42-5D45, 5D47, 5D49, 5D52, 5D53, 5D56-5D73, 5D75-5D84, 5D86, 5D88-5D99, 5D102-5D109, 5D111-5D121, 5D123-5D130 สามารถแบ่งได้เป็น 49 กลุ่มย่อย

กลุ่มที่ 2 จำนวน 24 ตัวอย่าง คือ 5D12, 5D15, 5D18, 5D24, 5D26, 5D28, 5D34, 5D35, 5D36, 5D38, 5D41, 5D46, 5D48, 5D50, 5D51, 5D54, 5D55, 5D74, 5D85, 5D87, 5D100, 5D101, 5D110, 5D122 สามารถแบ่งได้เป็น 12 กลุ่มย่อย

จากผลการทดลอง พบว่าทุเรียนในกลุ่มที่ 1 และ 2 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เนื่องจากในกลุ่มใหญ่ก็ยังแยกเป็นกลุ่มย่อยได้อีกหลายกลุ่ม ซึ่งบางพันธุ์ไม่มีการจับกลุ่มเลย ที่เป็นเช่นนี้เพราะชาวสวนมักเอาเมล็ดทุเรียนมาเพาะปลูกใหม่เนื่องจากกิ่งพันธุ์ดีหายาก เมื่อนำทุเรียนพันธุ์หนึ่งๆ มาเพาะเมล็ดแล้วได้ลักษณะที่ผิดแปลกไปจากเดิมและมีคุณลักษณะที่ดีก็จะนำมาตั้งเป็นพันธุ์ใหม่ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าถึงแม้จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แต่ก็ยังมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงเช่นกันเนื่องจากเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างอยู่ระหว่าง 50-70 เปอร์เซ็นต์

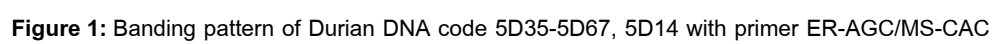
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

การจัดกลุ่มโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายนั้นทำได้สะดวกและรวดเร็ว เนื่องจากสามารถนำไปมาสกัดดีเอ็นเอได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า แต่จะยังชัดเจนยิ่งขึ้นถ้ามีข้อมูลทางฐานวิทยาศาสตร์ มาพิจารณาประกอบกับข้อมูลของการจัดจำแนกทุเรียนโดยเทคนิค AFLP แต่อาจเป็นไปได้ว่าโดยเทคนิค AFLP อาจจะยังไม่ละเอียดเพียงพอในการจัดกลุ่ม จึงทำให้แยกได้เพียง 2 กลุ่ม ในการทดลองในอนาคตอาจใช้เทคนิคในการจัดจำแนกโดยวิธีการ

อื่นประกอบกัน ซึ่งจะเกิดประโยชน์ในด้านการคัดเลือกพันธุ์เพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- โครงการหนังสือเกษตรชุมชน คู่มือการปลูกทุเรียน
กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecology association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12(1): 13-15.
- Rohlf, F.J. 1997. NTSYS – pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), version 2.0. Exeter Software, New York.
- Vos, P.R. Hogers, Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids. Res.* 23:4407-4414.
- Weber, D. and Helentjaris, T. 1989. Mapping RFLP loci in maize using B-A translocation. *Genetics* 121: 538-590.
- Wiesman, Z., Avidan, N., Lavee S., and B. Quebedeaux. 1998. Molecular characterization of common olive varieties in the west bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J. Amor. Soc. Hort. Sci.* 123(5): 837-841.



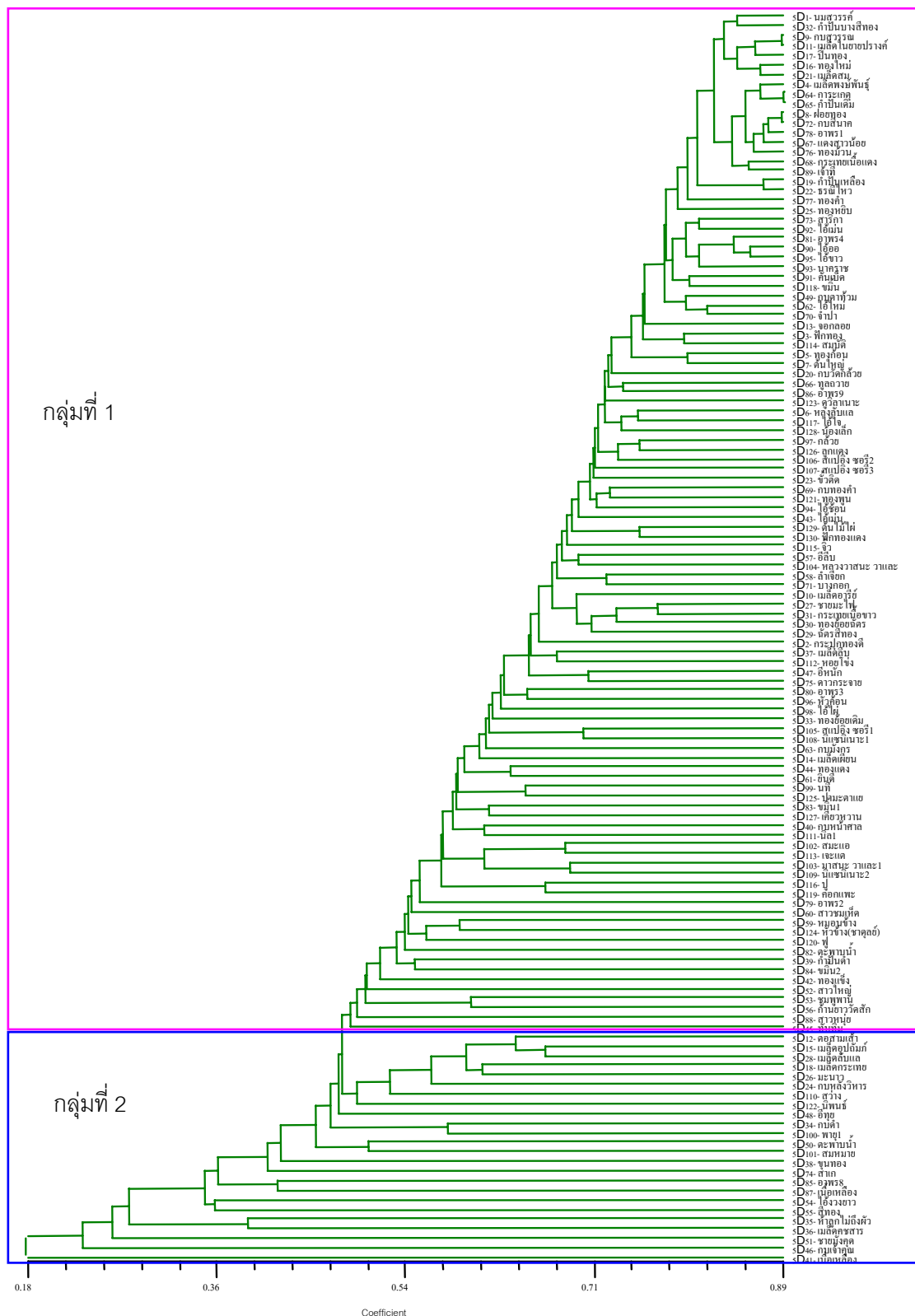


Figure 2: Dendrogram of Durian using an unweighted pair-group method with arithmetical averages (UPGMA) (138 polymorphic bands)