การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยจากลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์

Analysis of genetic relationship in bananas using ISSR marker

กิตติศักดิ์ เฉนียง ชลิตา ชูคันหอม และ ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร*
คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ กาฬสินธุ์
*corresponding author e-mail: nattapongsri@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วย 15 ชนิด โดยใช้เทคนิคลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat Markers; ISSR) ผลการศึกษาพบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการใช้ไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ 16 ไพรเมอร์ เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 275 แถบ เป็นแถบโพลีมอร์ฟิค (polymorphic band) ทั้งหมด 260 แถบ (94.55%) เมื่อสร้างเดนโดรแกรมด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยใช้ค่าดรรชนีความเหมือน (similarity index) พบว่า สามารถจำแนกกล้วย 15 ชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ และแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 3 กลุ่มย่อย ด้วยค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 45% ตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ กล้วยหอมแกรนด์เนน (Hom Grand Naine; *Musa* (AAA group)) กับกล้วยมาฮอย (Mahoy; *Musa acuminate*) (74%) ตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ กล้วยน้ำว้าดำ (Namwa Dam; *Musa* (ABB Group)) กับกล้วยมาฮอย (19%) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากล้วยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สูงมาก

คำสำคัญ : กล้วย ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ไอเอสเอสอาร์ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Abstract

The aim of this study was to study the genetic relationship of 15 species of bananas using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. The result indicated that DNA fingerprint from 16 ISSR primers generated 275 bands. Of these bands 260 were polymorphic (94.55%). Dendrogram, constructed form unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA), divided 15 species of bananas in this study into 2 major groups and 3 minor groups with average similarity index coefficient of 45%. Dwarf Cavendish or Kluai Hom Grand Naine (*Musa* (AAA group)) and Kluai Mahoy (*Musa acuminate*) showed the highest genetic relationship (74% genetic similarity). Kluai Nam Wa Dam (*Musa* (ABB Group)) and Kluai Mahoy have the lowest genetic relationship (19% genetic similarity). The results indicated that bananas have high genetic variation

keywords : banana, genetic relationship, ISSR marker, DNA fingerprint

บทนำ

กล้วยเป็นพืชในวงศ์ Musaceae ที่คนไทยรู้จักกันดี ทุกส่วนของกล้วยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น รับประทานผลสด แปรรูปหรือประกอบเป็นอาหารและขนมต่างๆ ใบและลำต้นใช้ในพิธีกรรมทางศาสนาและประเพณีต่างๆ อีกทั้งยังเป็นสมุนไพรในตำรับยาพื้นบ้านอีกด้วย ประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดหนึ่งของกล้วย จึงมีความหลากหลายของกล้วยค่อนข้างมาก ทั้งกล้วยประดับและกล้วยกินได้ พันธุ์กล้วยที่ปลูกอยู่ทั่วไปในปัจจุบันคาดว่ามีทั้งพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์นำเข้ามาจากประเทศใกล้เคียง พันธุ์กล้วยที่เกิดจากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยเพื่อให้ได้ลักษณะและคุณสมบัติตามที่ต้องการ จึงทำให้กล้วยภายในประเทศไทยมีหลากหลายพันธุ์ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกันน้อยบ้างมากบ้าง (เบญจมาศ ศิลาย้อย, 2558) บางชนิดมีสัณฐานวิทยาภายนอกที่คล้ายคลึงกันมากส่งผลให้การจำแนกหรือระบุชนิดเกิดปัญหา ซึ่งแต่เดิมนั้นการจำแนกพันธุ์กล้วย สามารถทำได้โดยพิจารณาจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏ (phenotype) หรือใช้เทคนิคทางเซลล์วิทยา (cytological technique) โดยการนับจำนวนโครโมโซมเพื่อแบ่งกลุ่มและ

การศึกษาจำนวนชุดของโครโมโซมพื้นฐาน (Simmonds & Shepherd, 1955) อย่างไรก็ตามการจำแนกพันธุ์กล้วยโดยใช้เทคนิคดังกล่าวนั้น อาจปฏิบัติได้ค่อนข้างยากต้องอาศัยประสบการณ์อย่างมาก อาจเกิดความผิดพลาดได้ง่ายโดยเฉพาะพันธุ์ที่มีความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ทำให้ประสิทธิภาพและความแม่นยำในการจำแนกพันธุ์ลดลงอย่างมาก แนวทางหนึ่งที่นิยมใช้แก้ปัญหาดังกล่าวอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือการใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมาจำแนกพันธุ์พืชต่างๆที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย เทคนิคดังกล่าวนี้ ได้แก่ การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) หรือ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายและสามารถใช้ตรวจสอบส่วนของดีเอ็นเอที่มีความแปรผัน (variable region) ได้

เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR; inter simple sequence repeats) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง ที่รวมเอาข้อดีของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP; amplified fragment length polymorphisms) และเครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD; random amplified polymorphic DNA) ไว้ด้วยกัน (Liu & Wendel, 2001) ปัจจุบันนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเทคนิคไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ คล้ายกับเทคนิคอาร์เอพีดี แต่มีความจำเพาะมากกว่ามีความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) เกิดความแตกต่าง (polymorphism) สูง สามารถแยกในระดับชนิด (species) ของสิ่งมีชีวิตจนถึงภายในชนิด เทคนิคลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำๆ เช่น $(AG)_6$ $(TC)_8$ หรือ $(ACG)_4$ เป็นต้น และใช้เวลาน้อยวิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน (Powell et al., 1996) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงนำเทคนิคลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์มาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วย ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนพัฒนาปรับปรุงพันธุ์กล้วยเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของกล้วยต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างกล้วย 15 ตัวอย่าง ได้แก่ กล้วยเล็บมือนาง (AA), กล้วยหอมกระเหรี่ยง (AAA), กล้วยหอม แกรนด์เนน (AAA), กล้วยหอมเขียว (AAA), กล้วยไข่พระตะบอง (AAA), กล้วยมาฮอย (AAA), กล้วยงาช้าง (AAB), กล้วยไข่โบราณ (AAB), กล้วยสาวกระทืบหอ (AAB), กล้วยหิน (ABB), กล้วยน้ำว้าค่อม (ABB), กล้วยหักมุกส้ม (ABB), กล้วยตีบคำ (ABB), กล้วยน้ำว้าดำ (ABB) และกล้วยตานีดำ (BB) สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยตามวิธีที่ประยุกต์จาก Gawel and Jarret (1991) แล้วตรวจสอบปริมาณด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวุ้นอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ตามวิธีของ Bornet & Branchard (2001) องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2X *Taq* mastermix (Vivantis), Nuclease-free Water (Vivantis), 0.2 µM primer และดีเอ็นเอต้นแบบ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องพีซีอาร์ ซึ่งโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ pre-denaturation ที่ 94°C (5 นาที) 1 รอบ denaturation ที่ 94 °C (1 นาที) annealing (ตารางที่ 1) ของแต่ละไพรเมอร์ (1.30 นาที) และ extension ที่ 72 °C (2 นาที) เป็นจำนวน 40 รอบ และ final extension ที่ 72 °C (5 นาที) 1 รอบ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer ความเข้มข้น 0.5 เท่า เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับ 1kb DNA ladder marker แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วย

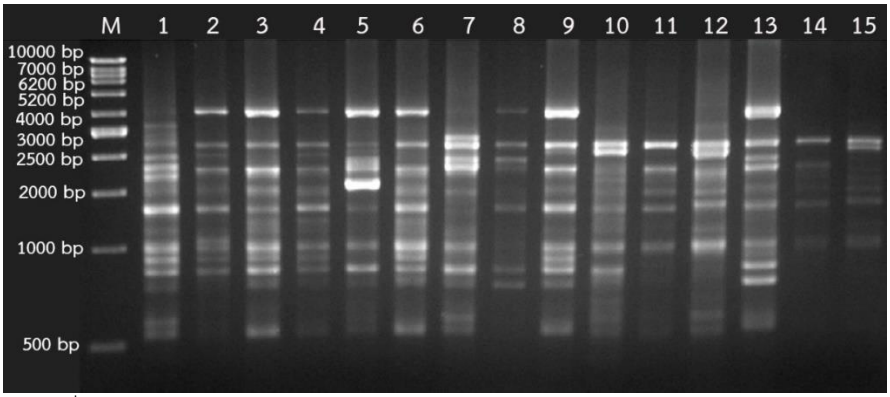
วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วย 15 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเรสบนวุ้นอะกาโรส โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 0 แล้วนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยใช้ค่าดรรชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรม FreeTree 3.0 (Pavlicek et al., 1999) และสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) จากข้อมูลของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม TreeView 3.0 (Page, 1996)

ผลการวิจัย

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ 16 ไพรเมอร์ กับตัวอย่างดีเอ็นเอของกล้วย 15 ตัวอย่าง เกิดแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนทั้งหมด 275 แถบ มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่างประมาณ 200-4000 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกตัวอย่าง (monomorphic band) 15 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่พบแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง (polymorphic band) 260 แถบ คิดเป็น 94.55 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าไพรเมอร์ P17 เกิดแถบดีเอ็นเอมากที่สุด จำนวน 24 แถบ (ภาพที่ 1) ไพรเมอร์ P13 เกิดแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด จำนวน 9 แถบ และไพรเมอร์ที่ให้แถบโพลีมอร์ฟิคมากที่สุด คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ คือ ไพรเมอร์ P4, P5, P9, P11, P16, P17, P18 และ P19 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างน้อยที่สุด คือไพรเมอร์ P13 ซึ่งคิดเป็น 77.78 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ Annealing Temperature (T_a) ของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด และจำนวนแถบโพลีมอร์ฟิคของกล้วย 15 ตัวอย่าง

Primer	Nucleotide Sequence	T_a (°C)	No. of Total bands	No. of Polymorphic bands	Polymorphism (%)
P1	AGAGAGAGAGAGAGG	47	14	12	85.71
P2	CTCTCTCTCTCTCTAC	49	14	13	92.86
P3	CTCTCTCTCTCTCTGC	51	20	18	90.00
P4	CACACACACACAAC	37	20	20	100
P5	CACACACACACAGT	37	18	18	100
P7	CACACACACACAGG	39	18	17	94.44
P8	GAGAGAGAGAGAGG	39	13	11	84.62
P9	GTGTGTGTGTGTGG	39	22	22	100
P10	GAGAGAGAGAGACC	39	13	11	84.62
P11	GTGTGTGTGTGTCC	39	18	18	100
P13	GAGGAGGAGGC	33	9	7	77.78
P16	ACTGACTGACTGACTG	43	21	21	100
P17	GACAGACAGACAGACA	43	24	24	100
P18	GTGTGTGTGTGTGTGTC	47	17	17	100
P19	ACACACACACACACACG	47	20	20	100
P20	ACACACACACACACACCG	51	15	12	80.00
รวม			**275**	**260**	**94.55**



ภาพที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ P17 (M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder marker 1-15 คือ กล้วยเล็บมือนาง กล้วยหอมกระเหรี่ยง กล้วยหอมแกรนด์เนน กล้วยหอมเขียว กล้วยไข่พระตะบอง กล้วยมาฮอย กล้วยงาช้าง กล้วยไข่โบราณ กล้วยสาวกระทืบหอ กล้วยหิน กล้วยน้ำว้าค่อม กล้วยหักมุกส้ม กล้วยตีบคำ กล้วยน้ำว้าดำ และกล้วยตานีดำ ตามลำดับ)

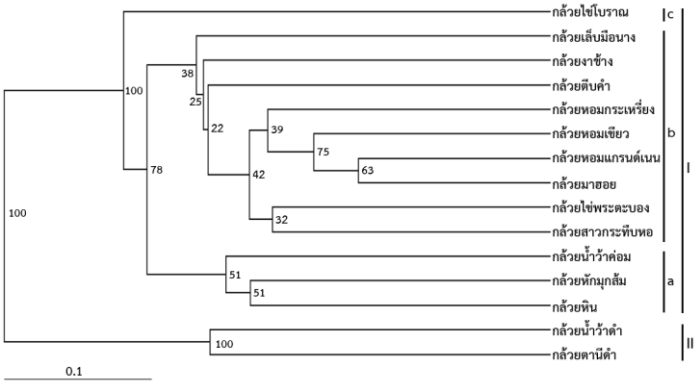
ผลการวิเคราะห์ค่าดรรชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ค่าดรรชนีความเหมือนมาสร้างเดนโดรแกรมความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วย 15 ตัวอย่าง พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมภายในกลุ่มของกล้วยด้วยกันอยู่ระหว่าง 19-74 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์ โดยคู่ตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ กล้วยหอมแกรนด์เนน (AAA) กับกล้วยมาฮอย (AAA) (ภาพที่ 2 ก. และ ข.) มีค่าดรรชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 74 เปอร์เซ็นต์ คู่ตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ กล้วยมาฮอย (AAA) กับกล้วยน้ำว้าดำ (ABB) (ภาพที่ 2 ข. และ ค.) มีค่าดรรชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 19 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าดรรชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Similarity coefficient) ของกลุ่มตัวอย่าง

No.	Taxa	Similarity coefficient (%)														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.	Kluai Leb Mu Nang	100														
2.	Kluai Hom Karen	44	100													
3.	Kluai Hom Grand Naine	57	64	100												
4.	Kluai Hom Khieo	55	63	72	100											
5.	Kluai Khai Pratabong	54	57	60	61	100										
6.	Kluai Ma Hoi	54	59	74	64	65	100									
7.	Kluai Ngachang	49	47	53	53	56	53	100								
8.	Kluai Khai Boran	35	48	45	48	42	45	41	100							
9.	Kluai Sao Kratueb Ho	53	53	58	56	62	64	57	41	100						
10.	Kluai Hin	42	44	49	50	45	47	55	42	53	100					
11.	Kluai Namwa Kom	37	38	40	44	38	38	44	42	44	55	100				
12.	Kluai Hak Muk Som	43	38	44	45	41	44	52	37	50	59	57	100			
13.	Kluai Tip Kham	51	46	55	52	54	54	53	41	60	53	48	58	100		
14.	Kluai Namwa Dam	22	22	20	24	23	19	26	25	24	25	36	27	32	100	
15.	Kluai Tani Dam	24	24	23	26	22	22	27	28	26	28	36	29	33	54	100
Average		45														

ภาพที่ 2 ตัวอย่างกล้วยหอมแกรนด์เนน (ก.) กล้วยมาฮอย (ข.) และกล้วยน้ำว้าดำ (ค.)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยโดยนำค่าดรรชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาสร้างเดนโดรแกรม แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า กล้วย 15 ตัวอย่าง สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย กล้วยเล็บมือนาง (AA), กล้วยหอมกระเหรี่ยง (AAA), กล้วยหอมแกรนด์เนน (AAA), กล้วยหอมเขียว (AAA), กล้วยไข่พระตะบอง (AAA), กล้วยมาฮอย (AAA), กล้วยงาช้าง (AAB), กล้วยไข่โบราณ (AAB), กล้วยสาวกระทืบหอ (AAB), กล้วยหิน (ABB), กล้วยน้ำว้าค่อม (ABB), กล้วยหักมุกส้ม (ABB) และกล้วยตีบคำ (ABB) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย กล้วยน้ำว้าดำ (ABB) และกล้วยตานีดำ (BB) นอกจากนี้ในกลุ่มที่ 1 ยังสามารถแบ่งออกได้อีกเป็น 3 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยที่ 1 ได้แก่ กล้วยหิน (ABB), กล้วยน้ำว้าค่อม (ABB) และกล้วยหักมุกส้ม (ABB) กลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ กล้วยเล็บมือนาง (AA), กล้วยหอมกระเหรี่ยง (AAA), กล้วยหอมแกรนด์เนน (AAA), กล้วยหอมเขียว (AAA), กล้วยไข่พระตะบอง (AAA), กล้วยมาฮอย (AAA), กล้วยงาช้าง (AAB), กล้วยสาวกระทืบหอ (AAB) และกล้วยตีบคำ (ABB) และกลุ่มย่อยที่ 3 มีเพียงชนิดเดียวคือ กล้วยไข่โบราณ (AAB) ด้วยค่า Bootstrap 100% (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วย 15 ตัวอย่าง

อภิปรายผล

ผลการศึกษาลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ 16 ไพรเมอร์ กับตัวอย่างดีเอ็นเอของกล้วย 15 ตัวอย่าง เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 275 แถบ และมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 200-4,000 คู่เบส สามารถแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ AA-AAA-AAB-ABB กับ ABB-BB ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Racharak & Eiadthong (2007) พบว่าการใช้ไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ 6 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอ 128 แถบ และมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 200-3,000 คู่เบส สามารถจักกลุ่มตัวอย่างออกได้ 2 กลุ่ม จากค่า coefficient value เท่ากับ 0.18 และต่างจากการศึกษาของ สุจิตรา โพธิ์ปาน (2549) พบว่าการใช้เทคนิค RAPD เกิดแถบดีเอ็นเอ 76 แถบ จาก 11 ไพรเมอร์ มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 250-2,000 คู่เบส สามารถแบ่งกล้วยที่นำมาศึกษาออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ BB และ AA-AAB ส่วนการศึกษาของ ฐิติพร โท้มโสภา และคณะ (2556) ใช้เทคนิคแฮฮตอาร์เอพีดีศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วย พบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 184 แถบ มีขนาดประมาณ 350-3,000 คู่เบส สามารถจำแนกกล้วย แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 คือ กล้วยที่มีจีโนม AA และ AAA กลุ่ม 3 คือ กล้วยไข่กำแพงเพชรที่ต้นอ่อนได้รับการฉายรังสีแกมมาซึ่งไม่ทราบจีโนมที่แน่ชัด และกลุ่ม 4 คือ กล้วยจีโนม ABB

จากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสูง (ภาพที่1) การใช้ไพรเมอร์ 16 ไพรเมอร์ พบแถบโพลีมอร์ฟิคเป็นจำนวนมาก โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 94.55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเทคนิคนี้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ ดวงสมร วิเชียร และคณะ (2558) ที่ใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชตระกูลแตงพบแถบโพลีมอร์ฟิคเป็นจำนวนมาก โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 99.27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการพบแถบโพลีมอร์ฟิคเป็นจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช และพบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นตรงกันทุกตัวอย่าง หรือ แถบโมโนมอร์ฟิค (Monomorphic band) จำนวน 15 แถบ ซึ่งแถบดีเอ็นเอดังกล่าวอาจเป็นลักษณะพันธุกรรมเฉพาะของกล้วยที่แตกต่างจากพืชชนิดอื่น ที่จะสามารถพัฒนาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นสำหรับการจำแนกกล้วยได้ เช่น การศึกษาของ สุชีลา ตาลอำไพ และคณะ (2554) ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบจีโนมกล้วย A และ B ด้วยเทคนิค microsatellite enrichment พบว่าได้ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ สำหรับใช้เพื่อบ่งชี้จีโนม A และ B ในกล้วยได้

คู่ตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดคือกล้วยหอมแกรนด์เนนกับกล้วยมาฮอย (74 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของลำต้นที่เตี้ยทั้งกล้วยมาฮอย และกล้วยหอมแกรนด์เนน ซึ่งลักษณะเตี้ยนี้เกิดขึ้นได้มากในกล้วยหอมเขียวค่อม ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน A ในชุด AAA ของกล้วยหอมแกรนด์เนน ดังนั้นจึงเห็นกล้วยหอมเขียวค่อมมีมากชนิดและมีความเตี้ยหลายขนาด ดังเช่นกล้วยหอมแกรนด์เนน กล้วยมาฮอย และกล้วยพระรามซึ่งเตี้ยมากขนาดสามารถนำมาทำเป็นไม้กระถางขนาดกลางได้ (เบญจมาศ ศิลาย้อย, 2558) ส่วนกลุ่มที่ 2 บนเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (ภาพที่ 3) ตัวอย่างกล้วยที่มีลักษณะของลำต้นเทียมมีปื้นสีดำถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันด้วยค่า Bootstrap 100% คือ กล้วยน้ำว้าดำ (ABB) และกล้วยตานีดำ (BB) ซึ่งค่า Bootstrap นี้มีความสัมพันธ์กับความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยค่า Bootstrap 85-100% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับสูง ค่า Bootstrap 71-84% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับปานกลาง ค่า Bootstrap 50-70% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับต่ำของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้ (ดวงกมล ทองอร่าม และคณะ, 2548) อย่างไรก็ตามการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยโดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาขั้นต้นกับตัวอย่างกล้วยเพียง 15 ตัวอย่าง ซึ่งยังไม่ครอบคลุมกับกล้วยทุกพันธุ์ในประเทศ

ไทย โดยข้อมูลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนพัฒนาปรับปรุงพันธุ์กล้วย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของกล้วยต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ สามารถแบ่งตัวอย่างของกล้วยออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ด้วยค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 45% โดยกล้วยหอมแคระกับกล้วยมาฮอยเป็นชนิดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด เท่ากับ 74% และสามารถแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ กลุ่มที่ 1 คือกล้วยที่มีจีโนม AA, AAA, AAB และ ABB และกลุ่มที่ 2 คือกล้วยที่มีจีโนม ABB และ BB

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ที่เอื้อเฟื้ออาคารสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ฐิติพร โท้มโสภา เปรมณัช ขุนปักษี ธีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์. (2556). การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวซาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี. **Thai J. Genet,** 5(1), 201-205.

ดวงกมล ทองอร่าม, วุฒิพงศ์ มหาคา, และคทาวุธ นามดี. (2548). การจำแนกพืชสกุล *Caulokaempferia* K. Larsen (วงศ์ขิง) โดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล. **วารสารวิจัย มข,** 10, 5-12

ดวงสมร วิเชียร กิตติศักดิ์ เฉนียง และ ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร. (2558). **ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชตระกูลแตงบางชนิดโดยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์,** หน้า 143-149. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19: พันธุศาสตร์และจีโนมิกส์: จากการศึกษาระดับโมเลกุลสู่การประยุกต์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เบญจมาศ ศิลาย้อย. (2558). **กล้วย.** พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุจิตรา โพธิ์ปาน. (2549). **การตรวจสอบความสัมพันธ์ของพันธุ์กล้วยกลุ่ม AA AAB และ BB โดยเทคนิค Specific- PCR RAPD SRAP และ AFLP.** (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, คลังความรู้ดิจิทัล มก. สืบค้นจาก http://kukr.lib.ku.ac.th/db/BKN/search_detail/result/193147

สุชีลา ตาลอำไพ, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, เบญจมาศ ศิลาย้อย, และสมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช. (2554). การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อบ่งชี้ยีโนม A และ B ของกล้วย. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม,** 7(14), 33-39.

Bornet, B., & Branchard, M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter,** 19, 209–215.

Gawel, N. L. & Jarret, R. L. (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure of *Musa* and *Ipomoea*. **Plant Molecular Biology Reporter,** *9*(3), 262-266.

Liu, B., & Wendel, JF. (2001). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes,** 1, 205–208.

Page, R.D.M. (1996). TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer applications in the biosciences,** 12, 357–358.

Pavlicek, A., Hrda, S., & Flegr, J. (1999). FreeTree- Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus Frenkelia. **Folia Biologica (Praha),** 45, 97–99.

Powell, W., Machray, C., & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science,** 1, 215–222.

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

Simmonds, N.W., & Shepherd, K. (1955). The taxonomy and origin of the cultivated bananas. **Journal of the Linnean Society of London,** 55, 302-312.