การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการจำแนกเพศของฟักข้าว

Application of DNA markers for Sex Determination of Gac Fruit

ชลิตา ชูคันหอม[1], ปิยนันท์ ชมนาวัง[1], ปิยะฉัตร วิริยะอำไพวงศ์[1], จิระนันท์ อินทรีย์[2], อลงกลด แทนออมทอง[3] และ ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร[1*]

Chalita Chookanhom[1], Piyanan Chomnawang[1], Piyachat Wiriyaampaiwong[1], Jiranan Insee[2], Alonklod Tanomtong[3] and Nattapong Srisamoot[1*]

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถใช้ระบุเพศของฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวม (DNA pool) ของฟักข้าวเพศผู้และเพศเมียเพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอาร์เอพีดีไพรเมอร์ (RAPD primer) 11 ชนิด และไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ (ISSR primer) 13 ชนิด พบว่า อาร์เอพีดีไพรเมอร์ DT4 และ DT7 ให้แถบที่จำเพาะต่อต้นเพศผู้ ชนิดละ 1 แถบ อาร์เอพีดีไพรเมอร์ DT4, PP2 และ PP6 ให้แถบที่จำเพาะต่อต้นเพศเมีย จำนวน 1, 2 และ 2 แถบ ตามลำดับ และอาร์เอพีดีไพรเมอร์ PP6 มีสัมประสิทธิ์การจำแนกเพศสูงที่สุด (50%) ไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P4, P6 และ P8 ให้แถบที่จำเพาะต่อต้นเพศผู้ จำนวน 3, 1 และ 2 แถบ ตามลำดับ ไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P4 และ P8 ให้แถบที่จำเพาะต่อต้นเพศเมีย จำนวน 1 และ 2 แถบ ตามลำดับ ไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P4 สัมประสิทธิ์การจำแนกเพศสูงที่สุด(44.44%) โดยแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อเพศเหล่านี้สามารถพัฒนาต่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะมากขึ้นได้
คำสำคัญ: เครื่องหมายดีเอ็นเอ, จำแนกเพศ, ฟักข้าว, อาร์เอพีดี, ไอเอสเอสอาร์

ABSTRACT: The purpose of this study was to determine the DNA markers that can be used to identify the genders of Gac fruit (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.). The DNA pool of male and female Gac fruit were used to generate a DNA fingerprint by polymerase chain reaction with 11 RAPD primers and 13 ISSR primers. The amplified results showed that a single male specific DNA band obtained from RAPD primers DT4 and DT7. RAPD primers DT4, PP2, and PP6 provided the specific band for female plants with 1, 2 and 2 bands, respectively. RAPD primer PP6 has a highest (50%) sex determination coefficients. ISSR primers P4, P6, and P8 obtained some male specific bands of 3, 1 and 2 bands, respectively. The female specific DNA bands were found in ISSR primers P4 and P8 with 1 and 2 bands, respectively. For ISSR primer, P4 has a highest sex determination coefficient (44.44%). These sex specific DNA bands can be further developed into more specific DNA markers.
Keywords: DNA markers, Sex determination, Gac fruit, RAPD, ISSR

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์
Division of Biotechnology, Faculty of Agro-Industrial Technology, Kalasin University

[2] สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์
Division of Animal Production Technology, Faculty of Agro-Industrial Technology, Kalasin University

[3] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University

* Corresponding author: nattapong2.sr@ksu.ac.th

บทนำ

สารสำคัญที่พบในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) คือ ไลโคพีน (Lycopene) และบีตาแคโรทีน (b-Carotene) ซึ่งสามารถลดความเสี่ยงจากโรคมะเร็งหลายชนิด มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระ มีกรดไขมันจำเป็นซึ่งช่วยในการดูดซึมไลโคพีน และบีตาแคโรทีนได้ดียิ่งขึ้น (Ishida et al., 2004) นอกจากนี้ ยังมีการนำเยื่อหุ้มเมล็ดของฟักข้าวมาพัฒนาเป็นแคปซูล เยื่อหุ้มเมล็ดแช่เยือกแข็ง เยื่อหุ้มเมล็ดตากแห้ง เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม ขนม อาหารเสริมสุขภาพ และเครื่องสำอาง (พัชริน และกมล, 2554; พัชริน, 2555)

ฟักข้าวเป็นพืชที่ดอกเพศผู้ และดอกเพศเมียอยู่แยกต้น (dioecious plant) ในการเพาะปลูกเพื่อสกัดสารสำคัญจึงต้องการต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดแล้วเจริญไปเป็นต้นเพศเมียมีดอกเพศเมียในสัดส่วนที่สูงกว่า เนื่องจากดอกเพศเมียเท่านั้นที่จะเจริญไปเป็นผลและมีเมล็ด แต่การจำแนกความแตกต่างระหว่างต้นเพศผู้และต้นเพศเมียในขณะที่เป็นต้นกล้าเมื่อพิจารณาจากลักษณะภายนอกนั้นไม่สามามารถแยกได้ ต้องรอให้ต้นโตพอที่จะเห็นความแตกต่างของใบหรือจนกว่าจะออกดอก ซึ่งต้องใช้เวลานานและต้องมีความเชี่ยวชาญจึงจะจำแนกได้อย่างถูกต้อง ดังนั้น หากหากสามารถตรวจสอบเพศฟักข้าวได้ตั้งแต่ระยะที่เป็นต้นอ่อนจะช่วยในการวางแผนเพาะปลูกเพื่อให้ได้สารสำคัญที่อยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดในปริมาณที่มากขึ้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) มีบทบาทสำคัญในการเกษตรหลายๆ ด้าน เช่น การตรวจหาลักษณะที่สำคัญทางการเกษตร การตรวจสอบลูกผสมในงานปรับปรุงพันธุ์ การศึกษาความหลากหลายของชนิดพันธุ์ รวมทั้งการใช้ตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศ โดยมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับเพศของพืชต่างๆ เช่น กีวี (*Actinidia deliciosa*) (Shirkot et al., 2002) บวบป้อม (*Trichosanthes dioica*) (Kevalkumar et al., 2015) แอสปารากัส (*Asparagus officinalis*) (Gao et al. 2007) แปะก้วย (*Ginkgo biloba*) (Jiang et al. 2003) โต่วต๋ง (*Eucommia ulmoides* Oliv.) (Xu et al., 2004) สละหม้อ (*Salacca* sp.) (วลัยลักษณ์ และคณะ, 2554) และโดยเฉพาะในมะละกอ (*Carica papaya*) (Priyanka et al., 2016; Niroshini et al., 2008; Bedoya and Nunez, 2007; Urasaki et al., 2002) จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้จำแนกเพศของฟักข้าวตั้งแต่เป็นต้นอ่อนเพื่อช่วยประหยัดเวลาและเพิ่มความถูกต้องแม่นยำ และเป็นแนวทางในการวางแผนการเพาะปลูกต่อไป

ในงานวิจัยนี้ เป็นการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถใช้ระบุเพศของฟักข้าวโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) และเทคนิคไอเอสเอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat; ISSR) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถดำเนินการได้ง่าย รวดเร็ว เพื่อใช้คัดเลือกเพศของฟักข้าว

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างฟักข้าว และการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างต้นฟักข้าวเพศผู้และเพศเมียจากจังหวัดกาฬสินธุ์ มหาสารคาม สุรินทร์ บุรีรัมย์ และอุบลราชธานี อย่างละ 10 ตัวอย่าง ทำการสกัดดีเอ็นจากยอดอ่อน (Dolye and Dolye, 1987) ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี 0.8% agarose gel electrophoresis วัดความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 µg/ml ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นทำการรวมดีเอ็นเอของฟักข้าวเพศผู้ทุกตัวอย่างเข้าด้วยกัน (DNA pool) เพื่อใช้เป็นตัวแทนของดีเอ็นเอฟักข้าวเพศผู้ และทำแบบเดียวกันนี้ในดีเอ็นเอของฟักข้าวเพศเมีย

การสร้างลายพิมพ์อาร์เอพีดีด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์ (RAPD primer) 11 ชนิด (**Table 1**) ชนิดละ 3 ซ้ำ องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรสปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย sterile dH_2O, 10X *Taq* buffer, 50 mM $MgCl_2$, 0.5 µM primer, 2.5 mM dNTP, 0.5 unit *Taq* DNA polymerase และดีเอ็นเอต้นแบบ (20 µg/ml) แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ต่อด้วย Annealing Temperature ของแต่ละไพรเมอร์ (**Table 1**) เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยทำซ้ำในขั้นที่ 2 จำนวน 40 รอบ ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 นาที

การสร้างลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ (ISSR primer) 13 ชนิด (**Table 2**) ชนิดละ 3 ซ้ำ และดำเนินการเช่นเดียวกันกับการสร้างลายพิมพ์อาร์เอพีดี

การวิเคราะห์แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาตรวจผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับ 1kb DNA ladder marker โดยใช้กำลังไฟ 10 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 45 นาที แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ 15 นาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์ 11 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 82 แถบ (**Table 1**) เป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อฟักข้าวเพศผู้และเพศเมียเท่ากับ 2 และ 5 แถบ ตามลำดับ คิดเป็นสัมประสิทธิ์การจำแนกเพศ (ร้อยละของแถบที่จำเพาะต่อเพศต่อจำนวนแถบที่เกิดขึ้นทั้งหมด) เท่ากับ ร้อยละ 8.54 อาร์เอพีดีไพรเมอร์ PP6 มีค่าสัมประสิทธิ์การจำแนกเพศฟักข้าวสูงที่สุด ร้อยละ 50.00 อาร์เอพีดีไพรเมอร์ PP4 เกิดแถบดีเอ็นเอมากที่สุด และอาร์เอพีดีไพรเมอร์ PP6 เกิดแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด โดยมีจำนวนแถบที่เกิดขึ้นเท่ากับ 10 และ 4 แถบ ตามลำดับ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อฟักข้าวเพศผู้พบได้จากดีเอ็นเอของอาร์เอพีดีไพรเมอร์ DT4 และ DT7 ชนิดละ 1 แถบ มีขนาดประมาณ 550 คู่เบส และ 1,100 คู่เบส ตามลำดับ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อฟักข้าวเพศเมียพบได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของอาร์เอพีดีไพรเมอร์ DT4 จำนวน 1 แถบ มีขนาดประมาณ 150 คู่เบสจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของอาร์เอพีดีไพรเมอร์ PP2 จำนวน 2 แถบ มีขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส และ 2,300 คู่เบส และจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของอาร์เอพีดีไพรเมอร์ PP6 จำนวน 2 แถบ มีขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส และ 2,500 คู่เบส (**Figure 1**)

ไอเอสอาร์ไพรเมอร์ 13 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 120 แถบ (**Table 2**) เป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อฟักข้าวเพศผู้และเพศเมียเท่ากับ 6 และ 3 แถบ ตามลำดับ คิดเป็นสัมประสิทธิ์การจำแนกเพศ เท่ากับ ร้อยละ 7.50 ไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P4 และ P8 มีค่าสัมประสิทธิ์การจำแนกเพศฟักข้าวสูงที่สุด ร้อยละ 44.44 ไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P22 เกิดแถบดีเอ็นเอมากที่สุด และไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P12 เกิดแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด โดยมีจำนวนแถบที่เกิดขึ้นเท่ากับ 12 และ 6 แถบ ตามลำดับ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อฟักข้าวเพศผู้พบได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P4 จำนวน 3 แถบ มีขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส 2,400

คู่เบส และ 3,000 คู่เบส จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P6 จำนวน 1 แถบ มีขนาดประมาณ 2,600 คู่เบส และจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P8 จำนวน 2 แถบ มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส และ 1,700 คู่เบส แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อพักข้าวเพศเมียพบได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P4 จำนวน 1 แถบ มีขนาดประมาณ 550คู่เบส และจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P8 จำนวน 2 แถบ มีขนาดประมาณ 200 คู่เบส และ 400 คู่เบส (**Figure 2**)

Table 1 List of RAPD primers and the number of amplified products detected.

No.	Primer name	Sequence	Annealing Temp.	Number of amplified band	Number of male specific band	Number of female specific band
1	DT4	AGGGAACGAG	23.9	9	1	1
2	DT7	GAGCCCTCCA	28.0	8	1	0
3	PP1	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	48.7	8	0	0
4	PP2	ACACACACACACACACCA	48.7	8	0	2
5	PP3	AGAGAGAGAGAGAGAGAA	46.4	6	0	0
6	PP4	TGTGTGTGTGTGTGGG3	51.0	10	0	0
7	PP5	AGAGAGAGAGAGAGAGCC	51.0	6	0	0
8	PP6	ACACACACACACACACGA	48.7	4	0	2
9	PP7	CTCCTCCTCCTCCTCCTC3	55.5	9	0	0
10	PP8	ACACACACACACACACAG	48.7	7	0	0
11	PP9	ACACACACACACACACGA	48.7	7	0	0
		Sum		82	2	5

Table 2 List of ISSR primers and the number of amplified products detected.

No.	Primer name	Sequence	Annealing Temp.	Number of amplified band	Number of male specific band	Number of female specific band
1	P1	AGAGAGAGAGAGAGAGG	49.0	11	0	0
2	P4	CACACACACACAAC	49.0	9	3	1
3	P6	CACACACACACAAG	49.0	9	1	0
4	P8	GAGAGAGAGAGAGG	52.0	9	2	2
5	P9	GTGTGTGTGTGTGG	52.0	7	0	0
6	P10	GAGAGAGAGAGACC	52.0	7	0	0
7	P11	GTGTGTGTGTGTCC	52.0	8	0	0
8	P12	CACCACCACGC	45.0	6	0	0
9	P13	GAGGAGGAGGC	45	11	0	0
10	P15	GTGGTGGTGGC	45.0	10	0	0
11	P17	GACAGACAGACAGACA	55.0	10	0	0
12	P19	ACACACACACACACACG	59.0	11	0	0
13	P22	CCCCGTGTGTGTGTGT	60.0	12	0	0
		Sum		120	6	3

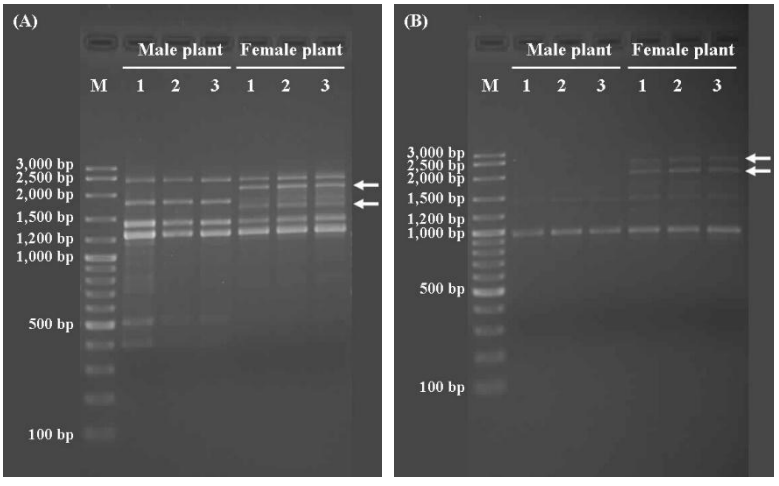

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of RAPD primer with female specific band (A) primer PP2, approximately size 1,700 and 2,300 bp and (B) primer PP6, approximately size 2,000 and 2,500 bp. Arrows indicate female specific band.

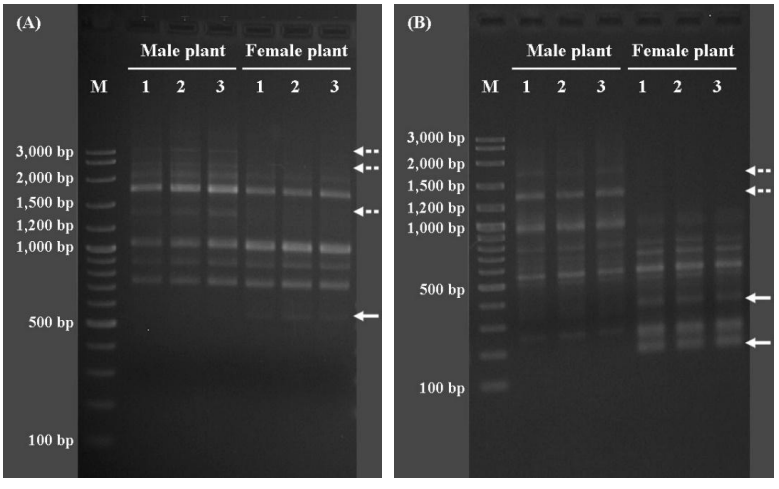

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of ISSR primer with male and female specific bands. (A) primer P4, approximate size 550, 1,400, 2,400 และ 3,000 bp and (B) primer P8, approximate size 200, 400, 1,300 and 1,700 bp. Arrows indicate the male specific bands and dashed arrows indicate female specific bands. Arrows indicate the female specific bands and dashed arrows indicate male specific bands.

จำนวนแถบดีเอ็นเอจากลายพิมพ์อาร์เอพีดีมีค่าเฉลี่ย 7.45 แถบต่อไพรเมอร์ ซึ่งถือว่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ แต่กลับให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศที่สูงถึงร้อยละ 50 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอพีดีไพรเมอร์ในการศึกษานี้ สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอของฟักข้าวได้อย่างทั่วถึงบนจีโนม (genome) เพราะไพรเมอร์ดังกล่าวเป็นไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primer) คือไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด จึงสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (William et al., 1990) ทำให้มีโอกาสที่เข้าจับและเพิ่มปริมาณยีนต่างๆ ของฟักข้าวได้มาก โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศ จึงพบการเข้าจับบนดีเอ็นเอในบริเวณที่มีความจำเพาะต่อเพศของฟักข้าวและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

บริเวณนั้นของอาร์เอพีดีไพรเมอร์ เช่นเดียวกับการศึกษาจำแนกเพศของ *Momordica dioica* Roxb. (Raju et al., 2015) ที่ซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกับฟักข้าว โดยเทคนิคลายพิมพ์อาร์เอพีดี พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ *M. dioica* เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 3 และ 4 แถบ ตามลำดับ จากการใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์ OPA-15 (TTCCGAACCC) นอกจากนี้ Baratakke and Patil (2009) ยังพบว่าอาร์เอพีดีไพรเมอร์ OPA-15 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ *M. dioica* เพศผู้ มีขนาด 1625 คู่เบส จึงใช้เป็นไพรเมอร์เครื่องหมายในการแยกเพศ *M. dioica* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมสำหรับการแยกเพศก่อนถึงวัยเจริญพันธุ์ จากการศึกษาของ Patil et al. (2012) และ Baratakke et al. (2013) อาร์เอพีดีไพรเมอร์ OPA-15 นี้ ยังให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ *M. dioica* เพศผู้และเพศเมียขนาด 1,500 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เทคนิคอาร์เอพีดียังมีปัญหาเกี่ยวกับการทดลองซ้ำ เนื่องจากผลกระทบของความไวต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบ ส่วนประกอบปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และสภาวะของอุณหภูมิแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้ (Kumari and Thakur, 2014) จากปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงทำการทดลอง 3 ซ้ำ และควบคุมปฏิกิริยาทุกขั้นตอนให้เป็นแบบเดียวกันเสมอ เพื่อให้ผลการทดลองเป็นที่น่าเชื่อถือ นอกจากนี้ Raju et al. (2015) และ Baratakke et al. 2013 ยังรายงานว่าแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศจากลายพิมอาร์เอพีดีมีความสามารถในการทำซ้ำได้แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหรือสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอาร์เอพีดีไพรเมอร์แสดงให้เห็นว่าสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะมากขึ้นได้ ซึ่งปัจจุบันมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นเครื่องหมายเอสซีเออาร์ (SCAR; sequence-characterized amplified region) ที่เชื่อถือได้และใช้งานง่ายกว่า (Baratakke et al., 2013) เช่นเดียวกับลายพิมพ์ไอเอสอาร์ที่มีค่าเฉลี่ยจำนวนแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 9.23 แถบต่อไพรเมอร์ ซึ่งถือว่าต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของดวงสมรและคณะ (2558) ที่ศึกษาลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์ของพืชตระกูลแตง 9 ชนิด และมีค่าเฉลี่ยจำนวนแถบดีเอ็นเอสูงถึง 40.80 แถบต่อไพรเมอร์ ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษานี้ศึกษาเฉพาะฟักข้าวเพียงชนิดเดียว การเกิดแถบดีเอ็นเอจึงมีความหลากหลายต่ำ อย่างไรก็ตาม แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นก็สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นสำหรับการจำแนกเพศ และพัฒนาต่อเป็นเครื่องหมายเอสซีเออาร์ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้เทคนิคลายพิมพ์อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่เหมาะสำหรับการจำแนกเพศฟักข้าวมากกว่าเพราะมีค่าสัมประสิทธิ์การจำแนกเพศสูงกว่าเนื่องจากสัดส่วนของจำนวนแถบที่จำเพาะต่อเพศต่อจำนวนแถบที่เกิดขึ้นทั้งหมดสูงกว่า และจำนวนแถบดีเอ็นที่เกิดขึ้นทั้งหมดน้อยกว่าเทคนิคลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์ ซึ่งจำนวนแถบที่เกิดขึ้นน้อยกว่านี้ช่วยให้การพิจารณาแถบที่จำเพาะต่อเพศของฟักข้าวดำเนินการได้รวดเร็วกว่า

สรุป

เทคนิคลายพิมพ์อาร์เอพีดีและลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์ สามารจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างฟักข้าวเพศผู้และเพศเมียได้ โดยอาร์เอพีดีไพรเมอร์ DT7 แสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อฟักข้าวเพศผู้ อาร์เอพีดีไพรเมอร์ PP2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อฟักข้าวเพศเมีย และอาร์เอพีดีไพรเมอร์ DT4 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อทั้งฟักข้าวเพศผู้และเพศเมีย ไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P6 แสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อฟักข้าวเพศผู้ และไอเอสอาร์ไพรเมอร์ P4 และ P8 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อทั้งฟักข้าวเพศผู้และเพศเมีย โดยไม่พบไอเอสอาร์ไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อฟักข้าวเพศเมียเพียงอย่างเดียว เทคนิคลายพิมพ์อาร์เอพีดีให้สัมประสิทธิ์การจำแนกเพศที่สูงกว่าลายพิมพ์ไอเอสเอสอาร์จึงเหมาะที่จะนำไปพัฒนาต่อเป็นเครื่องหมายเอสซีเออาร์สำหรับการจำแนกเพศฟักข้าวที่ถูกต้องและรวดเร็วยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ 2560 และขอขอบคุณ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ที่เอื้อเฟื้ออาคารสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ดวงสมร วิเชียร, กิตติศักดิ์ เฉนียง และณัฐพงษ์ ศรีสมุทร. 2558. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชตระกูลแตงบางชนิดโดยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์. น.143-149. ใน: การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19 เรื่อง พันธุศาสตร์และจีโนมิกส์: จากการศึกษาระดับโมเลกุลสู่การประยุกต์. 15-17 กรกฎาคม 2558. โรงแรมเซ็นทารา แอนคอนเวนชันเซนเตอร์ขอนแก่น, ขอนแก่น.

พัชริน ส่งศรี, และกมล เลิศรัตน์. 2554. ฟักข้าวมหัศจรรย์ผักพื้นบ้านต้านมะเร็ง. เคหะการเกษตร. 35: 173-174.

พัชริน ส่งศรี. 2555. ฟักข้าวพืชพื้นบ้านคุณค่าสูงเพื่อสุขภาพ. แก่นเกษตร. 40: 1-6.

วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์, เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์, อรอนงค์ พริ้งศุลกะ และอัจฉริยา รังษิรุจิ. 2554. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำ พันธุ์เศรษฐกิจและการระบุเพศของสละหม้อจากจังหวัดจันทบุรี. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 27(2): 179-191.

Baratakke, R.C., and C.G. Patil. 2009. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Momordica dioica* Roxb. Indian J. Genet. 69(3): 254-255.

Baratakke, R.C., C.G. Patil, B. Poornima, and S.H. Sankannavar. 2013. Molecular tool for sex identification (female) in *Momordica dioca* Roxb. with reference to medical values. Int. J. Res. Ayurveda Pharm. 4(4): 487-490.

Bedoya, G.C., and V. Nunez. 2007. A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. Euphytica. 153: 215-220.

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

Gao, W.J., R.L. Li, F. Li, C.H. Deng, and S.P. Li. 2007. Identification of two markers linked to the sex locus in dioecious *Asparagus officinalis* plants. Russ. J. Plant Physiol. 54: 816-821.

Ishida, B.K., C. Turner, M.H. Chapman, and A.T. Mckeon. 2004. Fatty Acid and Carotenoid Composition of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) Fruit. J. Agric. Food Chem. 52: 274-279.

Jiang, L., R.L. You, M.X. Li, and C. Shi. 2003. Identification of a sex associated RAPD marker in *Ginkgo biloba*. Acta Bot. Sin. 45: 742-747.

Kevalkumar, S.P., K.B. Keshubhai, and K. Sushil. 2015, Development of SCAR marker linked to sex determination locus in *Trichosanthes dioica*. Mol. Plant. Breed. 6(15): 1-6.

Kumari, N., and S.K. Thakur. 2014. Randomly Amplified Polymorphic DNA - a brief review. Am. J. Anim. Vet. Sci. 9(1): 6-13.

Niroshini, E., J.M.D.T. Everard, E.H. Karunanayake, and T.L.S. Tirimanne. 2008. Detection of sequence characterized amplified region (SCAR) markers linked to sex expression in *Carica papaya* L. J. Natl. Sci. Found. Sri. 36(2): 145- 150.

Patil, C.G., R.C. Baratakke, and A.M. Sandigwad. 2012. Development of a RAPD-based SCAR marker for sex identification in *Momordica dioica* Roxb. Isr. J. Plant Sci. 60: 457-465. doi: 10.1560/IJPS.60.4.457.

Priyanka, V., Y. Anurag, N.D. Upendra, and Y. Kusum. 2016. Genetics of sex chromosomes and sex-linked molecular markers in papaya (*Carica papaya* L.). Mol. Plant. Breed. 7(28): 1-18.

Raju, S., R. Chithakari, P. Bylla, and M. Mustafa. 2015. Molecular confirmation of sex in regenerated plantlets of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb. Ex. WILD) by using RAPD markers. JEBAS. 3(V): DOI: http://dx.doi.org/10.18006/2015.3(5).407.414

Shirkot, P., Sharma, D.R., and T. Mohapatra. 2002. Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* by RAPD markers. Sci. Hortic. 94: 33-39.

Urasaki, N., M. Tokumoto, K. Tarora, T. Ban, T. Kayano, H. Tanaka et al. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). Theor. Appl. Genet. 104: 281-285.

Xu, W.J., B.W. Wang, and K.M. Cui. 2004. RAPD and SCAR markers linked to sex determination in *Eucommia ulmoides* Oliv. Euphytica. 136: 233-238.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.I. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic. Acids. Res.18: 6231-6235.