



รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาเครื่องหมาย DNA บริเวณ Simple Sequence Repeats (SSRs) เพื่อ
การจำแนกและทำมาตรฐานพันธุ์กล้วยไทย

Development of Simple Sequence Repeats (SSRs) DNA Markers for Identification and
Standardization of Thai Bananas

สัญญาเลขที่ MRG5380133

โดย นาย จามร สมณะ

กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๕๕

สัญญาเลขที่

MRG5380133

รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาเครื่องหมาย DNA บริเวณ Simple Sequence Repeats (SSRs) เพื่อ
การจำแนกและทำมาตรฐานพันธุ์กล้วยไทย

Development of Simple Sequence Repeats (SSRs) DNA Markers for Identification and
Standardization of Thai Bananas

ผู้วิจัย นาย จามร สมณะ

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

การพัฒนาเครื่องหมาย DNA บริเวณ Simple Sequence Repeats (SSRs) เพื่อการจำแนกและทำมาตรฐานพันธุ์กล้วยไทย

จามร สมณะ¹, ทิวา โรจนปริตตา¹, สิริภาพ วงษ์เนียม², ศศิวิมล แสงวงผล³, ปิยวิภา จรรย์ทรัพย์⁴, จิตาพร ภูมิชัย⁴

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

² หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

³ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

⁴ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

บทคัดย่อ

กล้วย (*Musa* L) เป็นพืชเศรษฐกิจและแหล่งอาหารที่สำคัญในเขตร้อนและกึ่งร้อนของโลก การดูแลและปรับปรุงแหล่งพันธุกรรมกล้วยเป็นสิ่งสำคัญในด้านความมั่นคงทางการผลิตอาหารและการใช้ประโยชน์ในรูปแบบอื่นๆ แต่ว่าการจำแนกชนิดและพันธุ์กล้วยไม่แน่นอนและบางส่วนยังเป็นปัญหา โดยเฉพาะในกลุ่มกล้วยปลุกทั้งนี้เพราะมีความหลากหลายของแหล่งกำเนิดที่ซับซ้อนและไม่ทราบแน่ชัด ได้มีการค้นหาและตรวจสอบความหลากหลายของกล้วยบ้างแล้วแต่ก็ยังไม่ได้รับความกระจ่าง และกล้วยในไทยมีส่วนร่วมด้วยน้อยมาก จากปัญหาเหล่านี้จึงจำเป็นต้องมีการใช้เครื่องหมายทาง DNA ที่มีความละเอียดมากขึ้นเพื่อให้ข้อมูลที่ชัดเจนขึ้นเพื่อการจัดการทรัพยากรทางพันธุกรรม Simple Sequence Repeats (SSRs) หรือ microsatellite DNA marker เป็นหนึ่งในเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความสามารถในการจำแนกสูงที่สุดไม่ใช่แค่พันธุ์หรือหรือสายพันธุ์กล้วยแต่ยังบอกสายต้นและความสัมพันธ์กับพ่อแม่พันธุ์ต้นกำเนิดในลูกผสมได้ การพัฒนา microsatellite marker ในกล้วยไทยในการศึกษานี้ใช้ genomic DNA library ของ *Musa balbisiana* กล้วยตานีป่าตาดหลวง (BB genome) ซึ่งเพิ่มความเข้มข้นในส่วนของเบสซ้ำ (CT)_n, (GT)_n, (AAC)_n และ (GAA)_n ด้วยการจับกับเม็ดแม่เหล็กแล้วเลือกประมาณ 100 โคลนที่มีซ้ำ DNA เหล่านี้เพื่อสร้างอย่างน้อย 50 microsatellite loci ในจำนวนนี้ 28 คู่ primer ที่ใช้ได้ดีนำมาทดสอบกับกล้วย 95 ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนกล้วยป่าชนิดต่างๆ และกล้วยปลุกจีโนม AA, AAA, AAB, ABB และ BBB ลายพิมพ์ DNA ที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่างจะนำมาประเมินค่าความหลากหลายของรูปแบบเฉลี่ย (PIC) ค่าคาดการณ์ความหลากหลายเฉลี่ยของยีนต่อตำแหน่ง (Hi) จำนวนอัลลีลเฉลี่ยและความถี่อัลลีลต่อตำแหน่ง ซึ่งค่าที่ได้และรูปแบบสามารถนำมาใช้เป็นตัวอ้างอิงพันธุ์กล้วยสำหรับการจัดการทรัพยากรพันธุ์กล้วยทั้งในระดับประเทศและระดับโลก

คำสำคัญ: Simple Sequence Repeats (SSRs), รูปแบบความหลากหลายของ DNA, เครื่องหมายโมเลกุล, พันธุ์กล้วยปลุก, *Musa*, multiplex PCR, fluorescence probe, capillary fragment analysis

Project code: MRG5380133

Development of Simple Sequence Repeats (SSRs) DNA Markers for Identification and Standardization of Thai Bananas

Jamorn Somana¹, Tiwa Rotchanapreeda¹, Sirapope Wongniam², Sasivimon Swangpol³, Piyarat Chareonsap⁴ and Thitaporn Phumichai⁴

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

²Central Instrument Facility, Faculty of Science, Mahidol University

³Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University

⁴Plant Genetic Conservation Project, under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn

Abstract

Banana (*Musa* L.) is an economically and nutritionally important tropical and subtropical food crops in many countries. Maintenance and improvement banana germplasm are important to ensure the safety for food crop production and other uses. However, identification of banana species and cultivars is not very precise and some still problematic. This usually happens especially in cultivars due to the origin and diversity of edible banana genetic backgrounds are not well known and rather complex. Banana biodiversity and genetic relationships have been evaluated with respect to many parameters but still not very decisive. Little contribution of studies has been done on characterization of Thai bananas. From these problems, it is important to employ more powerful DNA markers to clarify and utilize that knowledge to manage our genetic resources. Simple Sequence Repeats (SSRs) or microsatellite DNA markers are among the most powerful markers, not only to clarify banana samples in clone, variety or cultivar group levels but also able to identify parental relationship in hybrids. Development of microsatellite markers for Bananas in Thailand will be done by using genomic library of *Musa balbisiana* 'Tani Pa Tadluang' (BB genome), which will be enrich for (CT)_n, (GT)_n, (AAC)_n and (GAA)_n repeats using magnetic particles then clone and select. About 100 positive clones will be selected and designed for at least 50 of microsatellites loci. Of which, at least effective 28 primer pairs will be tested for about 95 represent *Musa* species and cultivars (AA, AAA, AAB, ABB, and BBB genome). The DNA fingerprint patterns from each sample will be evaluated for the average polymorphism information content (PIC) value, the average expected gene diversity per loci (H_i), the average numbers of allele and allele frequency of each loci in the test population of wild and cultivated bananas. Those values and fingerprinting patterns will be standardized and set as references for Thai bananas for further genetic resource management of the nation and worldwide.

Keywords: Simple Sequence Repeats (SSRs), DNA polymorphisms, molecular markers, *Musa* cultivars, multiplex PCR, fluorescence probe, capillary fragment analysis

Executive summary

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

กล้วยเป็นพืชพื้นเมืองของไทย ที่พบเห็นได้ทั่วไป และมีอยู่หลายสายพันธุ์ ทั้งกล้วยป่าและกล้วยปลูก แต่ด้วยความเจริญของบ้านเมือง การพัฒนาการเกษตรสมัยใหม่ที่เน้นการป้อนผลผลิตสู่ตลาดด้วยพืชเชิงเดี่ยวเป็นปริมาณมาก แต่กลับขาดองค์ความรู้พื้นฐานและความสนใจของสิ่งดั้งเดิมที่เราเคยมีอยู่ ทำให้ทุกวันนี้มีการนำกล้วยเพียงไม่กี่พันธุ์มาใช้ประโยชน์ ได้แก่ กล้วยน้ำว้า กล้วยหอม กล้วยไข่ และกล้วยหักมุก ซึ่งกล้วยเหล่านี้ก็ไม่ทราบความเป็นมาชัดเจนและกล้วยเป็นพืชที่ต้องอาศัยความชำนาญและการสังเกตอย่างมากทั้งจากลักษณะต้น ใบ ปลี เครือ ผล และรสชาติที่จะระบุพันธุ์ที่แน่นอนซึ่งในหลายโอกาสด้วยประสบการณ์ของคนทั่วไปไม่สามารถระบุได้ชัดเจน ทำให้เสียโอกาสอันดีที่จะเข้าถึง ตรวจสอบและใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางพันธุกรรมเหล่านั้นอย่างสมบูรณ์ และทำให้กล้วยที่มีลักษณะดีแต่ไม่รู้พันธุ์แน่ชัดเหล่านั้นมีโอกาสสูญพันธุ์เพราะไม่มีผู้ใดสนใจรักษาแหล่งพันธุ์เอาไว้ หรือสับสน หลงลืมและถูกทอดทิ้งเมื่อเวลาผ่านไป ทั้งนี้จากการสำรวจโดยกลุ่มของผู้วิจัยในช่วงเวลา 3 ปีที่ผ่านมาพบว่ามียักษ์กล้วยป่าและกล้วยปลูกที่มีลักษณะน่าสนใจและจะเป็นประโยชน์ในด้านต่างๆ อยู่มากมาย เท่าที่พบประเทศไทยมีกล้วยป่า (*Musa spp.* และ *Ensete spp.*) อยู่ประมาณ 12 ชนิด และกล้วยปลูกที่ไม่มีเมล็ดไม่ต่ำกว่า 150 พันธุ์ การอนุรักษ์และค้นคว้าหาวิธีตรวจสอบข้อมูลที่ถูกต้องของพันธุ์กล้วยจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องทำ แต่จะไม่มีที่ยืนและไม่มีประโยชน์เท่าที่ควร หากไม่มีการศึกษาวิจัยเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานอย่างเป็นระบบ เผยแพร่และนำมาใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง การพัฒนาเครื่องหมาย DNA บริเวณ Simple Sequence Repeats (SSRs) เพื่อการจำแนกและทำมาตรฐานพันธุ์กล้วยไทย เป็นโครงการหนึ่งซึ่งทำให้เกิดการศึกษาและใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยป่าและกล้วยปลูก ซึ่งผลการวิจัยในครั้งนี้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้อย่างชัดเจนเช่น

1. ข้อมูลที่ได้สามารถใช้กำหนดมาตรฐานพันธุ์กล้วยที่เป็นแหล่งพันธุกรรมที่อ้างอิงได้ของทั้งพันธุ์กล้วยป่าและกล้วยปลูกที่พบในแหล่งต่างๆ ที่น่าสนใจทั่วประเทศและใช้เป็นฐานข้อมูลพันธุกรรมสำหรับพัฒนา วิจัยหรือปรับปรุงพันธุ์กล้วยในอนาคต
2. นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า เช่น เพื่อการรับรองมาตรฐาน คัดกรองสิทธิพันธุ์พืช การตรวจสอบการปลอมปนของกล้วยและผลิตภัณฑ์จากกล้วยได้
3. ความรู้และข้อมูลด้านเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลและวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมที่พัฒนาขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับกล้วยพันธุ์ใหม่ พันธุ์ต่างประเทศหรือพืชชนิดอื่นๆ ได้
4. ช่วยเสริมความเข้าใจเกี่ยวกับการเกิดขึ้นและวิวัฒนาการของกล้วยที่เกิดตามธรรมชาติและที่เปลี่ยนไปเมื่ออยู่ร่วมกับมนุษย์ซึ่งใช้อ้างอิงข้อมูลเชิงนิเวศวิทยา สังคมวัฒนธรรมและ มานุษยวิทยาได้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อพัฒนาเครื่องหมาย DNA บริเวณ Simple Sequence Repeats (SSR) ที่มีประสิทธิภาพให้สามารถตรวจสอบพันธุ์จำเพาะของกล้วยในกล้วยทุกอายุ ทุกสภาพทั้งพันธุ์กล้วยป่าและกล้วยปลูกซึ่งครอบคลุมกล้วยจากแหล่งต่างๆ ทั่วประเทศและบางส่วนจากต่างประเทศ
2. เพื่อเพิ่มข้อมูลในรายละเอียดของกล้วยพันธุ์ต่างๆ ร่วมกับข้อมูลอื่นที่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้เพื่อกำหนดกลุ่มสายพันธุ์ของกล้วยร่วมกับลักษณะปรากฏต่างๆ ที่น่าสนใจในแต่ละพันธุ์ทั้งกล้วยป่าและกล้วยปลูกให้ได้อย่างชัดเจนแม่นยำยิ่งขึ้น
3. เพื่อนำผลการศึกษาไปใช้เพื่อเป็นส่วนหนึ่งในการกำหนดมาตรฐานการตรวจสอบพันธุ์กล้วยหรือประยุกต์ใช้กับกล้วยจากที่อื่นหรือพืชได้อย่างเหมาะสม
4. เพื่อเพิ่มผลงานวิจัยเกี่ยวกับเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลของพืชในวงศ์กล้วย (Musaceae) ในประเทศไทย

วิธีการทดลอง

1. เก็บข้อมูลและลักษณะโดยละเอียดจากตัวอย่างของกล้วยป่าและกล้วยปลุกบางสายพันธุ์อีกครั้งหลังจากที่ได้รวบรวมมาแล้วจากแหล่งธรรมชาติ พื้นบ้าน หรือแปลงปลูกรวบรวมพันธุ์ทั่วประเทศ ประมาณ 300 ตัวอย่าง กล้วยปลุกจะต้องยืนยันความแตกต่างและความถูกต้องของแต่ละพันธุ์ได้อย่างแน่นอนและได้ผ่านการตรวจสอบลักษณะประจำพันธุ์กับชื่อโดยผู้เชี่ยวชาญร่วมกับข้อมูลด้านอื่นๆ ที่ทำมาแล้วก่อนหน้านี้ว่าถูกต้องสอดคล้องกัน ซึ่งจะครอบคลุมกล้วยปลุกเกือบทุกพันธุ์ ชนิดและชนิดย่อยของกล้วยป่าทุกชนิดในประเทศไทย
2. เก็บตัวอย่าง DNA กล้วยตานีป่าจากสายต้น (clone) ที่มี polymorphic bands ใน genome มากที่สุดที่ผ่านการทดสอบแล้วด้วย AFLP (Wongniam et al., 2008) ซึ่งถือว่าเป็นกล้วยสายต้นปกติที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในจีโนมสูงสุดเท่าที่มี
3. สร้าง genomic DNA library จากกล้วยสายต้นนั้นโดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Travis C. Glenn and Nancy A. Schable (2005) โดยการย่อย genomic DNA ด้วยเอนไซม์ Tru91 และเชื่อมต่อกับ MS adaptor ด้วย DNA ligase และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะกับ MS adaptor PCR product ที่ได้จะจับกับ SSR probe ที่เป็น 5'-biotinylated (GT)₁₅, (CT)₁₅, (AAC)₈, และ (GAA)₈ oligonucleotide ขึ้น DNA ที่ผ่านการคัดเลือกด้วย probe binding enrichment กับ streptavidin paramagnetic beads จะถูก clone เข้าสู่ pJET vector (Fermentas) แล้วนำเข้าสู่ *E. coli* เพื่อสุ่มเลือก colony ที่มี plasmid และ SSR region ให้ได้อย่างน้อยประมาณ 50 colonies/probe
4. นำ colony ที่สุ่มมาขยายเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณ plasmid แล้วสกัด plasmid DNA นั้นมาทำการ sequencing เพื่อนำข้อมูล DNA sequence จากแต่ละ clone นั้นมาออกแบบ SSR specific primers ให้ได้อย่างน้อยประมาณ 10 primer pairs/probe/genome ต่อไป
5. สังเคราะห์ primers จากข้อมูล DNA sequence เพื่อทดสอบกับกล้วยตัวแทนกลุ่มต่างๆ (ประมาณ 20 ตัวอย่างเป็นอย่างน้อย) ที่เลือกให้สามารถแสดงลายพิมพ์ DNA ที่มีความหลากหลายเชิงขนาดที่ปรากฏและคงตัวคือให้ผลที่ชัดเจนเหมือนเดิมทุกครั้งกับกล้วยจากสายต้นเดียวกันและแสดงความต่างเมื่อเทียบกับที่ใช้ในกล้วยต่างกลุ่ม
6. นำ primers ที่ผ่านการทดสอบในกล้วยตัวแทนแต่ละกลุ่มแล้วว่าใช้งานได้มาทดสอบกับกล้วยปลุกส่วนใหญ่และกล้วยป่าบางตัวที่ต้องการทดสอบด้วยวิธี multiplex PCR และ Probe labeled fragment analysis เพื่อให้ได้ผลการอ่านที่แม่นยำ ทำซ้ำได้
7. ประมวลผลเป็นค่า average polymorphism information content (PIC), average expected gene diversity per loci (H_i), average numbers of alleles, allele frequency of each loci และวิเคราะห์หากกลุ่มโดย cluster analysis ด้วยวิธีที่เหมาะสมโดยรวมข้อมูลกับกล้วยป่า
8. นำผลที่ได้จากการประมวลข้อมูลนั้นมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลอื่นที่ได้ทำมาก่อนเพื่อกำหนด SSR primers ที่ให้ผลการจำแนกที่ดีที่สุดประมาณไม่เกิน 20 คู่มาแนะนำเสนอเป็นวิธีทดสอบและเป็นข้อมูลมาตรฐานพันธุ์กล้วยในประเทศไทย และระดับสากลต่อไป

ผลการศึกษาทดลอง

3.1 Sequencing และออกแบบ SSR specific primers

ได้ทำการสกัด genomic DNA จาก *Musa balbisiana* SS & JS 012 ตานีป่าตาดหลวงด้วย plant genomic DNA extraction kit เพื่อให้ได้ genomic DNA คุณภาพดีเพียงพอสำหรับทำ DNA library เพื่อการทำเป็น genomic DNA library โดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Travis C. Glenn and Nancy A. Schable (2005) โดยการย่อย genomic DNA ด้วยเอนไซม์ Tru91 และเชื่อมต่อกับ MS adaptor (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3') ด้วย DNA ligase และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะกับ MS adaptor PCR product ที่ได้นำมาจับกับ SSR probe ที่เป็น 5'-biotinylated (GT)₁₅, (CT)₁₅, (AAC)₈, และ (GAA)₈ oligonucleotide ขึ้น DNA ที่ผ่านการคัดเลือกด้วย probe binding enrichment กับ streptavidin

paramagnetic beads จะถูก clone เข้าสู่ pJET1.2/blunt vector (Fermentas) แล้วนำเข้าสู่ *E. coli* DH5 α เพื่อสุ่มเลือก colony ที่มี genomic DNA fragment พร้อมทั้ง SSR region แทรกอยู่ในยีน *Eco47IR* ซึ่งเป็น negative selection ของ pJET vector โดยได้จาก probe GT₁₅ 257 colony, CT₁₅ 270 colony, AAC₈ 122 colony และ GAA₈ 23 colony จากนั้นจึงตรวจสอบการมีอยู่ของชิ้น genomic DNA ใน vector ด้วยการทำ colony PCR ถ้าได้ชิ้น PCR product เป็นแถบเข้มเพียงอันเดียวต่อ colony โดยมีขนาดต่างๆ กันในแต่ละ colony ซึ่งได้มาทั้งหมด 107 colony (รูปที่ 1) ที่จึงขยายปริมาณและสกัด plasmid นั้น เพื่อทำ sequencing ข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากการทำ sequencing จะอ่านด้วยโปรแกรม Prophet 5.0 (BBN systems and technologies, 1996) ข้อมูลการอ่านที่ชัดเจนมีคุณภาพดีจะนำไปหา repeating motifs ด้วยโปรแกรม SSRIT (Temnykh et al., 2001) (<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>) เพื่อหาบริเวณ microsatellite จำเพาะบน genome ซึ่งในจำนวนนี้มีอยู่ 53 colony ที่มี microsatellite ของกล้วย (รูปที่ 2) เพื่อออกแบบคู่ primer จำเพาะแต่ละบริเวณด้วยโปรแกรม Primer3 (Rosen and Skaletsky, 2000) (<http://frodo.wi.mit.edu/>) โดยมีหลักการออกแบบ primer คือ มีจำนวนเบส 18-27 ตัว % GC $\geq$ 50 และ annealing temp. อยู่ในช่วง 55–60 °C ซึ่งได้ primer ที่จะมาทดสอบในรอบแรกนี้ 29 คู่ (ตารางที่ 1)

3.2 ตรวจสอบและคัดเลือก primers กับกล้วยตัวแทนกลุ่ม

เมื่อได้ microsatellite primers แล้วต้องทำการทดสอบรูปแบบ และความจำเพาะโดยใช้กล้วยป่าชนิดต่างๆ และกล้วยปลูกทุกกลุ่มจีโนมในขั้นต้นทั้งสิ้น 28 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์รูปแบบและขนาด DNA band ที่เกิดขึ้นบน 4.5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย silver nitrate staining (Bassam et al., 1991) แล้วทำให้เจลแห้งบนกระดาษ (รูปที่ 3) ขนาดชิ้น DNA ที่เกิดขึ้นจะวัดเทียบกับ standard DNA marker โดยวิเคราะห์การมีอยู่ของ DNA band ที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ถ้ามี =1 ไม่มี =0 เพื่อนำค่า binary ที่ได้ ไปวิเคราะห์หา number of allele per locus (NA), allele frequency, polymorphism information content (PIC), size of alleles groups of phenotype และ average expected gene diversity (HI) (Anderson et al, 1993) เพื่อหาว่า microsatellite primer คู่ใดสามารถใช้จำแนกความแตกต่างของกล้วยแต่ละตัวออกจากกันได้ดีในเบื้องต้นได้ 383 allele/29 loci, 493 genotype polymorphic patterns, ขนาด bands 118-331 bp, allele frequency 0.037-0.500, PIC 0.408-0.964 ซึ่งได้คัดเลือก primer ที่ให้ค่า PIC, HI สูง และค่า NA ต่ำมาในการทดสอบกับกล้วยจำนวนมากต่อไป

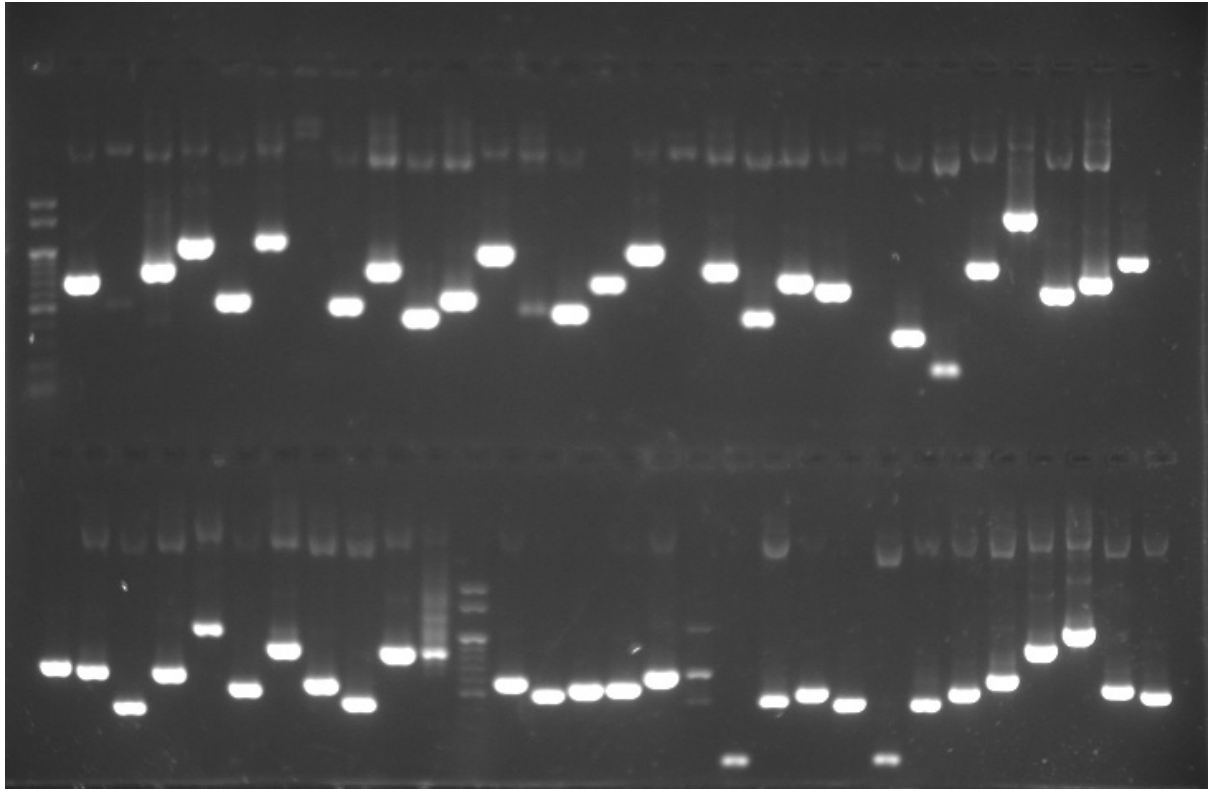
3.3 ทดสอบ primers ที่เลือกไว้กับตัวอย่างกล้วยส่วนใหญ่

microsatellite primer ที่ผ่านการคัดเลือกในรอบแรกมี 28 คู่ ซึ่งนำมาทดสอบที่ทำไปแล้วในขณะนี้กับกล้วยป่า 10 ชนิด 11 ตัวอย่าง และกล้วยปลูก genome แบบต่างๆ อีก 84 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) ให้อยู่ในรูปของ microtiter plate รอบแรกก่อน เพื่อการทดสอบทั้งจำนวนคู่ที่มากและจำนวนตัวอย่างที่มากให้ได้ผลที่แม่นยำ ประหยัดเวลาและเทียบเคียงระหว่างการทดลองอื่นๆ ได้จึงได้พัฒนา multiplex PCR ที่ใช้ปริมาณตัวอย่างและชุดน้ำยาน้อย และ primer ที่ต่อกับ univesal probe sequence ซึ่งสามารถติดฉลากต่อด้วยการทำ PCR กับ fluoresence labelling probes สีสี่ เพื่อการอ่านขนาดชิ้น DNA ที่ได้พร้อมกันสี่คู่ primer ในการทำ PCR ครั้งเดียว (ตารางที่ 3) ซึ่งได้ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับทำ multiplex PCR และการส่งตัวอย่างเพื่อทำ fragment analysis ที่ดีและการวิเคราะห์ค่าที่อ่านได้ต่อไปซึ่งขณะนี้ ได้ทำ multiplex PCR และส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ขนาดชิ้น PCR product ที่มี probe สีต่างๆ ติดอยู่ (รูปที่ 4) เสร็จแล้ว

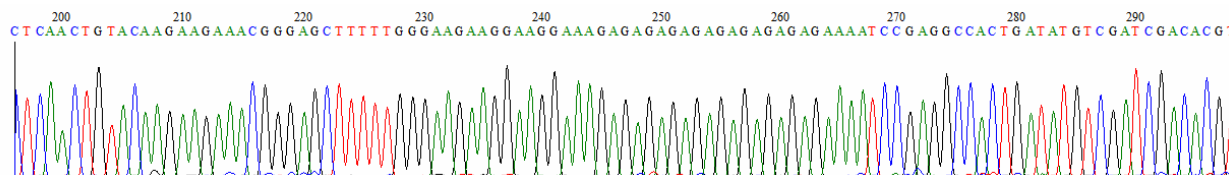
3.4 ประมวลผลและวิเคราะห์ผล

จากการทดสอบ microsatellite 28 คู่ พบว่าที่สามารถใช้อ่าน microsatellite ให้ผลที่ดีคือ ไม่ให้จำนวนชิ้นมาก อ่านได้สม่ำเสมอและมีรูปแบบค่อนข้างตายตัวแตกต่างกันชัดเจนในกล้วยแต่ละตัวประมาณ 24 คู่ ซึ่งมีความแตกต่างระหว่างผลการวิเคราะห์ด้วย PAGE และ fragment analysis โดย fragment analysis มักจะให้จำนวนชิ้น DNA น้อยกว่าและขนาดเล็กกว่า PAGE เล็กน้อย (5-10 bp) แต่ค่า PIC และค่า HI ใกล้เคียงกับการใช้ PAGE แต่ต้องวิเคราะห์ในรายละเอียดต่อไป ส่วนข้อดีของการใช้ fragment analysis คือมีความแม่นยำในการวัดขนาดชิ้น DNA และให้ผลทำซ้ำเหมือนเดิมแม้ว่าจะมีความยุ่งยากมากกว่าบ้างในการอ่านข้อมูล จาก primer 28 คู่ พบว่ามีอย่างน้อย 17 คู่สามารถจำแนกความแตกต่างของ A

กับ B genome และกล้วยเฉพาะกลุ่มได้นอกจากนี้ยังจำแนกต้นกำเนิดทางแม่ของกล้วยปลูกได้ (ตารางที่ 3) ซึ่งเมื่อรวมกับข้อมูลขนาดชิ้น DNA ที่แตกต่างแบบไม่จำเพาะตามกลุ่มของกล้วยแต่ละพันธุ์จากแต่ละคู่ primer แล้วสามารถจำแนกกล้วยเฉพาะเป็นรายพันธุ์ได้ และจำแนกกล้วยชนิดอื่นที่ไม่ได้เกี่ยวข้องเป็นต้นกำเนิดของกล้วยปลูกอีกด้วย และเมื่อนำผลรวมความเหมือนและความแตกต่างของชิ้นที่จำเพาะและไม่จำเพาะเหล่านี้มาจัดกลุ่ม cluster analysis จะสามารถจัดกลุ่มเพื่อให้เห็นระดับความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยแต่ละพันธุ์ได้ (รูปที่5) ซึ่งถ้าได้วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดแล้วคาดว่าจะเขียนสรุปเพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติเช่น Molecular Ecology หรือเทียบเท่าเป็นต้น



รูปที่ 1. แสดงผล colony PCR ของ *E. coli* จาก genomic DNA library ของกล้วย *Musa balbisiana* SS & JS 012 ตามนี้ปาดาดหลวงที่ enrich ผ่าน $(CT)_{15}$ biotinylated oligonucleotide probe จำนวน 58 clone แถบที่ปรากฏแสดงการมีอยู่ของชิ้นส่วน genomic DNA ที่แทรกอยู่ในยีน *Eco47IR* ของ pJET1.2/Blunt vector โดยใช้คู่ primer ที่มีมากับชุด kit (pJET1.2F, pJET1.2R) : ช่องที่ 1 ช่วงบนและช่องที่ 12 ช่วงล่างคือ DNA marker



from the drop-down menu.

dimer

b) Enter the minimum number of repeats you will allow. Entering a '5,' for example, will match SSRs with five or more mo

5

2) Paste/Enter your sequence of interest into the textarea

The sequence(s) must be in FASTA format - meaning, there must be a title line with a '>' at the beginning for each sequence.

FOR EXAMPLE,

```
>seq1
agagattagatcgatcgcgctctctctctctcgatcgatcgat
ggccatcatcatcatcattgagatatagcgatcgagagatc
agaatagatatcgcgctatagagatcgagagagataga
>seq2
agagataggaaatagatagcgggggggggggcgctatacgcgctcg
gagagatctctctctctctttagatcgatcgactagctagatata
agactcactcactcactcactcactcagcgcgat
```

Paste/Enter your sequence(s) here:

```
>BBCT2
NNNGGCCGACTTCGGAGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGATGAGTCCTGAGTAATGCAG
CCAAATCGGAAAGAAGCTCGTACCTGTGGGATCATAACTTTGTTTTGCTGATGCTGACCA
TACAACGAGAGTTGGGGTGATGATGGCGAGCAGAGCCCAGAAGAAGAAGATCAGAGCGTA
GCCTCTAGGAGGCATATCTCAACTGTACAAGAAGAAACGGGAGCTTTTGGGAAGAAGGA
AGGAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAATCCGAGGCCACTGATATGTCGATCGACACGT
CTATTGGACTCCAGAAATTGCTCGGATTGCGGAGAATGTTATCGCAAATACTCAAACAAA
TAAAGCCATTGCGTTTCTGGTCACTACGTGATCGCAATTCTCTACACGACTCATTCCG
TAGTGTGCGCATGTCTCAGGGATATAAGTCCGCTGTGTCGTGCGTGTACCTTTGTCCA
TCTCGGGTTACTCAGGACTCATCTCTTTCTAGAAGATCTCTACAATATTCTCAGCTGC
```

Reset

FIND SSRs

SSRs found in your sequence(s)

Sequence	Motif	No.of Repeats	SSR start	SSR end	SeqLength
BBCT2-1	ag	10	246	265	1100

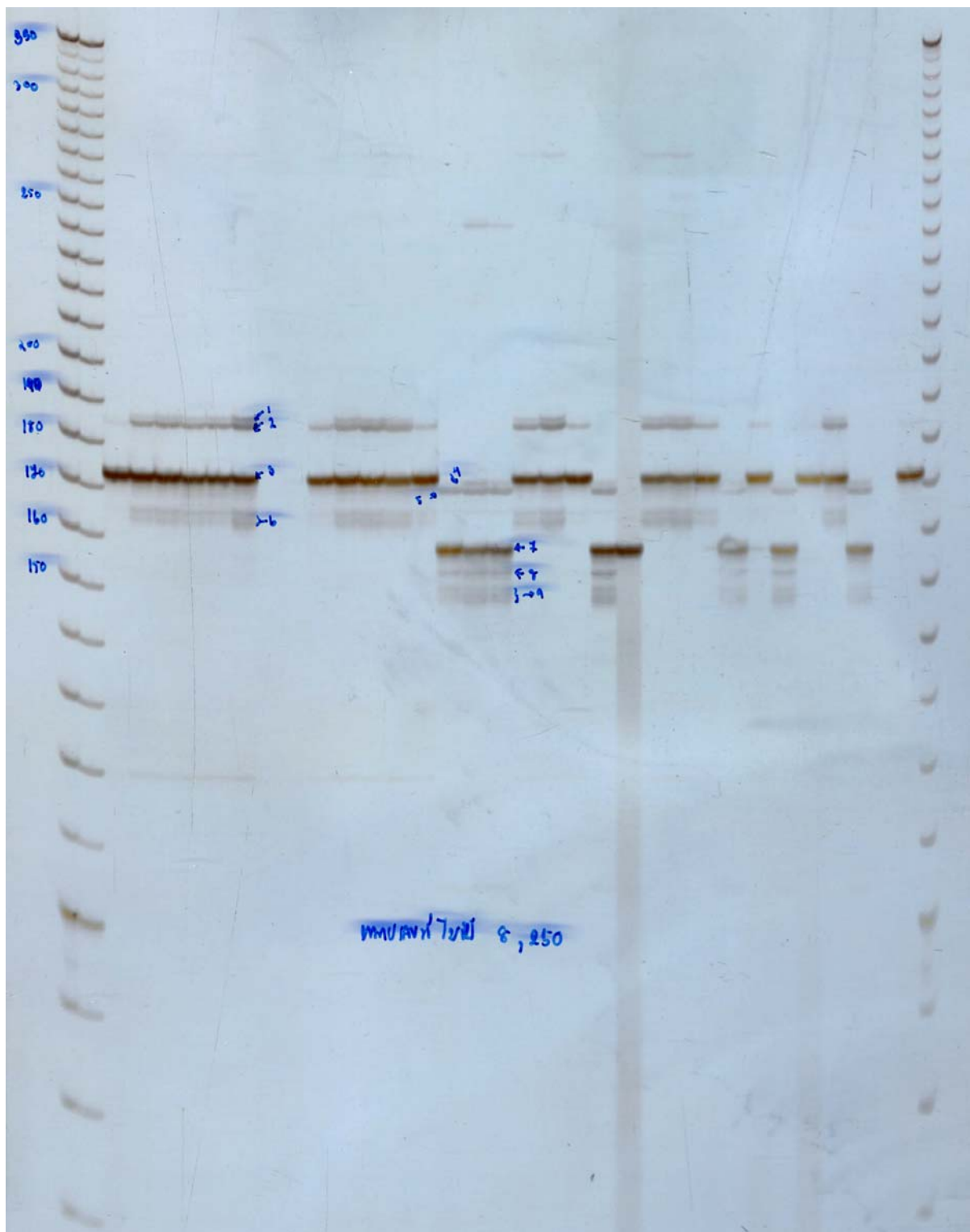
รูปที่ 2. แสดงการนำผล sequencing จาก plasmid ที่ PCR พบชิ้นส่วน genomic DNA ของกล้วย ดังตัวอย่างนี้คือ *Musa balbisiana* SS & JS 012 ตามีปาดาดหลวงที่ enrich ผ่าน (CT)₁₅ biotinylated oligonucleotide probe แล้ว clone เข้า plasmid คัดเลือกได้เป็น colony ที่ 2 (BBCT2) จากผลการอ่านลำดับเบส (บน) นำมาวิเคราะห์หา repetitive region ด้วย Gramene SSR tool (<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>) ในกรณีนี้กำหนดให้หาลักษณะซ้ำไม่เกิน 2 เบส ไม่น้อยกว่า 5 ซ้ำ พบว่ามีเบส AG 10 ซ้ำตำแหน่งเบสที่ 246-265 ซึ่งเข้ากันได้กับการคัดเลือกชิ้นส่วน genomic DNA ของกล้วยด้วย (CT)₁₅ biotinylated oligonucleotide probe ซึ่งผลที่ได้สามารถใช้ในการหาบริเวณจำเพาะบน genome กล้วยเพื่อพัฒนา SSR region specific primer ต่อไป

ตารางที่ 1 SSR primers ที่ผ่านการคัดเลือกจาก genomic DNA library ที่ผ่านการทดสอบกับกล้วย 28 ตัวอย่าง

Marker name	Primers Sequence (5'-3')	Number of Alleles (N_a)	Number of Genotypes	Allele Size (bp)	Allele Frequency
BB_GT-34.1	F: TGCCCTTCAATTCATGTCAA R: TGGTATGCAGCAAGCAAAAG	25	25	331-125	0.037
BB_CT-40	F: GATAGAGGTGCCCACTCCAA R: ATGCCTTCTGCCTCGTCTT	12	15	292-219	0.067
BB_CT-38.1	F: TACTCCCCACCATAAGAGC R: CAGACACGCAAAGGAACG	13	27	285-245	0.037
BB_CT-2	F: TTGTTTTGCTGATGCTGACC R: GCGATAACATTCTCCGCAAT	18	24	280-230	0.042
BB_CT-8	F: GTTCAAGCATCCTCAGCACA R: CCGAAAGGAGAAACCAAGTTG	22	26	279-213	0.038
BB_CT-20	F: GGGAGATAAAGGGCCAACCTT R: GATACAACAGGATCCGAAGCA	14	20	279-219	0.05
BB_CT-38.2	F: TACTCCCCACCATAAGAGC R: CAAATCCTTTGCGTTGTTCC	12	25	269-226	0.04
BB_GAA-7	F: GAATGTGAGCCCTCTTCTCG R: ACTGGACCCGTTTCAGTGAC	7	16	260-220	0.063
BB_CT-19	F: AGGAATTGCTAGTGGGCAGA R: ACCATTTTGACCACCGTCTC	13	20	244-218	0.05
BB_CT-11	F: GGCTGTACTCCTGTGGTGGT R: TGTCACCAATCCATGACCAG	11	19	240-122	0.053
BB_CT-15	F: CACCATTTGTGATGCCACTC R: TAGGCCACATACCCAGCTTC	15	24	240-205	0.042
BB_CT-33	F: GGCAATGTCTCATAAGAAAGAGAG R: TTTTGCACCTTTGCAGAGAA	20	24	240-175	0.042
BB_GT-47	F: TGTGGTTCTTAGCCTTGCACT R: CCAAATACTAGGGACTCCCACA	3	4	240-209	0.25
BB_GAA-35	F: GGGTTTTACCCACCTCTTT R: CGAAACCATTTCCCTCTGAT	8	15	235-170	0.067
BB_CT-7	F: ACGCAACGAGACACAAAC R: GAACGAGAACTGCCTTTGC	6	8	230-211	0.125
BB_AAC-9	F: CTAATTTTCCGCTGCCACTG R: CACGACTGGAAGACGAGTCA	15	21	230-209	0.048
BB_CT-37	F: TGTGGATTGCCATGGTATG R: TCCGAGTCTACTCCCAAGGA	14	21	209-164	0.048
BB_CT-35.1	F: CTGCTTCAGTGAGACCCACA R: ACTAGCAGAAGCGCAGGAAA	4	5	207-201	0.2
BB_GAA-32	F: TGCCACCACAATATATCACCA R: CCAGTTGGTGTCTTGTCTCT	8	7	205-180.5	0.125
BB_GAA-4	F: GATTGCTTGACAGATAATGAACCTT R: GTACCGAAGCTTCCACCAAA	19	23	198-158	0.043
BB_CT-36	F: GGAGCTTGTGATGTGGGAAT R: CCAAGATGTTGATGCTGACC	11	18	197-173	0.056
BB_CT-18	F: CACACCAACCTGTCTGCATC R: CTGAGCAGTTCCCCACTAGC	25	23	192-165	0.043

ตารางที่ 1 SSR primers ที่ผ่านการคัดเลือกจาก genomic DNA library (ต่อ)

Marker name	Primers Sequence (5'-3')	Number of Alleles (N_a)	Number of Genotypes	Allele Size (bp)	Allele Frequency
BB_GAA-31	F: ACCGAAGAAAACGAAGCAGA R: GACCCTCGGATGTGTGTACC	8	11	191-183	0.091
BB_CT-39	F: TTGAGCCTATGATGGGGATG R: TTGGAGTTTGCCTCTCTCAC	15	24	188-135	0.042
BB_AAC-3	F: AAATTCGGGGGTCAAAAAGT R: GAGGGATTTATGGGACGACA	9	6	186-150	0.167
BB_GT-10	F: GAGTGATCCCACCTTGAGGA R: AGCCAACCATCATTGGAGAC	9	12	184-151	0.083
BB_GT-37	F: CAACATCACGTTGCCATAA R: ACATATGTTGGGGCATTGCT	25	26	180-118	0.038
BB_CT-6	F: GGCTTGGTCATCAGAGGAAG R: TGAAGCCAAACCTTTATTGC	19	22	179-149	0.045
BB_GT-14	F: CCCTACATGTCCCTGATTCC R: GCCCGACAATAAACGAGAAA	3	2	218-212	0.5



รูปที่ 3. แสดงการทดสอบ SSR primer กับกล้วยปลูกรุ่นต่างๆ จำนวน 28 ตัวอย่างบน polyacrylamide denaturation DNA gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย silver stain ในที่นี้คือคู่ primer BB_AAC-3 ซึ่งจะมีความยาวที่เกิดขึ้นเป็นชุดๆ มีรูปแบบคล้ายกันในกล้วยปลูกรุ่นเดียวกันเช่น lane 3-8, 11-15, 16-18 เป็นต้น โดยมีลักษณะเป็นแถบเข้มเดี่ยว (เช่นแถบเลขที่ 3,7) หรือแถบบางกว่าซ้อนกันเป็นชุด (เช่นแถบเลขที่ 1,2,6,9) ซึ่งสามารถคำนวณขนาดชิ้น SSR ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับ 10 bp ladder standard DNA marker

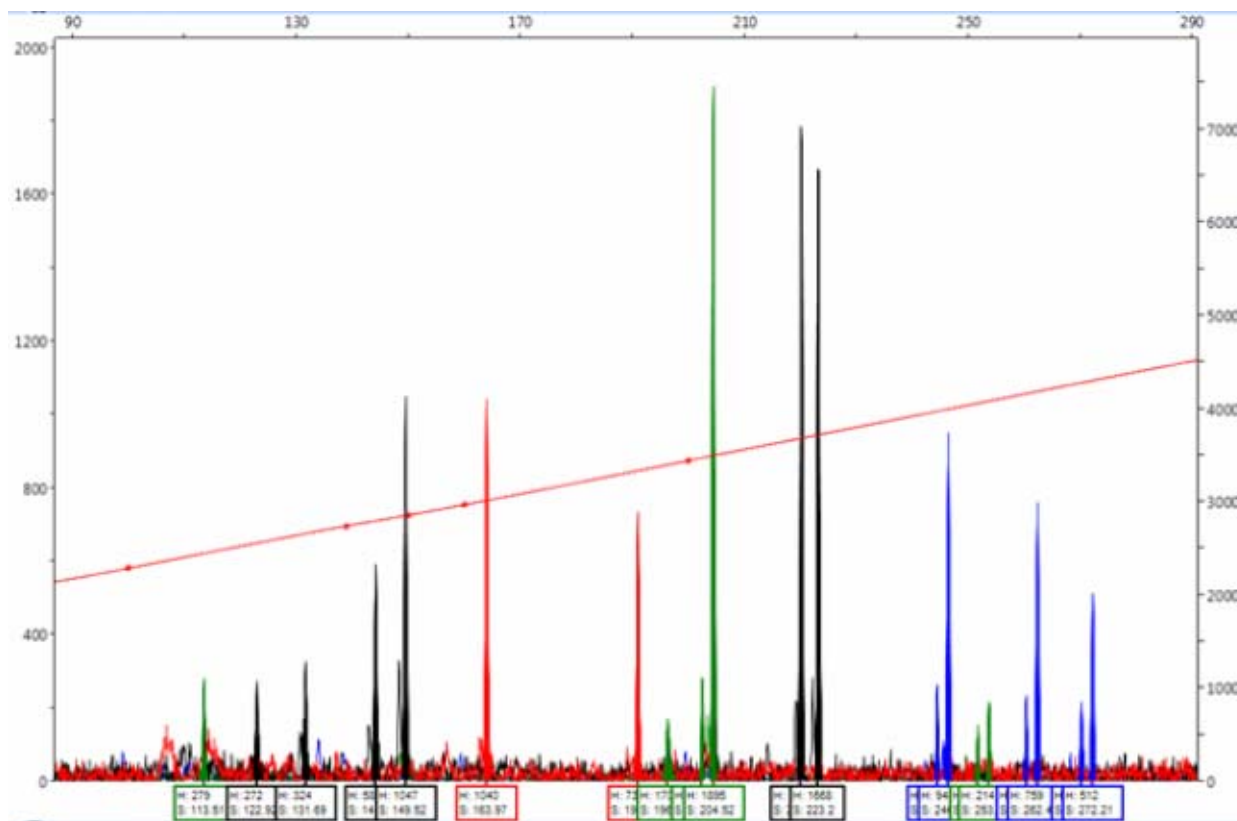
ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างกล้วยในกลุ่มต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจลายพิมพ์ DNA บริเวณ SSR regions ด้วย 28 คู่ primers ที่ได้เลือกแล้วในรอบแรกกับกล้วย 95 ตัวอย่าง

Species	Amount in the accession	Accessions to be tested
WILD	290	11
<i>Ensete glaucum</i>	12	1
<i>Ensete superbum</i>	11	1
<i>Musella larsiocarpa</i>	1	1
<i>Musa acuminata</i>	174	2
<i>Musa balbisiana</i>	42	1
<i>Musa itinerans</i>	21	1
<i>Musa serpentina</i> ¹	6	1
<i>Musa gracilis</i>	1	1
<i>Musa laterita</i>	16	1
<i>Musa ornata</i>	6	1
CUTIVATED	148	84
<i>Musa</i> AA	23	15
<i>Musa</i> AAA	43	22
<i>Musa</i> AAB	25	14
<i>Musa</i> ABB	51	29
<i>Musa</i> BBB	4	3
<i>Musa</i> AABB	2	1
TOTAL	438	95

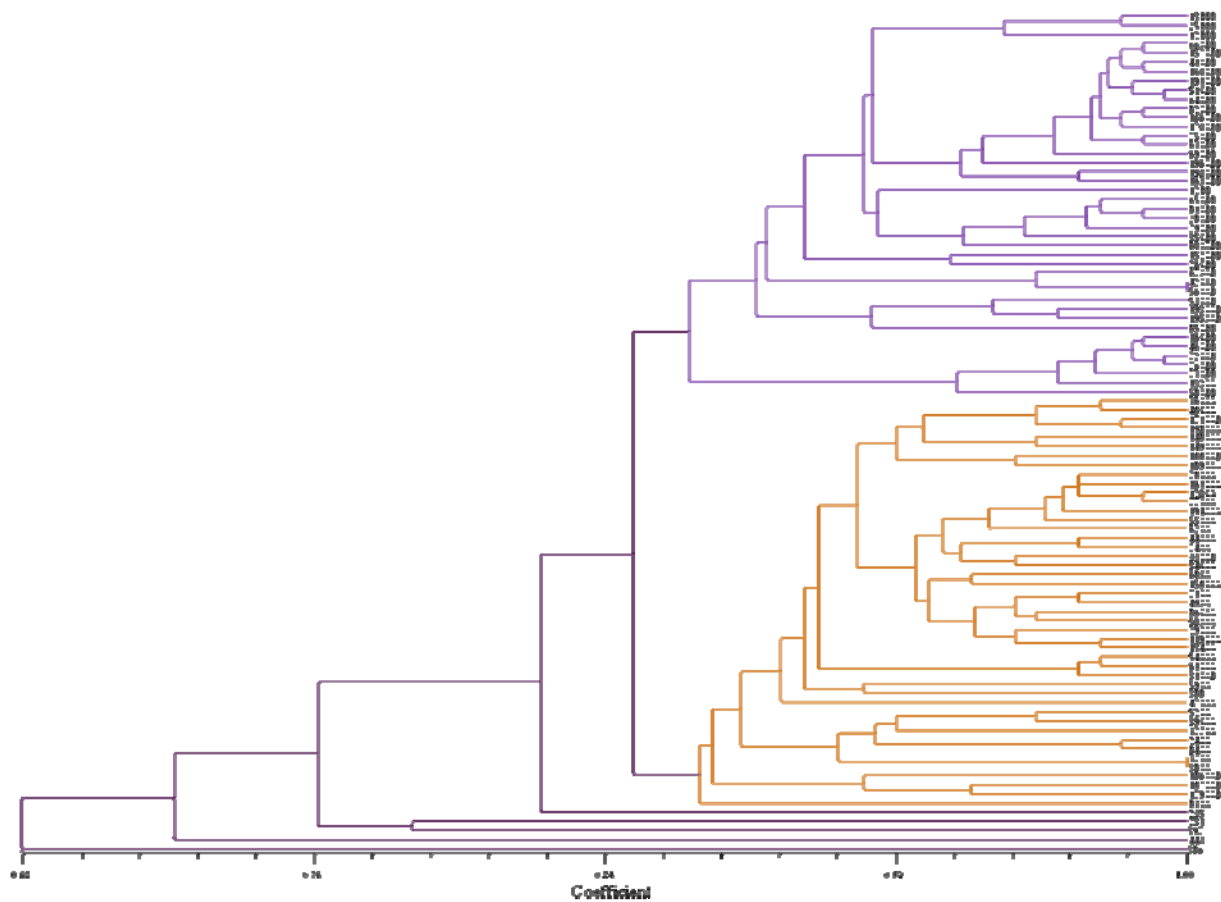
¹ กล้วยป่าชนิดใหม่ของโลก (new species) Swangpol & Somana 2011

ตารางที่ 3 SSR primer สำหรับการทำ fluorescent labeling PCR product โดยแบ่งเป็น 4 สี 7 ชุดเพื่อใช้ทำ fragment analysis ที่พัฒนาจาก 28 คู่ primer ที่คัดเลือกเพื่อทดสอบกับกล้วย 95 ตัวอย่างในรอบแรก

Marked primer name	Primers Sequence (5'-3')	Base	Base extension
29M13fBB_GT-34.1F	CGACGTTGTAAACGAC	37	17
29M13fBB_CT-40F	CGACGTTGTAAACGAC	37	17
29M13fBB_CT-38.1R	CGACGTTGTAAACGAC	34	16
29M13fBB_CT-2F	CGACGTTGTAAACGAC	37	17
29M13fBB_CT-8R	CGACGTTGTAAACGAC	36	16
29M13fBB_CT-20F	CGACGTTGTAAACGAC	37	17
29M13fBB_CT-38.2R	CGACGTTGTAAACGAC	36	16
20M13fBB_GAA-7R	AAAACGACGGCCAGT	35	15
20M13fBB_CT-19R	AAAACGACGGCCAGT	35	15
20M13fBB_CT-11R	AAAACGACGGCCAGT	34	14
20M13fBB_CT-15F	AAAACGACGGCCAGT	35	15
20M13fBB_CT-33R	AAAACGACGGCCAGT	34	14
20M13fBB_GT-47R	AAAACGACGGCCAGT	37	15
20M13fBB_GAA-35F	AAAACGACGGCCAGT	35	15
40M13fBB_CT-7F	GTTTTCCAGTCACG	35	15
40M13fBB_AAC-9F	GTTTTCCAGTCACG	36	16
40M13fBB_CT-37F	GTTTTCCAGTCACG	37	17
40M13fBB_CT-35.1F	GTTTTCCAGTCACG	36	16
40M13fBB_GAA-32F	GTTTTCCAGTCACG	38	17
40M13fBB_GAA-4R	GTTTTCCAGTCACG	37	17
40M13fBB_CT-36R	GTTTTCCAGTCACG	36	16
BGHRBB_CT-18F	GGCACAGTCGAGG	33	13
BGHRBB_GAA-31R	GGCACAGTCGAGG	34	14
BGHRBB_CT-39F	GGCACAGTCGAGG	34	14
BGHRBB_AAC-3F	GGCACAGTCGAGG	34	14
BGHRBB_GT-10R	GGCACAGTCGAGG	31	11
BGHRBB_GT-37F	GGCACAGTCGAGG	33	13
BGHRBB_CT-6R	GGCACAGTCGAGG	34	14
5' Fluorescent labeled primer			
FAM29M13f	CGACGTTGTAAACGAC	17	
HEX20M13f	AAAACGACGGCCAGT	15	
TAMRA40M13f	GTTTTCCAGTCACG	17	
ROXBGHR	GGCACAGTCGAGG	14	



รูปที่ 4. แสดงการทำ fragment analysis ด้วย fluorescent probe 4 สีร่วมกับ multiplex และ nested PCR ในที่นี้ใช้ primer ชุดที่ 1 (BB_GT-34.1, BB_GAA-7, BB_CT-7, BB_CT-18F ดังตารางที่ 3) กับกลายพันธุ์ SS&JS186 ซึ่งสามารถวัดขนาดชิ้น DNA ที่เกิดขึ้นได้อย่างแม่นยำทำได้เหมือนเดิมและใช้เปรียบเทียบโดยตรงกับตัวอย่างอื่นๆ ได้ในอนาคต



รูปที่ 5. แสดงการทำ cluster analysis ด้วยวิธี SAHN และ UPGAMA จากค่าการอ่าน fragment ของ 5 SSR marker ได้แก่ BB_GAA35, BB_GT47, BB_GT10, BB_GAA32, BB_CT35.1 กับกล้วย 92 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถจัดกลุ่มกล้วยเฉพาะแต่ละพันธุ์ สายพันธุ์ และกลุ่ม genome ได้ กลุ่มสีส้ม (ล่าง) คือกล้วยชนิดอื่นๆ กลุ่มสีแดง (กลาง) คือกล้วย *Musa acuminata* genome (AA, AAA) กลุ่มสีน้ำเงิน (บน) คือกล้วยที่มี *Musa balbisiana* genome ปน (AAB, ABB, AABB, BB, BBB)

ตารางที่ 4 SSR primer ที่ตรวจสอบแล้วบางคู่ที่สามารถจำแนกกลุ่ม genome เฉพาะของกล้วยได้

No.	Genotypic groups					
	'A'genome	'B'genome	'AAA'cultivars	'AAB'cultivars	'ABB'cultivars	'BBB'cultivars
1	BB_CT-35.1	BB_CT-7	BB_CT-19		BB_GT-34.1	BB_GT-34.1
2	BB_AAC-3	BB_GAA-31	BB_AAC-9		BB_GAA-7	BB_CT-40
3	BB_GAA-32*	BB_CT-37	BB_GAA-31		BB_CT-40	BB_GAA-4
4		BB_CT-35.1			BB_CT-8	
5		BB_AAC-3			BB_GAA-4	
6		BB_GAA-32*				
7		BB_GT-10				
8		BB_GT-47				
9		BB_CT-38.2				
10		BB_GAA-35				

* SSR primer คู่ที่สามารถจำแนกต้นกำเนิดทางแม่ (maternal inheritance) ได้

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การทบทวนและสำรวจเก็บข้อมูลกล้วยเพิ่มเติม

จากการสำรวจพันธุ์กล้วยทั่วประเทศพบว่าประเทศไทยมีความหลากหลายของกล้วยสูงมากโดยพบเป็นกล้วยป่าที่พบในธรรมชาติ 9 ชนิด นำเข้า 4 ชนิดในจำนวนนี้พบกล้วยตานีป่า *Musa balbisiana* Colla ซึ่งยังไม่เคยมีการรายงานอย่างเป็นทางการว่ามีอยู่ในประเทศไทยแต่การวิจัยครั้งนี้ทำให้สามารถบอกลักษณะความแตกต่างและขอบเขตการกระจายพันธุ์ของกล้วยตานีป่าว่าอยู่บริเวณไหนและต่างกับกล้วยตานีปลูกอย่างไร นอกจากนี้ยังพบว่ากล้วยป่า *Musa acuminata* Colla มีความหลากหลายมากที่สุดคือพบถึง 4 ชนิดย่อย ด้วยการสังเกตจากลักษณะภายนอกและเทียบเคียงกับข้อมูลอ้างอิงก่อนๆ (De Langhe et al., 2000) ได้แก่ subspecies *malaccensis*, *microcarpa*, *siamea*, *truncata* ซึ่งอาจจะพบมากกว่านี้ถ้าได้มีการตรวจสอบค้นหาต่อไป โดย subspecies *truncata* เป็น new record คือไม่เคยมีรายงานในประเทศไทยมาก่อนเช่นเดียวกับกล้วย *Musa yunnanensis* Häkkinen & H. Wang ซึ่งเพิ่งมีการรายงานว่าเป็นชนิดใหม่ของโลกเมื่อ 5 ปีที่แล้ว แต่ก็พบว่ามีกระจายพันธุ์มาถึงภาคเหนือของไทยด้วย กล้วยอีกชนิดซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้รายงานว่าเป็นชนิดใหม่ของโลกแล้วคือกล้วยนาคราช *Musa serpentina* (Swangpol & Somana 2011) และกล้วยป่าอีกชนิด *Musa* sp. ซึ่งน่าจะว่าเป็นชนิดใหม่อยู่ระหว่างการตรวจสอบและกำหนดคำอธิบายกล้วยแต่ละเพื่อให้อ้างอิงต่อไปและอาจกล่าวได้ว่าการศึกษาวินิจฉัยครั้งนี้มาซึ่งการเก็บสะสมข้อมูลและเชื้อพันธุ์กล้วยป่าที่สมบูรณ์ที่สุดในประเทศไทยและจะพยายามให้เป็นแหล่งพันธุ์กล้วยอ้างอิงที่สำคัญแหล่งหนึ่งของโลกในอนาคตต่อไป

ในส่วนของกล้วยปลูกนอกจากสำรวจจากแปลงรวมพันธุ์กล้วยที่ได้เคยมีผู้สะสมไว้มาก่อนแล้ว (Chomchalow and Silayoy 1984) ทางคณะผู้วิจัยได้รวบรวมข้อมูลเพิ่มเติมไว้อีกและได้พบกล้วยปลูกพันธุ์ใหม่ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนเช่น กล้วยขนุน กล้วยนอนตั่ง รวมทั้งพบกล้วยที่มีลักษณะแปลกๆ เช่นมีปลีสีเหลือง มีปลีจำนวนมากแทงยอดออกมาแทนผลเป็นต้น

2. การทำ microsatellite DNA library และการคัดเลือก

ได้ทำการสกัด genomic DNA จากกล้วย *Musa balbisiana* SS & JS 012 ตานีป่าตาตดหลวงซึ่งใช้เป็นกล้วยสายต้นมาตรฐาน ซึ่ง genomic DNA ที่ได้มีคุณภาพดี จากนั้นนำ genomic DNA library มาย่อยด้วย restriction เอนไซม์และเชื่อมต่อกับ MS adaptor ด้วย DNA ligase และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR คัดกรองชิ้น DNA ด้วย SSR probe แล้ว clone เข้าสู่ DNA library vector เพื่อเก็บและขยาย ปริมาณใน *E. coli* ต่อจากนั้นจึงสุ่มเลือก clone ให้ได้ขนาดต่างๆ กัน ซึ่งได้ตรวจสอบแล้วว่าชิ้นส่วน genomic DNA ของกล้วยขนาดต่างๆ อยู่ใน vector จริง แล้วจึงขยาย clone สกัด plasmid เหล่านั้น เพื่อทำ sequencing เมื่อได้ผลการอ่านลำดับเบสและประเมินความน่าเชื่อถือของผล sequencing จากแต่ละ colony แล้วจึงนำผลการอ่านลำดับเบสที่ได้จะนำมาหา repeating motifs เพื่อหาบริเวณที่สามารถนำไปออกแบบคู่ SSR specific primer โดยใช้โปรแกรม Primer 3 ช่วยออกแบบ primer คร่อมบริเวณที่มี SSR จำนวน 29 คู่ซึ่งได้เริ่มนำไปทดสอบความน่าเชื่อถือและความสามารถในการจำแนกกล้วยตัวแทนในแต่ละกลุ่มย่อยก่อนแล้วจึงเลือก SSR specific primer ที่ให้ผลทดสอบดีไปตรวจในกล้วยปลูกส่วนใหญ่ และตัวแทนกล้วยป่าบางชนิดเพื่อวิเคราะห์รายงานผลต่อไป

3. ประมวลผลการจำแนก

เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการทำ fragment analysis จาก primer แต่ละคู่ ในกล้วยแต่ละต้นให้ข้อมูลจำนวนมากซึ่งต้องตรวจสอบความแม่นยำของ peak ที่ได้จริงด้วยตาที่ละตัวซึ่งต้องอ่านทั้งหมดประมาณ 13,000 peak ซึ่งใช้เวลานานแม้ขณะนี้การอ่านยังไม่เสร็จสิ้นทั้งหมดแต่ได้ลองนำค่าบางส่วนมาวิเคราะห์ได้ การจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถแยกกลุ่มกล้วยที่มี genome A ล้วน ออกจากที่มี B ปนหรือ B ล้วน โดยในกล้วยกลุ่ม A มีกล้วยปลูกที่เป็น AA, AAA genome มีความใกล้ชิดกับ *Musa acuminata* subsp. *malaccensis* สำหรับกลุ่ม B แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยกลุ่มแรก เป็นกล้วยตานีและกล้วยปลูก ABB, BBB ส่วนใหญ่กลุ่มนี้น่าจะเป็นกล้วยที่ส่วนหนึ่งหรือทั้งหมดของ

พันธุกรรมกำเนิดในบริเวณประเทศไทย กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบไปด้วยกล้วยกลุ่ม AAB และ ABB บางส่วนกลุ่มนี้ เข้าใจว่านำเข้ามาในประเทศตั้งแต่โบราณ ในส่วนความสามารถในการจำแนก พบว่าไม่มีกล้วยตัวใดมีรูปแบบแถบ DNA เหมือนกันทุกประการในทุกคู่ primer ยกเว้น ตานีแก้วจันทร์ไร้เมล็ด และ ตานีตาตหลวงไร้เมล็ด ซึ่งเป็นตัวที่สงสัยว่าเป็นตัวเดียวกันหรือไม่ ซึ่งสอดคล้องกับกล้วยตัวอื่นที่คัดเลือกแล้วว่าลักษณะคล้ายกันแต่ไม่เหมือนกันทีเดียว สำหรับกล้วยกล้วยและกล้วยงาช้างซึ่งลักษณะภายนอกเหมือนกันมาก แต่รูปแบบแถบ DNA ต่างกันเล็กน้อย สำหรับการจำแนกกลุ่มพันธุ์และสายพันธุ์พบว่าสามารถจัดกลุ่มพันธุ์ย่อยของกล้วยปลูกได้ชัดเจนขึ้นเช่น กลุ่มกล้วยน้ำว้าแม่ตูดคล้ายกันหมดแต่สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มย่อยคือกลุ่มต้นเหลือง เช่น น้ำว้าไล่เหลือง น้ำว้าสวนทองมาเอง และกลุ่มต้นเขียวเช่นน้ำว้าตะนาวศรี น้ำว้าลูกไล่ดำเป็นต้น ส่วนพันธุ์กล้วย ABB ที่ไม่เข้ากลุ่มกับใครเช่น กล้วยหิน กล้วยนิ้วมือนาง กล้วยนางพญา การจำแนกต้นกำเนิดทางแม่พบว่า primer BB_AAC-3 สามารถใช้จำแนกกล้วยลูกผสมที่มีต้นกำเนิดทางแม่จากกล้วยป่า เช่น กล้วยหักมุกต่างๆ กล้วยนมหมี กล้วยไข่โบราณ และกล้วยลูกผสมที่มีต้นกำเนิดทางแม่จากกล้วยตานีเช่น กล้วยน้ำว้าต่างๆ กล้วยหิน กล้วยนางพญา

ความเห็นและข้อเสนอแนะ

ประเทศไทยเป็นส่วนหนึ่งของแหล่งกำเนิดกล้วยมีความหลากหลายของชนิดพันธุ์และรูปแบบการใช้ประโยชน์จากมนุษย์อันเป็นทรัพยากรและข้อมูลอันมีค่ายิ่ง จึงควรมีการส่งเสริมงานวิจัยเช่น การจัดทำมาตรฐานพันธุ์ พัฒนาพันธุ์เพื่อใช้ประโยชน์เฉพาะกิจโดยให้ด้านทานโรคและสามารถส่งเสริมให้ปลูกทั้งในและต่างประเทศได้ การใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยา การดูแลหลังเก็บเกี่ยว การประสานงานการใช้ประโยชน์จากองค์กรต่างๆที่มีศักยภาพที่จะทำได้ให้มากขึ้น เพื่อให้เกิดการพัฒนาและใช้ประโยชน์ได้เท่าเทียมกับพืชเศรษฐกิจอื่นๆ

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ขณะนี้ข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของกล้วยป่าต้นแบบ (*Musa acuminata* subsp. *malaccensis* DH Pahang) ได้เผยแพร่แล้ว แม้จะยังไม่สมบูรณ์เรียบร้อยแต่ก็เป็นจุดสำคัญที่จะขยายงานวิจัยเพื่อใช้ประโยชน์จากพันธุกรรมกล้วยและเข้าใจปัจจัยทางพันธุกรรมทั้งหมดที่กำหนดลักษณะของกล้วยต่างๆ ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาพันธุ์ได้รวดเร็วและแม่นยำขึ้นเช่นเดียวกับข้าวที่ได้ทำแล้วและได้รับการสนับสนุนอย่างดี

ผลงานที่ได้จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

เรื่องแรกได้ตีพิมพ์ไปแล้วได้แก่ Sasivimon Swangpol. and Jamorn Somana. *Musa serpentina* (Musaceae): a New Banana Species from Western Border of Thailand. Thai Forest Bulletin 2011, 39: 31-36
ส่วนเรื่อง "Identification of *Banana Streak Virus* and its endogenous sequences in wild and cultivated Thai Bananas" ในวารสาร Virus Research และ Isolation and Characterization of Microsatellite Markers for Analysis Genotype Identification and Phylogenetic Relationships among Thai Banana (*Musa*) Cultivars ในวารสาร Biochemical Systematics and Ecology ยังอยู่ระหว่างการเตรียมจัดพิมพ์คาดว่าจะได้ตีพิมพ์ภายในปีนี้หรือต้นปีหน้า

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้มีการนำข้อมูลเรื่องกล้วยชนิดที่พบใหม่ของโลกไปนำเสนอต่อสาธารณชนทางหนังสือพิมพ์ได้แก่ มหิตลพบกล้วยนาคราชพันธุ์ใหม่ของโลก หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ ฉบับที่ 8405 ปีที่ 24 ๒๖ ก.ย. พ.ศ. ๒๕๕๔ พบกล้วยนาคราชพันธุ์ใหม่ของโลก หนังสือพิมพ์ไทยโพสต์ ๒๗ ก.ย. พ.ศ. ๒๕๕๔

หมวดข่าว วิทยาศาสตร์-ไอที-เกษตร ตั้งชื่อ'นาคราช'กล้วยพันธุ์ใหม่ของโลก หนังสือพิมพ์คม ชัด ลึก ๒๗ ก.ย. พ.ศ. ๒๕๕๔

หมวดข่าวธรรมชาติพืชและสัตว์ "นาคราช" กล้วยสปีชีส์ใหม่ของโลก พร้อมโชว์ในงาน วทท.37 ASTVผู้จัดการออนไลน์ ๒๗ ก.ย. พ.ศ. ๒๕๕๔

และทางโทรทัศน์ได้แก่

รายการสรุบนันทูไนท์ เรื่อง นาคราช กล้วยชนิดใหม่ ช่อง 11 NBT ๑๔ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๕๔ 23.00 - 24.00 น.

ค้นพบ "กล้วยนาคราช" สายพันธุ์ใหม่ของโลก รายการเช้า-ข่าว 7 สี สถานีโทรทัศน์กองทัพบกช่อง 7 ๒๗ ก.ย. พ.ศ. ๒๕๕๔ 5.00-6.00 น.

ได้มีการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ซึ่งกำลังศึกษาระดับปริญญาโท 1 ราย และกำลังจะศึกษาต่อในระดับปริญญาเอกอีก 1 รายซึ่งคาดว่าจะได้รับทุน คปก. ด้วย

นอกจากนี้ยังได้มีเครือข่ายความร่วมมือเชิงวิชาการกับโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี โดยจะมีการประสานงานกับ ดร. ปิยรัชฎ์ ปริญาพงษ์ ในการใช้ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ DNA polymorphism รวมถึงการเก็บรักษาตัวอย่างที่มีชีวิตในหลอดทดลอง ในด้านการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงอนุกรมวิธานได้มีการประสานงานกับ ดร. ศศิวิมล แสงผล ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลและ ดร. ต่อศักดิ์ สีลนันทน์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. อื่น ๆ

มีการนำเสนอผลงานเชิงวิชาการภาคโปสเตอร์ในระดับชาติ 1 เรื่องคือ

Identification of Genetic Abnormality in Curd Coconut (*Cocos nucifera* L.) (Poster Presentation) The 37th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 37) Centara Grand & Bangkok Convention Centre at CentralWorld, Bangkok, 10-12 October 2011: 243

การนำเสนอผลงานเชิงวิชาการภาคบรรยายในระดับชาติ 1 เรื่องคือ

Occurrence of Episomal Banana Streak Virus in Thailand (Oral Presentation) The 37th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 37) Centara Grand & Bangkok Convention Centre at CentralWorld, Bangkok, 10-12 October 2011: 298

การนำเสนอผลงานเชิงวิชาการภาคบรรยายในระดับนานาชาติ 7 เรื่องคือ

A Survey on the Diversity of Wild Bananas in the Northwest Valley of Thailand (Oral presentation) The 7th International Student Science Fair 2011, Mahidol Wittayanusorn School, Salaya, Nakhon Pathom, Thailand, 11-14 October 2011: 46

A Comparative Study of the Microanatomy of *Musa acuminata* Colla subsp. *siamea*, and *Musa* sp. (Oral presentation) The 7th International Student Science Fair 2011, Mahidol Wittayanusorn School, Salaya, Nakhon Pathom, Thailand, 11-14 October 2011: 47

Occurrence of Multiple Male Buds in Banana (Oral Presentation) The International Symposium on Banana, Royal Flora Ratchaphruek 2011, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand, 23-26 January 2012: 3

Record on the Occurrence of *Banana Streak Virus* in Thailand during the Survey from 2007 to 2011 (Oral Presentation) The International Symposium on Banana, Royal Flora Ratchaphruek 2011, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand, 23-26 January 2012

Treasure of the Land: Diversity of Banana Species and Cultivars in Thailand 2011 (Oral Presentation)
The International Symposium on Banana, Royal Flora Ratchaphruek 2011, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand, 23-26 January 2012: 37

Isolation and Characterization of Microsatellite Markers for Analysis Genotype Identification and
Phylogenetic Relationships among Thai Banana (*Musa*) Cultivars (Oral Presentation) The International
Symposium on Banana, Royal Flora Ratchaphruek 2011, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand, 23-26
January 2012: 31

Flavonoid Composition in Bananas (Oral Presentation) The International Symposium on Banana, Royal
Flora Ratchaphruek 2011, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand, 23-26 January 2012: 45