บทความวิจัย

คาริโอไทป์และชีววิทยาระดับโมเลกุลของมะขามหวาน (พืชสกุลมะขาม) ในจังหวัดเพชรบูรณ์

สุวนิดา อัญจิรเวโรจน์ อัจฉริยา รังษิรุจิ* และ ธวัช ดอนสกุล

บทคัดย่อ

การศึกษาคาริโอไทป์ของมะขามหวานเพชรบูรณ์จำนวน 10 พันธุ์ โดยเตรียมตัวอย่างจากปลายรากที่เพาะด้วยเมล็ด พบว่ามะขามหวานทั้งหมดมีจำนวนโครโมโซม 2n = 24 (x = 12) โครโมโซมมีความยาวเฉลี่ยตั้งแต่ 1.955-2.970 ไมโครเมตร และมีความแตกต่างของคาริโอไทป์แบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้ กลุ่ม 1 พบมะขามหวานพันธุ์ศรีชมภู พันธุ์ประกายทอง พันธุ์สีทองเบา และพันธุ์อินทผาลัม มีคาริโอไทป์ประกอบด้วย 5m + 6sm + 1st คู่ และมีจำนวนแขนโครโมโซม (NF) = 46 โดยพบแซทเทลไลท์ที่โครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริก กลุ่ม 2 พบมะขามหวานพันธุ์ขันตี พันธุ์ฝักดาบ พันธุ์พระโรจน์ พันธุ์หมื่นจง และพันธุ์สีทอง มีคาริโอไทป์ประกอบด้วย 5m + 5sm + 2st คู่ NF = 44 โดยพันธุ์ขันตี พันธุ์ฝักดาบ พันธุ์พระโรจน์ และพันธุ์สีทองพบแซทเทลไลท์ที่โครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริกคู่ที่ 1 ส่วนพันธุ์หมื่นจงพบแซทเทลไลท์ที่โครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริกคู่ที่ 2 และกลุ่ม 3 พบเพียง 1 พันธุ์ ได้แก่ มะขามหวานพันธุ์แสงอาทิตย์ ซึ่งมีคาริโอไทป์ประกอบด้วย 11m + 1sm คู่ NF = 48 และพบแซทเทลไลท์ที่โครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 ในการศึกษาครั้งนี้พบโครโมโซมที่มีแซทเทลไลท์ของมะขามหวานทุกพันธุ์ซึ่งถือเป็นเครื่องหมายโครโมโซม (chromosome marker) นอกจากนี้ผลของ phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี parsimony ของบริเวณ ITS พบว่ามะขามหวานเพชรบูรณ์ที่ศึกษามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง อย่างไรก็ดีผลของการศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุลนี้ได้ยืนยันการจำแนกมะขามหวานพันธุ์แสงอาทิตย์ออกจากพันธุ์อื่นอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคาริโอไทป์

คำสำคัญ: มะขามหวาน คาริโอไทป์ internal transcribed spacer (ITS) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: achariya@swu.ac.th

สุวนิดา อัญจิรเวโรจน์, อัจฉริยา รังษิรุจิ และ ธวัช ดอนสกุล. "คาริโอไทป์และชีววิทยาระดับโมเลกุลของมะขามหวาน (พืชสกุลมะขาม) ในจังหวัดเพชรบูรณ์" *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.* 24, 1 (มิ.ย. 2551) 183-198

SWU Sci. J. Vol. 24 No. 1 (2008)

Karyotypes and Molecular Biology of Sweet Tamarind *(Tamarindus)* in Petchaboon Province

Suwanida Anjirawaroj, Achariya Rangsiruji* and Thawat Donsakul

ABSTRACT

Karyological study of 10 varieties of sweet tamarind *(Tamarindus indica)* in Petchaboon province based on chromosome preparation from root tips showed that all varieties possessed the same diploid chromosome number of 24 (x = 12). The average length of metaphase chromosomes ranged from 1.955 to 2.970 μm. The karyotypes of all 10 varieties were divided into 3 groups as follows. Group 1, including Srichomphoo, Prakaithong, Srithongbao and Intapalum comprised 5m + 6sm + 1st pairs with the arm number (NF) of 46 and a pair of satellites on subtelocentric chromosomes. Group 2, including Khunti, Fagdab, Praroj, Muenjong and Srithong possessed 5m + 5sm + 2st pairs, NF = 44. For each variety of Khunti, Fagdab, Praroj and Srithong, there was a pair of satellites on the first subtelocentric chromosomes. Muenjong, on the other hand, consisted of a pair of satellites on the second subtelocentric chromosomes. Group 3 contained only one distinct variety, namely Sangartit whose karyotype comprised 11m + 1sm pairs, NF = 48 with a pair of satellites on the eighth metacentric chromosomes. In this study, satellited chromosomes were found in all 10 sweet tamarind varieties and were regarded as their chromosome markers. A phylogenetic tree based on parsimony analysis of the ITS region revealed very close genetic relationships among all 10 varieties of the sweet tamarind. Nonetheless, the results of the molecular study confirmed the distinct position of Sangartit which was well corresponded to both the morphology and karyotype.

Keywords: sweet tamarind, karyotypes, internal transcribed spacer (ITS), molecular phylogenetic analysis

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

*Corresponding author, e-mail: achariya@swu.ac.th

บทนำ

พืชสกุลมะขาม *(Tamarindus)* จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae Lindley (หรือ Leguminosae Juss.) คาดว่ามีถิ่นกำเนิดจากทางเอเชียใต้และแอฟริกาตะวันออก [1] และมีเพียง 1 ชนิด คือ *Tamarindus indica* L. ในประเทศไทยแบ่งออกเป็นมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว ซึ่งสามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศ ทำให้มีพันธุ์ต่างๆ กระจายอยู่ทั่วไป จังหวัดเพชรบูรณ์เป็นถิ่นปลูกมะขามหวานพันธุ์ดี โดยมะขามหวานเพชรบูรณ์ได้มีการขึ้นทะเบียนกับกรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์ ทะเบียนเลขที่ สช.48100003 ประกาศตั้งแต่วันที่ 30 กันยายน 2548 โดยการขึ้นทะเบียนมะขามหวานเพชรบูรณ์ได้ประกาศไว้เป็นสินค้าที่มีสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ดังนี้ มะขามหวานเพชรบูรณ์หมายถึง มะขามหวานฝักตรงจากพันธุ์ศรีชมภู พันธุ์ขันตี พันธุ์ประกายทอง พันธุ์ฝักดาบ พันธุ์หวานล่อน และมะขามหวานฝักโค้งจากพันธุ์สีทอง พันธุ์สีทองเบา พันธุ์น้ำผึ้ง พันธุ์อินทผาลัม พันธุ์หมื่นจง และพันธุ์แสงอาทิตย์ ซึ่งปลูกในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ [2] มะขามหวานเพชรบูรณ์มีคุณภาพดี ฝักใหญ่ เนื้อหนาและรสชาติหวานทำให้มีราคาค่อนข้างสูง [3] สำหรับมะขามหวานที่พบในปัจจุบันนี้มีมากกว่า 20 พันธุ์ บางพันธุ์อาจมีลักษณะคล้ายคลึงกัน เจ้าของสวนมะขามหวานมักตั้งชื่อขึ้นเอง โดยอิงจากแหล่งปลูกหรือชื่อของเจ้าของสวน ดังจะเห็นได้จากการประกวดมะขามหวานในจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งพบว่ามีพันธุ์ใหม่ๆ เกิดขึ้นอยู่เสมอ ทำให้เกิดความสับสนต่อทั้งเกษตรกรและผู้บริโภค [4]

การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของพืชจากการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟส นอกจากจะทำให้ทราบจำนวนโครโมโซมที่ชัดเจนแล้ว การจัดเรียงโครโมโซมตามขนาดและรูปร่างเป็นแผนภาพคาริโอไทป์ยังช่วยในการจำแนกความแตกต่างของชนิดและพันธุ์ต่างๆ ของพืชได้อีกด้วย [5] การจำแนกพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นหรือก่อนออกผลอาจทำได้ยาก เนื่องจากมีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายคลึงกัน ผลจากการศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของพืชพบว่าสามารถจำแนกพันธุ์ของพืชเศรษฐกิจได้หลายพันธุ์ เช่น ลิ้นจี่ [6] ลำไย [7] และระกำ-สละ [8] เป็นต้น นอกจากนี้ในการจำแนกพืชที่มีความใกล้ชิดกันยังนิยมใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลอีกด้วย Baldwin [9] ได้ริเริ่มใช้บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของ nuclear ribosomal DNA ในพืชวงศ์ Compositae และพบความแตกต่างของลำดับเบสในวงศ์นี้มากถึง 20% บริเวณ ITS เป็น spacer ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงให้ผลดีในการศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชทั้งในระดับสกุล [10, 11] ชนิดและพันธุ์ [12, 13] ได้ การศึกษาครั้งนี้ซึ่งเน้นด้านเซลล์พันธุศาสตร์และชีววิทยาระดับโมเลกุลของมะขามหวานในจังหวัดเพชรบูรณ์จึงเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีความสำคัญของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย

วิธีการทดลอง

การเก็บรวบรวมตัวอย่าง และการตรวจสอบลักษณะประจำพันธุ์ของมะขามหวาน

เก็บรวบรวมใบและผลของมะขามหวาน 10 พันธุ์ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ พันธุ์ศรีชมภู พันธุ์ขันตี พันธุ์ประกายทอง พันธุ์ฝักดาบ พันธุ์พระโรจน์ พันธุ์สีทอง พันธุ์สีทองเบา พันธุ์อินทผาลัม พันธุ์หมื่นจง และพันธุ์แสงอาทิตย์ จากสวนมะขามหวานในจังหวัดเพชรบูรณ์ โดยตรวจสอบลักษณะประจำพันธุ์ตามแหล่งอ้างอิงที่น่าเชื่อถือ [14-16] และถ่ายรูปเก็บไว้

การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์

การเตรียมโครโมโซมจากปลายราก

การศึกษาคาริโอไทป์ของมะขามหวานทั้ง 10 พันธุ์ ดัดแปลงจากวิธีของธวัช [17] และอัจฉริยา และคณะ [8] โดยเพาะเมล็ดและตัดปลายรากให้มีความยาวประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร ในช่วงเวลา 9.30-10.00 นาฬิกา แช่ตัวอย่างรากในสารละลาย paradichlorobenzene และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อให้การแบ่งเซลล์หยุดอยู่ในระยะเมทาเฟส จากนั้นรักษาสภาพเซลล์ในน้ำยา Carnoy's fluid (absolute ethanol: glacial acetic acid = 3:1) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C นำตัวอย่างรากที่ได้แช่ในสารละลาย 1 N HCl เป็นเวลา 45 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น และแช่ตัวอย่างรากในน้ำยา Carnoy's fluid จากนั้นนำมาสับด้วยมีดผ่าตัดให้ละเอียด แล้วนำใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำยา Carnoy's fluid นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วประมาณ 130 ×g เป็นเวลา 10 นาที ดูดตะกอนที่ก้นหลอดหยดลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วย้อมด้วยสีย้อมกิมซาประมาณ 1-2 ชั่วโมง ตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกภาพเซลล์ปลายรากที่มีโครโมโซมแผ่กระจายดีด้วยฟิล์มขาวดำ โดยให้ได้โครโมโซมจากกลุ่มตัวอย่างเซลล์ไม่น้อยกว่าพันธุ์ละ 50 เซลล์

การวิเคราะห์โครโมโซมและการจัดคาริโอไทป์

นับจำนวนโครโมโซมจากภาพที่ล้างอัดขยาย 4 × 6 นิ้ว โดยให้ความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่นับได้สูงสุด (mode) ของพืชแต่ละพันธุ์เป็นจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) ของพืชพันธุ์นั้น ในการจัดคาริโอไทป์ เลือกเซลล์จำนวน 5 เซลล์ วัดความยาวแขนโครโมโซมจากตำแหน่งเซนโทรเมียร์ไปยังปลายแขนทั้งสองข้างของโครโมโซม ความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ได้จากผลบวกของแขนข้างยาวและแขนข้างสั้น คำนวณอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น เพื่อจำแนกชนิดของโครโมโซมตามวิธีของ Levan และคณะ [18] (ตารางที่ 1) จับคู่โครโมโซมโดยอาศัยอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น

ตารางที่ 1 การจำแนกชนิดของโครโมโซมตามวิธีของ Levan และคณะ

อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น	ชนิดของโครโมโซม	สัญลักษณ์
1.0-1.7	เมทาเซนทริก (metacentric)	m
1.7-3.0	ซับเมทาเซนทริก (submetacentric)	sm
3.0-7.0	ซับเทโลเซนทริก (subtelocentric)	st
7.0-∞	อะโครเซนทริก (acrocentric) หรือ เทโลเซนทริก (telocentric)	t

การหาจำนวนแขนโครโมโซม หรือ arm number (NF) ตามวิธีของ Arai [19]

m, sm (โครโมโซมที่มี 2 แขน) = จำนวนคู่ของโครโมโซม × 4

st, t (โครโมโซมที่มี 1 แขน) = จำนวนคู่ของโครโมโซม × 2

การหาความยาวสัมพัทธ์ หรือ Relative length (RL) ตามวิธีของธวัช [17]

$$RL = \frac{\text{ความยาวสัมบูรณ์ของโครโมโซมคู่เหมือน} \times 100}{\text{ผลบวกของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนแบบแฮพลอยด์}}$$

การหาขนาดของโครโมโซมตามวิธีของ Ullerich [20] สามารถแบ่งโครโมโซมเป็น 2 ขนาด คือ โครโมโซมขนาดใหญ่ ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวเกินครึ่งหนึ่งของค่าเฉลี่ยความยาวโครโมโซมทุกคู่รวมกัน และโครโมโซมที่มีขนาดเล็ก ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของค่าเฉลี่ยความยาวโครโมโซมทุกคู่รวมกัน

การสร้างอิดิโอแกรมสามารถนำค่าเฉลี่ยที่ได้จากการคำนวณอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นมาใช้ โดยเรียงลำดับจากคู่โครโมโซมที่ยาวที่สุดไปหาคู่โครโมโซมที่สั้นที่สุด ให้แขนสั้นอยู่ด้านบนและแขนยาวอยู่ด้านล่าง โดยใช้อัตราส่วนความยาว 1 เซนติเมตรต่อความยาวโครโมโซม 1 ไมโครเมตร ให้แกนนอนหรือแกน X เป็นคู่โครโมโซม (chromosome pairs) แกนตั้งหรือแกน Y เป็นความยาวโครโมโซม (chromosome length)

การศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล

การสกัด genomic DNA

สกัด DNA จากใบมะขามหวานทั้ง 10 พันธุ์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle [21] ซึ่งเริ่มจากการทำความสะอาดตัวอย่างพืชด้วยเอทานอล 70% ตัดตัวอย่างพืชให้มีขนาดเล็กประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ใน microcentrifuge tube แล้วเติมไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดโดยเร็ว จากนั้นเติม CTAB buffer 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที เติม RNase A 2 ไมโครลิตร ตามด้วย “wet” chloroform (chloroform: isoamyl alcohol = 24: 1) 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดของเหลวใสด้านบนใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ สกัดอีกครั้งด้วย “wet” chloroform เติม isopropanol 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนทิ้ง เติม wash buffer (76% ethanol และ 10 mM ammonium acetate) 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนทิ้ง แล้วนำ microcentrifuge tube ไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อให้ DNA pellet แห้ง ละลาย pellet ที่ได้ใน nuclease-free water 50 ไมโครลิตร เก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ในการปั่นเหวี่ยงแต่ละครั้งใช้ความเร็ว 13,800 ×g เป็นเวลา 2 นาที

การทำ PCR และการหาลำดับเบสสำหรับบริเวณ ITS

เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ที่บริเวณ ITS โดยใช้คู่ของ primer ITS5 และ ITS8 [22] ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

ITS5 (forward primer): 5′-GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3′

ITS8 (reverse primer): 5′-CAC GCT TCT CCA GAC TAC A-3′

โดยส่วนประกอบของ PCR reaction มีดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Nuclease-free water	8.75
5X Q-solution	5.0
$MgCl_2$ (25 mM)	2.0
10X buffer	2.5
dNTPs (10 mM)	0.5
Forward primer (10 μM)	2.5
Reverse primer (10 μM)	2.5
DNA template	1.0
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.25
รวม	25.0

ผสมส่วนประกอบของ PCR reaction แล้วนำเข้าเครื่อง thermal cycler (MJ Research Inc.) โดยใช้โปรแกรมซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

Denaturing	94°C	1	นาที	} 30 รอบ
Annealing	53°C	2	นาที	
Extension	72°C	1.5	นาที	
Final extension	72°C	1	นาที	

ตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยวิธี gel electrophoresis และทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) เพื่อนำไปหาลำดับเบส โดยส่งตัวอย่างไปที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

การเทียบเคียงลำดับเบส (sequence alignment)

เทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ ITS ของมะขามหวานทั้ง 10 พันธุ์ที่ศึกษาในครั้งนี้ และพืชที่ใช้อ้างอิงหรือ outgroup species ซึ่งได้ลำดับเบสบริเวณ ITS จาก GenBank database คือ *Gymnocladus chinensis* (GenBank accession number AF510034) และ *Bauhinia corymbosa* (GenBank accession number AF286357) เป็นพืชในวงศ์ Fabaceae เช่นเดียวกับพืชสกุลมะขาม เทียบเคียงลำดับเบสของพืชทั้งหมดโดยใช้โปรแกรม Clustal X [23]

การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมและการสร้าง phylogenetic tree

ใช้โปรแกรม PAUP* version 4.0b [24] เพื่อวิเคราะห์ pairwise distance ซึ่งแสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของมะขามหวานทั้ง 10 พันธุ์และ outgroup species และสร้าง phylogenetic tree โดยวิธีการ parsimony ที่แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชที่ศึกษา พร้อมทั้งวิเคราะห์ค่าทางสถิติ (bootstrap value) เพื่อแสดงความมั่นคงของการจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างในแต่ละกิ่ง (branch) ของ phylogenetic tree

ผลการทดลอง

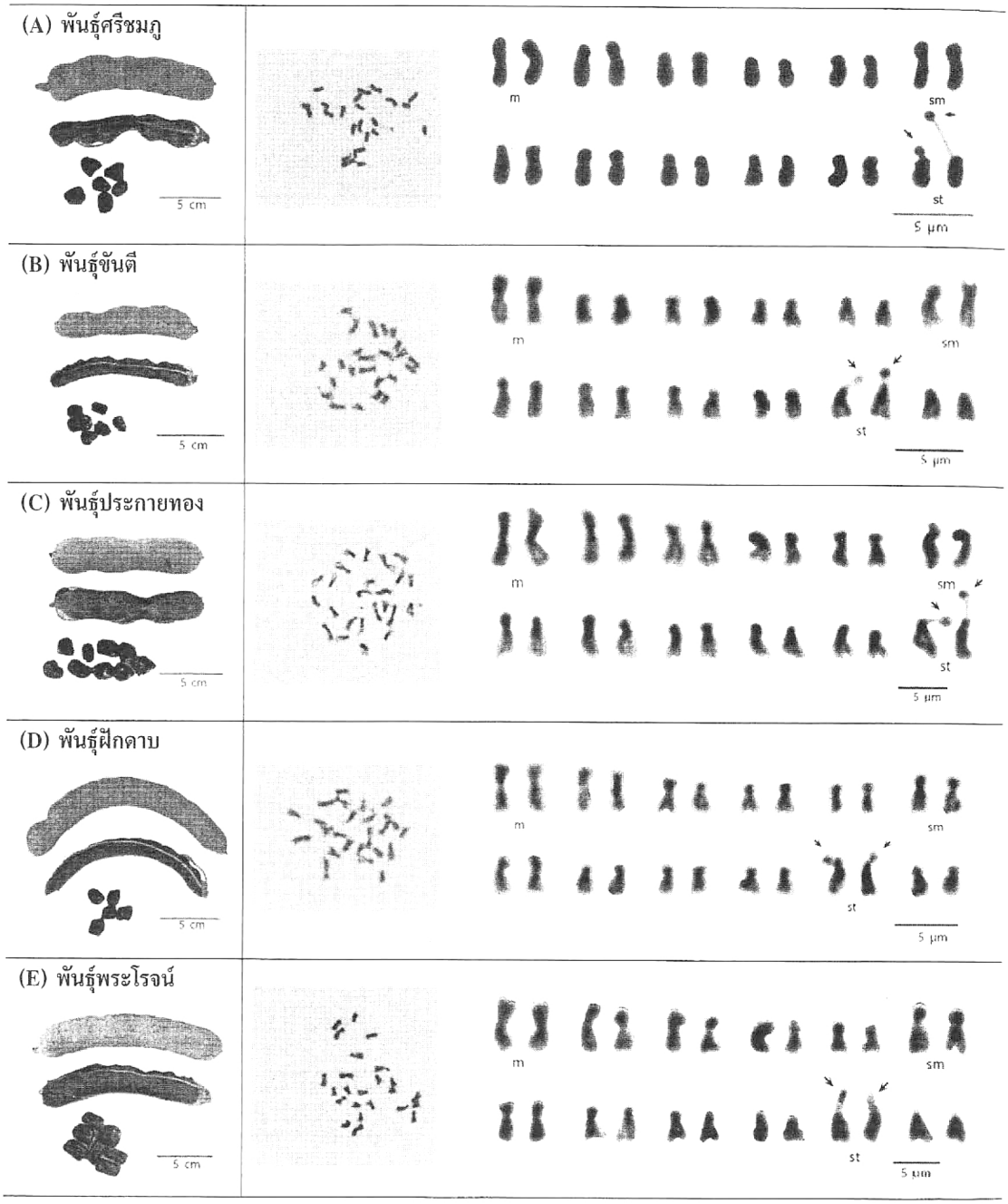
การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์

การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของมะขามหวานพันธุ์ศรีชมภู พันธุ์ขันตี พันธุ์ประกายทอง พันธุ์ฝักดาบ พันธุ์พระโรจน์ พันธุ์หมื่นจง พันธุ์สีทอง พันธุ์สีทองเบา พันธุ์อินทผาลัม และพันธุ์แสงอาทิตย์ โดยศึกษาคาริโอไทป์จากรากที่เพาะด้วยเมล็ดได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 1-4

ตารางที่ 2 ค่าความถี่สูงสุดของเซลล์ จำนวนแขนโครโมโซม ความยาวสัมพัทธ์ ขนาดโครโมโซม และตำแหน่งโครโมโซมที่พบแซทเทลไลท์ของมะขามหวาน 10 พันธุ์

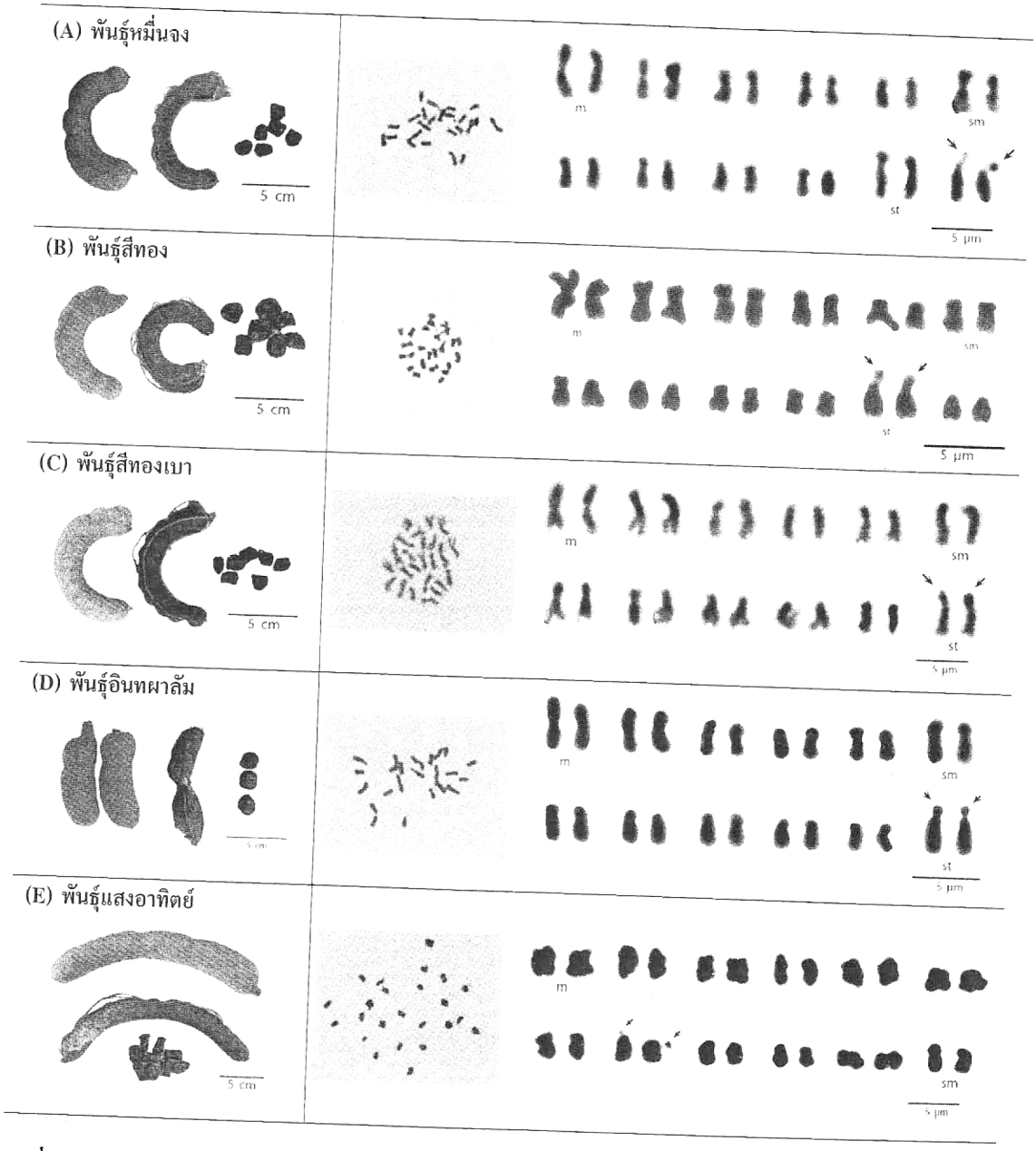
มะขามหวาน	ความถี่สูงสุดของเซลล์ (%)	จำนวนแขนโครโมโซม (NF)	ความยาวสัมพัทธ์ (RL%) พิสัย	โครโมโซมขนาดใหญ่ จำนวน (คู่)	โครโมโซมขนาดเล็ก จำนวน (คู่)	ตำแหน่งโครโมโซมที่พบแซทเทลไลท์
พันธุ์ศรีชมภู	91.25	46	6.584-11.997	4	8	st
พันธุ์ขันตี	84.95	44	6.745-11.096	6	6	st1
พันธุ์ประกายทอง	75.55	46	6.499-11.799	6	6	st
พันธุ์ฝักดาบ	92.30	44	6.246-11.513	5	7	st1
พันธุ์พระโรจน์	70.21	44	5.998-11.860	5	7	st1
พันธุ์หมื่นจง	85.55	44	6.504-11.677	5	7	st2
พันธุ์สีทอง	89.69	44	6.333-10.928	5	7	st1
พันธุ์สีทองเบา	92.55	46	6.083-11.577	5	7	st
พันธุ์อินทผาลัม	78.41	46	6.546-11.021	6	6	st
พันธุ์แสงอาทิตย์	86.87	48	5.949-11.066	6	6	m8

หมายเหตุ: st = ซับเทโลเซนทริก st1 = ซับเทโลเซนทริกคู่ที่ 1
st2 = ซับเทโลเซนทริกคู่ที่ 2 m8 = เมทาเซนทริกคู่ที่ 8



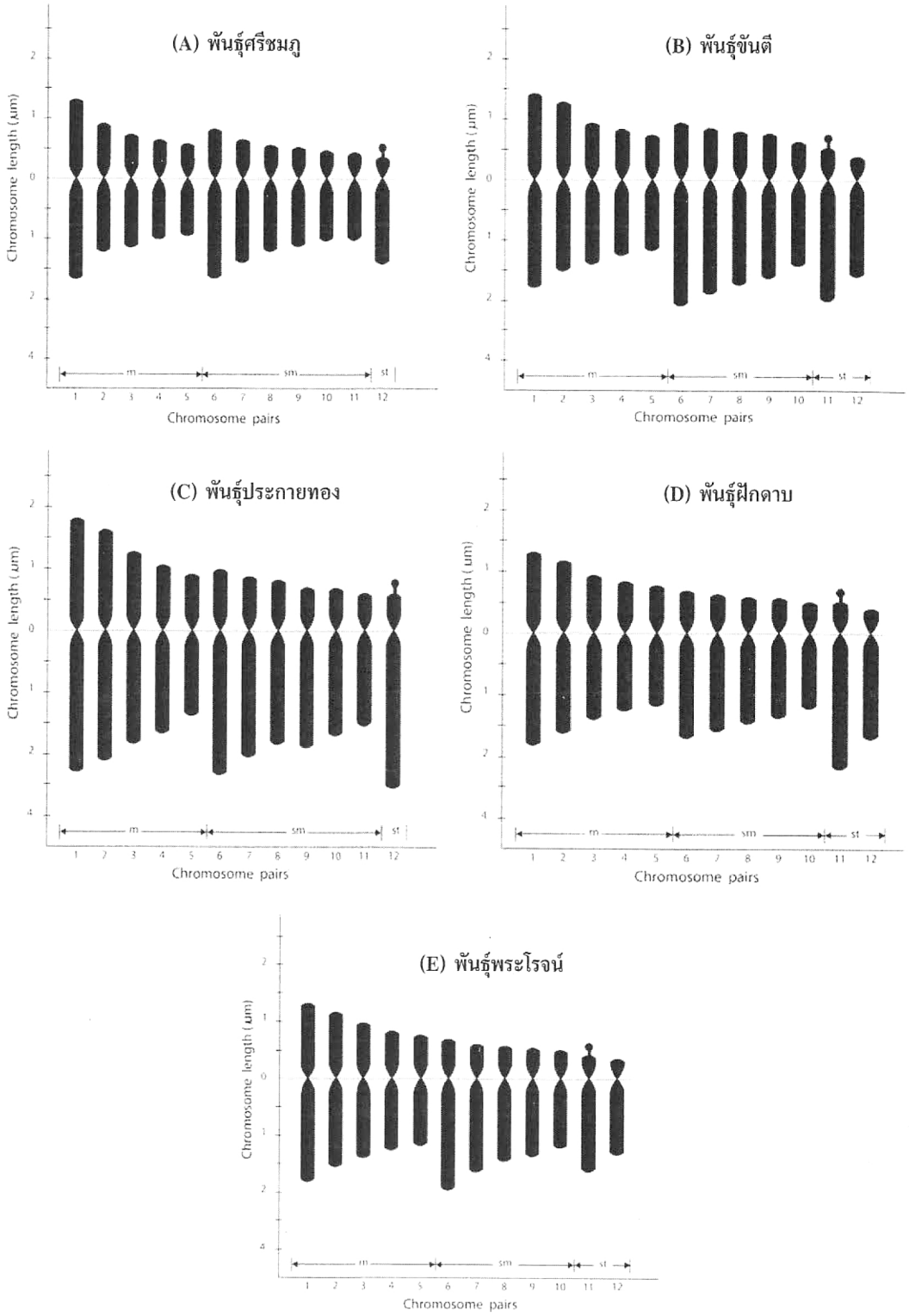
รูปที่ 1 ลักษณะผล เนื้อ และเมล็ดของมะขามหวานประเภทฝักตรง ภาพถ่ายเซลล์ในระยะเมทาเฟส (2n = 24) และคาริโอไทป์ ลูกศรชี้แสดงแซทเทลไลท์

m = เมทาเซนทริก sm = ซับเมทาเซนทริก st = ซับเทโลเซนทริก

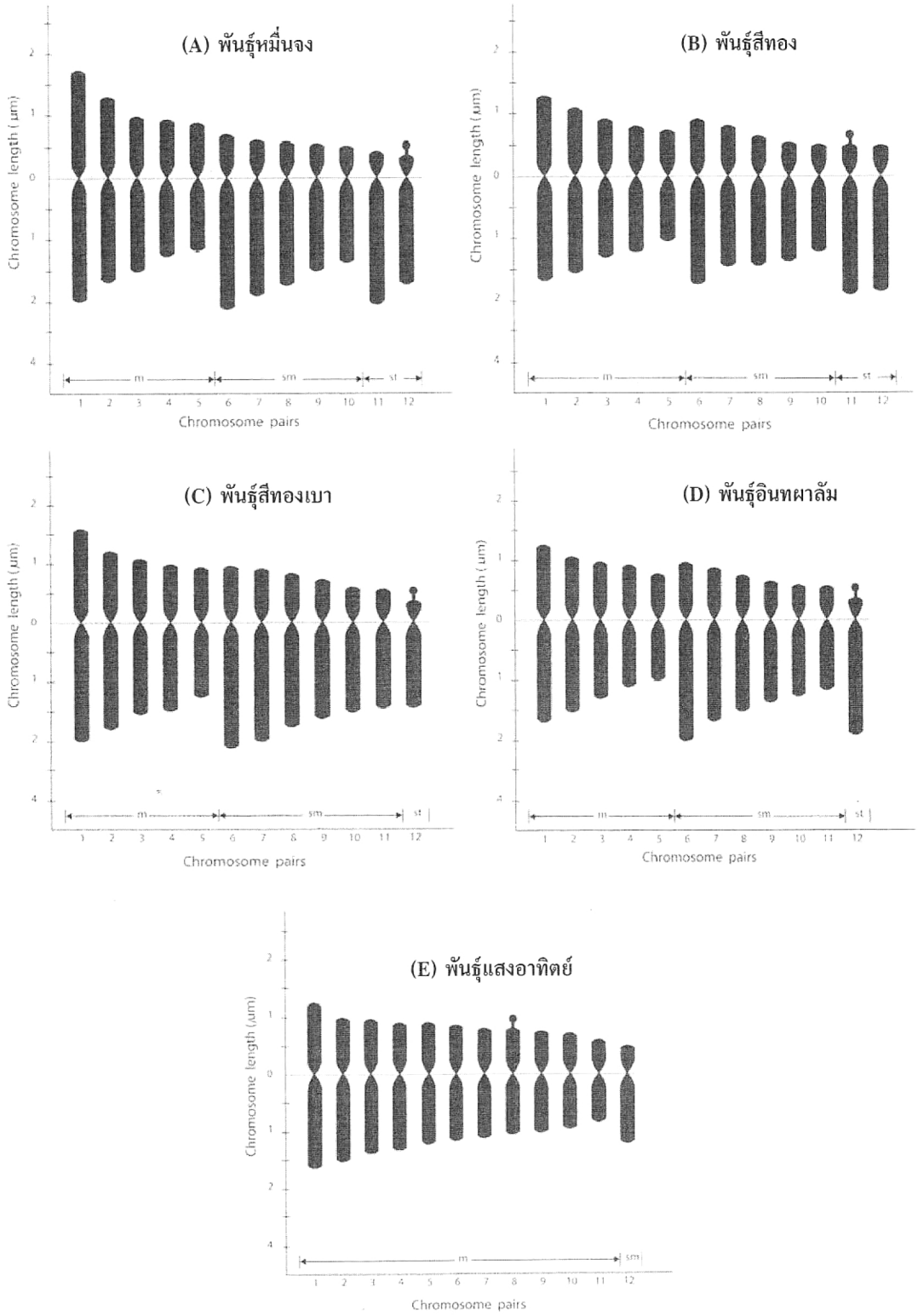


รูปที่ 2 ลักษณะผล เนื้อ และเมล็ดของมะขามหวานประเภทฝักโค้ง ภาพถ่ายเซลล์ในระยะเมทาเฟส (2n = 24) และคาริโอไทป์ ลูกศรชี้แสดงแซทเทลไลท์

m = เมทาเซนทริก sm = ซับเมทาเซนทริก st = ซับเทโลเซนทริก



รูปที่ 3 อิดิโอแกรมของมะขามหวานประเภทฝักตรง จุดกลมสีดำแสดงแซทเทลไลท์
m = เมทาเซนทริก sm = ซับเมทาเซนทริก st = ซับเทโลเซนทริก



รูปที่ 4 อิดิโอแกรมของมะขามหวานประเภทฝักโค้ง จุดกลมสีดำแสดงแซทเทลไลท์
m = เมทาเซนทริก sm = ซับเมทาเซนทริก st = ซับเทโลเซนทริก

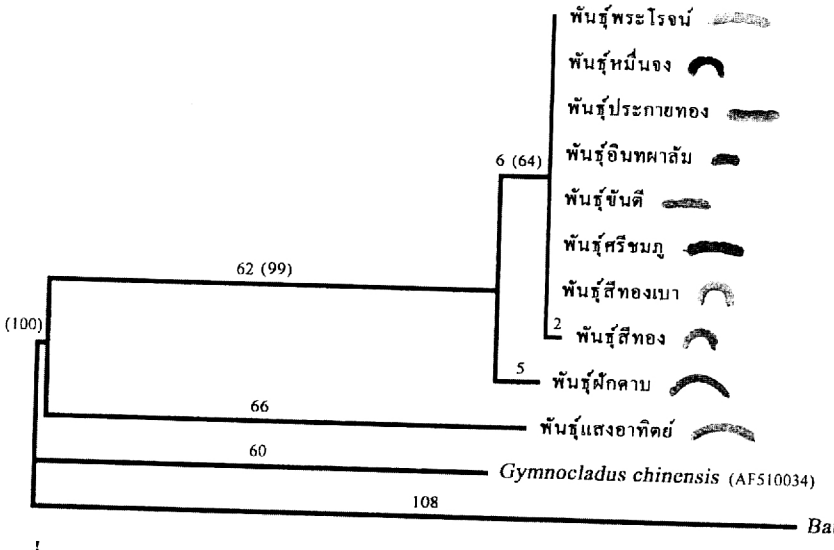
การศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล

การศึกษาลำดับเบสบริเวณ ITS ของมะขามหวานทั้ง 10 พันธุ์ พบว่ามีความยาวตั้งแต่ 726-727 คู่เบส เมื่อนำมาเทียบเคียงลำดับเบสพร้อมกับ outgroup species พบว่ามีความยาวเท่ากับ 747 คู่เบส บริเวณ ITS ของมะขามหวานทั้ง 10 พันธุ์นี้มี GC content 57.36-57.91% และมีระยะห่างทางพันธุกรรม 0-1.376% (ตารางที่ 3) จากข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรม ถ้าเปรียบเทียบระหว่างสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม (ingroup) คือ เฉพาะมะขามหวาน 10 พันธุ์ที่ศึกษา พบว่ามะขามหวาน 7 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พระโรจน์ พันธุ์หมื่นจง พันธุ์ประกายทอง พันธุ์อินทผาลัม พันธุ์ขันตี พันธุ์ศรีชมภู และพันธุ์สีทองเบาไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรม พันธุ์สีทอง และพันธุ์ฝักดาบมีระยะห่างทางพันธุกรรมจากมะขามหวานทั้ง 7 พันธุ์ที่กล่าวมาเท่ากัน คือ 0.138% พันธุ์แสงอาทิตย์มีระยะห่างทางพันธุกรรมจากมะขามหวานทั้ง 7 พันธุ์สูงถึง 1.238% และห่างจากพันธุ์สีทองสูงสุดถึง 1.376%

ตารางที่ 3 Pairwise distance แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของมะขามหวาน 10 พันธุ์ และ outgroup species

พืชที่ศึกษา	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 พันธุ์พระโรจน์	-											
2 พันธุ์หมื่นจง	0.00000	-										
3 พันธุ์ประกายทอง	0.00000	0.00000	-									
4 พันธุ์อินทผาลัม	0.00000	0.00000	0.00000	-								
5 พันธุ์ขันตี	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-							
6 พันธุ์ศรีชมภู	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-						
7 พันธุ์สีทองเบา	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-					
8 พันธุ์สีทอง	0.00138	0.00138	0.00138	0.00138	0.00138	0.00138	0.00138	-				
9 พันธุ์ฝักดาบ	0.00138	0.00138	0.00138	0.00138	0.00138	0.00138	0.00138	0.00275	-			
10 พันธุ์แสงอาทิตย์	0.01238	0.01238	0.01238	0.01238	0.01238	0.01238	0.01238	0.01376	0.01100	-		
11 *G. chinensis*	0.23547	0.23547	0.23547	0.23547	0.23547	0.23547	0.23547	0.23554	0.23550	0.23089	-	
12 *B. corymbosa*	0.34163	0.34163	0.34163	0.34163	0.34163	0.34163	0.34163	0.34142	0.34163	0.33691	0.31260	-

ผลของ phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี parsimony ของบริเวณ ITS (รูปที่ 5) พบว่า มะขามหวาน 8 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พระโรจน์ พันธุ์หมื่นจง พันธุ์ประกายทอง พันธุ์อินทผาลัม พันธุ์ขันตี พันธุ์ศรีชมภู พันธุ์สีทองเบา และพันธุ์สีทองจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (bootstrap value (BS) = 64%) โดยมีพันธุ์ฝักดาบจัดเป็น sister group ของมะขามหวานทั้ง 8 พันธุ์ที่กล่าวมา (BS = 99%) ส่วนพันธุ์แสงอาทิตย์มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับมะขามหวานที่ศึกษาทั้งหมดน้อยที่สุด



รูปที่ 5 Phylogenetic tree (treelength 309 steps) ของมะขามหวาน 10 พันธุ์ และ outgroup species *(Gymnocladus chinensis* และ *Bauhinia corymbosa)* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS โดยวิธี parsimony (branch-and-bound search) ตัวเลขที่อยู่ด้านบนของกิ่ง (branch) แสดงความยาวกิ่ง (branch length) และตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บแสดง bootstrap value (%) จาก 1,000 ซ้ำ

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การวิจัยนี้นับเป็นรายงานเกี่ยวกับการศึกษาคาริโอไทป์และชีววิทยาระดับโมเลกุลของมะขามหวานในประเทศไทยเป็นครั้งแรก โดยผลจากการศึกษาคาริโอไทป์พบว่ามะขามหวานทั้ง 10 พันธุ์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ 2n = 24 หรือมีโครโมโซมพื้นฐาน x = 12 มะขามหวานพันธุ์ศรีชมภู พันธุ์ประกายทอง พันธุ์สีทองเบา และพันธุ์อินทผาลัม มีคาริโอไทป์เหมือนกัน คือ 5m + 6sm + 1st คู่ มีจำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 46 และพบแซทเทลไลท์ที่ปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริก ซึ่งผลที่ได้นี้ไม่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มมะขามหวานประเภทฝักตรงและฝักโค้งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่วนมะขามหวานพันธุ์ขันตี พันธุ์ฝักดาบ พันธุ์พระโรจน์ พันธุ์หมื่นจง และพันธุ์สีทอง มีคาริโอไทป์เหมือนกันคือ 5m + 5sm + 2st คู่ มีจำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 44 แต่พบแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่งโครโมโซมต่างกัน โดยมะขามหวานประเภทฝักตรง 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ขันตี พันธุ์ฝักดาบ และพันธุ์พระโรจน์ และมะขามหวานประเภทฝักโค้ง 1 พันธุ์ คือ พันธุ์สีทอง พบแซทเทลไลท์ที่โครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริกคู่ที่ 1 แต่พันธุ์หมื่นจงซึ่งจัดเป็นมะขามหวานประเภทฝักโค้งพบแซทเทลไลท์ที่โครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริกคู่ที่ 2 ดังนั้นจึงไม่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มมะขามหวานตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่นกัน ส่วนมะขามหวานพันธุ์แสงอาทิตย์มีคาริโอไทป์ 11m + 1sm คู่ มีจำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 48 และพบแซทเทลไลท์ที่โครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 ซึ่งแตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ และหากพิจารณาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นมะขามหวานที่มีฝักขนาดใหญ่และมีความยาวมากจึงแตกต่างจากมะขามหวานพันธุ์อื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้การศึกษาคาริโอไทป์ของมะขามหวานทั้ง 10 พันธุ์ พบลักษณะที่สำคัญ คือ แซทเทลไลท์ ซึ่งมักใช้เป็นเครื่องหมายในการจับคู่โครโมโซมด้วย

ผลของการศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุลแสดงว่ามะขามหวานที่ศึกษามีความใกล้ชิดกันมาก และได้ยืนยันการจำแนกมะขามหวานพันธุ์แสงอาทิตย์ออกจากพันธุ์อื่นอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคาริโอไทป์ เป็นที่น่าสังเกตว่ามะขามหวานพันธุ์สีทองและพันธุ์สีทองเบาถึงแม้จะมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกันมาก แต่มีคาริโอไทป์ที่แตกต่างกัน และมีระยะห่างทางพันธุกรรมที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับมะขามหวานพันธุ์อื่นๆ หลายพันธุ์ ดังนั้นหากพิจารณาถึงการแบ่งประเภทมะขามหวานออกเป็นฝักตรงและฝักโค้ง ตลอดจนการระบุพันธุ์มะขามหวานที่พบในปัจจุบัน ย่อมแสดงให้เห็นว่าการที่มะขามหวานจะมีฝักประเภทใดนั้น มิได้บ่งบอกว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันและชื่อพันธุ์ที่ระบุนั้นไม่เกี่ยวข้องกับความใกล้ชิดหรือแตกต่างทางพันธุกรรมของมะขามหวาน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนหนึ่งจากทุนอุดหนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีพ.ศ. 2550 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

1. Polhill, R. M. and Raven, P. H. 1981. Advances in Legume Systematics Part 1. U.K. Publications Department, Royal Botanic Gardens, Kew. p. 135-136.
2. กรมทรัพย์สินทางปัญญา. 2548. ประกาศโฆษณาการรับขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์. ได้จาก http://www.ipthailand.org/upload/Geography. 26 มกราคม 2549.
3. พิจิตร โชคพัฒนา. 2546. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. นนทบุรี. เกษตรสาส์น.
4. กรมส่งเสริมการเกษตร. 2548. เอกสารเผยแพร่ อันดับที่ 34 เรื่อง "การปลูกมะขาม" ได้จาก http://www.doae.go.th/library/html/detail/tamarind. 10 ธันวาคม 2548.
5. ชัยฤกษ์ มณีพงษ์. 2525. เซลล์พันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
6. ชินวัฒน์ ยัพวัฒนพันธ์. 2541. การจำแนกพันธุ์ลิ้นจี่โดยสัณฐานวิทยา อิเล็กโทรโฟรีซิส และเซลล์พันธุศาสตร์. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (พืชสวน). เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
7. ปนัดดา กาญจนะ. 2541. การจำแนกพันธุ์ลำไยโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสและเซลล์พันธุศาสตร์. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (พืชสวน). เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
8. อัจฉริยา รังษิรุจิ ฐปวิตรา ผ่องแผ้ว และธวัช ดอนสกุล. 2549. คาริโอไทป์ของพืชสกุลระกำ *(Salacca)* บางชนิดในประเทศไทย และประเทศอินโดนีเซีย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว* 22(2): 48-61.
9. Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: An Example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1(2): 3-16.

10. Schnabel, A., McDonel, P. E. and Wendel, J. F. 2003. Phylogenetic Relationships in *Gleditsia* (Leguminosae) Based on ITS Sequences. *American Journal of Botany* 90(2): 310-320.
11. Ellison, N. W., Liston, A., Steiner, J. J., Williams, W. M. and Taylor, N. L. 2006. Molecular Phylogenetics of the Clover Genus (*Trifolium*-Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39(3): 688-705.
12. Yonemori, K., Honsho, C., Kanzaki, S., Eiadthong, W. and Sugira, A. 2002. Phylogenetic Relationships of *Mangifera* Species Revealed by ITS Sequences of Nuclear Ribosomal DNA and a Possibility of Their Hybrid Origin. *Plant Systematics and Evolution* 231: 59-75.
13. Rangsiruji, A., Pongpawe, T. and Donsakul, T. 2006. Molecular Phylogenetic Relationships of Some *Salacca* in Thailand, Malaysia and Indonesia. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 32. 10-12 ตุลาคม 2549 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์. กรุงเทพฯ. หน้า 98.
14. กองบรรณาธิการกลุ่มบัณฑิตเกษตรก้าวหน้า. 2539. ไม้ผลไทยมะขามหวาน. นครปฐม. โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา.
15. กนก ชวนานนท์. 2534. คู่มือมะขามหวาน. กรุงเทพฯ. มิตรสยาม.
16. ชวนพิศ แดงสวัสดิ์ จินตนา สนามชัย และศันสนีย์ อุตม์อ่าง. 2541. รายงานการวิจัยเรื่องการศึกษาปริมาณสารอาหารบางชนิดในมะขามหวานพันธุ์สีทองและศรีชมภู. เพชรบูรณ์. สำนักวิจัยและบริการการศึกษาสถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์.
17. ธวัช ดอนสกุล. 2548. คาริโอไทป์และบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกไนเซอร์ของเซลล์ตับในกบนา อึ่งยาง และคางคกที่พบในประเทศไทย. รายงานการวิจัยงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปี 2546. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
18. Levan, A., Fredga, K. and Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosome. *Hereditas* 52: 201-220.
19. Arai, R. 1982. A Chromosome Study on Two Cyprinid Fishes *Acrossocheilus labiatus* and *Pseudorasbora pumila pumila* with Note on Eurasian Cyprinid and Their Karyotypes. *Bulletin of the National Science Museum,* Tokyo, Ser. A. 8(3): 131-182.
20. Ullerich, F. H. 1966. Karyotype und DNS-Gehalt von *Bufo bufo, B. viridis, B. bufo* × *B. viridis* und *B. calamita* (Amphibia, Anura). *Chromosoma* (Berl.) 18: 316-342.
21. Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
22. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfanol, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (Editors): PCR Protocols. San Diego. Academic Press. p. 315-322.

23. Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1998. Multiple Sequence Alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences0* 23: 403-405.

24. Swofford, D. L. 2003. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Beta Version 4.0b 10. Sunderland, Massachusettes. Sinauer Associates.

ได้รับบทความวันที่ 16 เมษายน 2551
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 30 เมษายน 2551