การจัดจำแนกกลุ่มหอมโดยการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่กลีบชั้นในของหัวหอมด้วยโฟลไซโตมิทรี

The Classification of *Allium cepa* L. by Flow Cytometric Estimation of DNA Content in the Innermost Bulb

ภูมิพัฒน์ ทองอยู่[1,2/] บังอร ไชยทา[3/] ธนัญญา ทองสนิท[1,2/] ปุณยวีร์ เดชครอง[4/] จุลภาค คุ้นวงศ์[1,2,3/]

Pumipat Tongyoo[1,2/] Bangon Chaiyata[3/] Thananya Thongsanit[1,2/] Punyavee Dechkrong[4/] Julapark Chungwongse[1,2,3/]

Received 21 Dec. 2022/Revised 27 Mar. 2023/Accepted 03 Apr. 2023

ABSTRACT

The genus *Allium* contains more than 920 species. Some species of *Allium* cannot be identified morphologically. The aim of this project is to assay the DNA content of nuclei of onion, shallot, Indian onion, and potato onion by flow cytometer. The first experiment involved the assay of DNA content of each layer of the onions' scales. Results showed that the ploidy level was different in each layer of the scales. While most of the innermost scales were diploid, the outer layers contained more of the polyploid nuclei; the farther from the center of the scales, the lesser the diploid nuclei were found. Therefore, in the second experiment, DNA content from the innermost scales of each *Allium* was investigated. The results clearly differentiated the *Allium* samples into two groups. The first group included onion and potato onion from Myittha with an average DNA content between 33.53-33.7 pg.2C^{-1}. While the second group included potato onions from Monywa and from Myingyan, shallot (Kanchanaburi), shallot (Lamphun), and Indian onion with an average DNA content between 31.54-32.40 pg.2C^{-1}.

Keywords: flow cytometry, nuclear DNA, shallot, onion

[1/] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน 73140

[1/] Center for Agricultural Biotechnology, Agricultural Biotechnology building, Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus Nakhon Pathom, 73140

[2/] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900

[2/] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI), Bangkok 10900

[3/] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน วิทยาเขตกำแพงแสน 73140

[3/] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140.

[4/] ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยและบริการวิชาการ คณะเกษตร กำแพงแสน วิทยาเขตกำแพงแสน 73140

[4/] Central Laboratory and Greenhouse Complex, Research and Academic Service Center, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140,

*** Corresponding author: pumipat.tong@ku.th**

บทคัดย่อ

หอมเป็นพืชในสกุล *Allium* ที่มีอยู่มากกว่า 920 ชนิด และหอมบางชนิดไม่สามารถระบุชนิดได้โดยลักษณะภายนอก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอภายในนิวเคลียสจากเซลล์ของหอมใหญ่ หอมแดง หอมอินเดีย และหอมแขกที่นำเข้ามาจากประเทศพม่า ในการทดลองแรกเป็นการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละชั้นกลีบของหอมชนิดต่าง ๆ พบว่า ภายในแต่ละชั้นกลีบของหัวหอมมีปริมาณดีเอ็นเอไม่เท่ากัน โดยกลีบหัวชั้นในสุดมีดีเอ็นเอที่เป็นดิพลอยด์ (diploid) มากที่สุด และในชั้นถัดออกไปจะมีดีเอ็นเอที่เป็นโพลีพลอยด์ (polyploid) เพิ่มมากขึ้น พร้อมกับมีดีเอ็นเอที่เป็นดิพลอยด์ลดลง จึงเลือกตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้กลีบหัวชั้นในสุดของหอมแต่ละตัวอย่างในการทดลองที่สอง พบว่า หอมแต่ละชนิดมีปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถแบ่งหอมออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งประกอบด้วยหอมใหญ่ และหอมแขกจากเมืองมยิต้า (Myittha) ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 33.53-33.7 pg.2C^{-1} และกลุ่มที่สองประกอบด้วยหอมแขกจากเมืองโมนยวา (Monywa) หอมแขกจากเมืองมยินจาน (Myingyan) หอมแดงกาญจนบุรี หอมแดงลำพูน และหอมอินเดีย มีปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 31.54-32.40 pg.2C^{-1}

คำสำคัญ : โฟลไซโตมิทรี นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ หอมแดง หอมใหญ่

บทนำ

หอมเป็นพืชในสกุล *Allium* จัดอยู่ในวงศ์ Amaryllidaceae อันดับ Asparagales พืชสกุลนี้มีมากกว่า 920 ชนิด (Seregin *et al.* 2015) เช่น หอม กระเทียม กุยช่าย ในประเทศไทยนิยมบริโภคหัวหอมหลายชนิด ได้แก่ หอมใหญ่ (onion) หอมแดง (shallot) และหอมแขก (potato onion) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน คือ *Allium cepa L.* มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันที่ 2n = 16 (ธวัช และสมเกียรติ, 2553) และมีบางลักษณะที่คล้ายคลึงกัน เช่น หอมแขกมีลักษณะที่เป็นหัวเดี่ยวเหมือนหอมใหญ่ แต่จะมีขนาดหัว และสีเปลือกที่ใกล้เคียงกับทั้งหอมแดง หอมมีสารสำคัญ ได้แก่ dietary flavonols, quercetin และ quercetin glucosides ประมาณ 200-1,000 มก./กก. สารเหล่านี้จะออกฤทธิ์ในการจำกัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา และเป็นสารจำพวก antico-agulant ป้องกันหลอดเลือดอุดตัน (นิพนธ์, ม.ป.ป.)

หอมที่บริโภคในประเทศไทยส่วนหนึ่งมาจากการผลิตเองภายในประเทศ และอีกส่วนหนึ่งนำเข้าจากต่างประเทศ ในปี พ.ศ. 2565 มีปริมาณการนำเข้าหอมหัวใหญ่ 47,100 ตัน และหอมแดง 15,634 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2566) โดยคิดภาษีการนำเข้าหอมหัวใหญ่ (พิกัดอัตราศุลกากรประเภทที่ 0703.10 0703.10 และ 0712.20) 142% ของราคาซื้อ/ขาย และหอมแดง (พิกัด 0703.10.21 และ 0703.10.29) 60% ของราคาซื้อ/ขาย (กรมการค้าต่างประเทศ, 2564) ในการนำเข้าหอมทั้งหมด รวมทั้งหอมแขกด้วย ซึ่งส่วนใหญ่ถูกเก็บภาษีในพิกัดเดียวกับหอมใหญ่มากกว่าหอมแดง เนื่องจาก หอมแขกยังไม่มีพิกัดภาษีที่ชัดเจน เพราะไม่สามารถแยกชนิดทางสัณฐานวิทยาได้ว่าเป็นชนิดเดียวกับหอมใหญ่หรือหอมแดง การศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอของหัวหอมจะสามารถใช้เป็นแนวทางในการจัดจำแนกชนิดของหอมได้

การจำแนกชนิดพืชสามารถทำได้หลากหลายวิธี เช่น จำแนกทางสรีรวิทยา จำแนกทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR (ศิริยา และปรีดา, 2559) การจำแนกด้วยเทคนิค RAPD

(ศิริลักษณ์ และคณะ, 2547) และ DNA barcoding (สโรชา และคณะ, 2556) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ด้วยขนาดของจีโนมที่ใหญ่มากของพืชตระกูลหอม ทำให้การจำแนกชนิดและสายพันธุ์หอมด้วยลำดับดีเอ็นเอยังไม่แม่นยำเหมือนพืชชนิดอื่น ทั้งนี้ ปริมาณ DNA ที่อยู่ในนิวเคลียสมีความจำเพาะต่อชนิดและสายพันธุ์พืช จึงมีความสามารถที่จะนำมาใช้ในการแยกชนิดและสายพันธุ์พืชได้ เทคนิคโฟลไซโตมิเตอร์ (flow cytometry) เป็นวิธีการที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และยังสามารถวิเคราะห์ระดับโพลีพลอยด์ การแยกชนิดของเซลล์โดยวิเคราะห์จากเซลล์หรือนิวเคลียส และสามารถศึกษาระดับชุดโครโมโซมได้ (Rabinowitch and Brewster, 1990) การทำงานของเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ จะบังคับให้เซลล์หรือนิวเคลียสไหลใน flow chamber ทีละเซลล์ และไหลผ่านลำแสงเลเซอร์หรือ UV เมื่อกระทบกับเซลล์ที่ย้อมด้วยสีเรืองแสง (fluorescence dye) จะเกิดการหักเหของแสง 2 ทิศทาง และเกิดการปลดปล่อยพลังงานแสงที่สามารถตรวจจับได้ แล้วแปลงจากสัญญาณแสงให้กลายเป็นสัญญาณไฟฟ้า ส่งข้อมูลไปยังคอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผล ข้อมูลที่ได้สามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอได้ (Doležel, *et al.* 2007) สารเคมีที่ใช้ย้อมนิวเคลียส ได้แก่ 4'-6-diamidine -2-phenyl indole (DAPI) มีคุณสมบัติเป็นสารเคมีเรืองแสง เข้าจับเจาะจงกับตำแหน่งคู่เบส Adenine (A) และ Thymine (T) สารย้อม mithramycin (MI) เข้าจับเจาะจงกับตำแหน่งคู่เบส Cytosine (C) และ Guanine (G) สำหรับสารย้อม ethidium bromide, propidium iodide (PI), chromomycin, fluorescein (FITC) และ R-Phycoerythrin จับได้กับทุกตำแหน่งคู่เบส สารย้อมแต่ละชนิดให้ผลที่แตกต่างกัน โดยปริมาณดีเอ็นเอของ *A. cepa* ที่ใช้ DAPI เป็นสารย้อม มีปริมาณดีเอ็นเอ 33.7 pg.2C^{-1} และ 34.8 pg.2C^{-1} mithramycin มีปริมาณดีเอ็นเอ 32.4 pg.2C^{-1} (Doležel *et al.*, 2007) propidium iodide (PI) มีปริมาณดีเอ็นเอ 32.97 pg.2C^{-1} (Johnston *et al.*,1999) ซึ่งการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่มีรายงานไว้แล้วนั้น สามารถใช้เป็นค่ามาตรฐานในการเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลหอมเพื่อจัดจำแนกชนิดของหอมได้เช่นเดียวกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสกุล *Allium* โดยการใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ เช่น Ricroch *et al.* (2005) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ *A. cepa* พบว่า มีปริมาณดีเอ็นเอ 32.4 pg.2C^{-1} และ Doležel *et al.* (1992) รายงานว่ามีปริมาณดีเอ็นเอ 34.8 pg.2C^{-1} Barow and Meister (2002) รายงานว่า endopolyploidy ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชแตกต่างกัน เช่น *A. ursinum* พบใน upper stem มากที่สุด รองลงมาคือ lower and upper leaf stalk, stamen และ petal ตามลำดับ Sulistyaningsih and Tashiro (2003) ศึกษา ploidy ใน *A. cepa* L. aggregatum group โดยใช้ส่วนของใบ พบว่า มี ploidy ที่เป็น diploid มากที่สุด รองลงมาคือ haploid, triploid และ tetraploid ตามลำดับ จึงมีความเหมาะสมที่จะนำเครื่องมือนี้มาใช้ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกชนิดของหอมใหญ่ หอมแดง และหอมแขก ด้วยปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ในการตรวจวัด เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกชนิดของหอมแขกในพิกัดที่ไม่ชัดเจน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างหอมที่ใช้ในการทดสอบ

ตัวอย่างหอมที่ใช้ตรวจสอบมี 7 ชนิด ได้แก่ หอมใหญ่ หอมแดงลำพูน หอมแดงกาญจนบุรี หอมแขกอินเดีย และหอมแขกที่นำเข้า

จากประเทศพม่า 3 แหล่งที่มา คือ หอมแขกมยิต้า (Myittha, พิกัด 21°25’41.0”N 96°08’08.8”E) หอมแขกโมนยวา (Monywa, พิกัด 21°30’21.2”N 95°28’59.3”E) หอมแขกมยินจาน (Myingyan, พิกัด 21°30’21.2»N 95°28’59.3»E) ซึ่งได้ตัวอย่างจาก บริษัทพันไมล์ อินเตอร์เทรด ผู้นำเข้าหอม วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

2. การเตรียมตัวอย่างหอมสำหรับสกัดนิวเคลียส

นำตัวอย่างหอมแต่ละชนิดมาทำการผ่าแนวตั้งและแยกชั้นกลีบหอมเป็น 1-5 ชั้น (Figure 1) ใช้ชิ้นหอมที่มีขนาดประมาณ 1 -2 ซม. มาตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยา ของบริษัท Quantum Analysis โดยเติม isolation buffer (Quantum strain NA UV 2 (A)) 1,000 ไมโครลิตร ที่มีคุณสมบัติเป็นสารที่แยกนิวเคลียสออกจากเซลล์ ใส่ในจานทดลองพลาสติกขนาด 5 ซม. แล้วสับชิ้นส่วนที่ตัดมากจากกลีบหอมให้ละเอียด จากนั้นดูดสารละลายผ่านตัวกรอง (CellTrics®) ของบริษัท PARTEC GmbH ขนาด 30 ไมโครเมตร ใส่หลอดทดลอง แล้วเติมน้ำยา staining buffer (Quantum strain NA UV 2 (B)) 1,000 ไมโครลิตร ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารย้อมนิวเคลียสชนิด DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ทิ้งไว้ 5 นาที ได้สารละลายที่พร้อมนำไปวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอทันทีด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ Quantum P (Quantum Analysis) และอ่านค่าปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม CyPAD® ด้วยขั้นตอนมาตรฐาน

3. การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละชั้นกลีบของหัวหอม

ทดลองเพื่อตรวจหากลีบชั้นหอมที่มีความเหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยเลือกหอม 4 ชนิด ได้แก่ หอมใหญ่ หอมแดง หอมแขกอินเดีย และหอมแขกพม่า จาก 3 แหล่งที่มา มาสกัดนิวเคลียสจากกลีบหอมชั้นในสุดและกลีบหอมถัดออกไปอีก 4 ชั้น ตามวิธีการในข้อ 2. จากนั้น วัดปริมาณดีเอ็นเอแต่ละชั้นกลีบด้วย

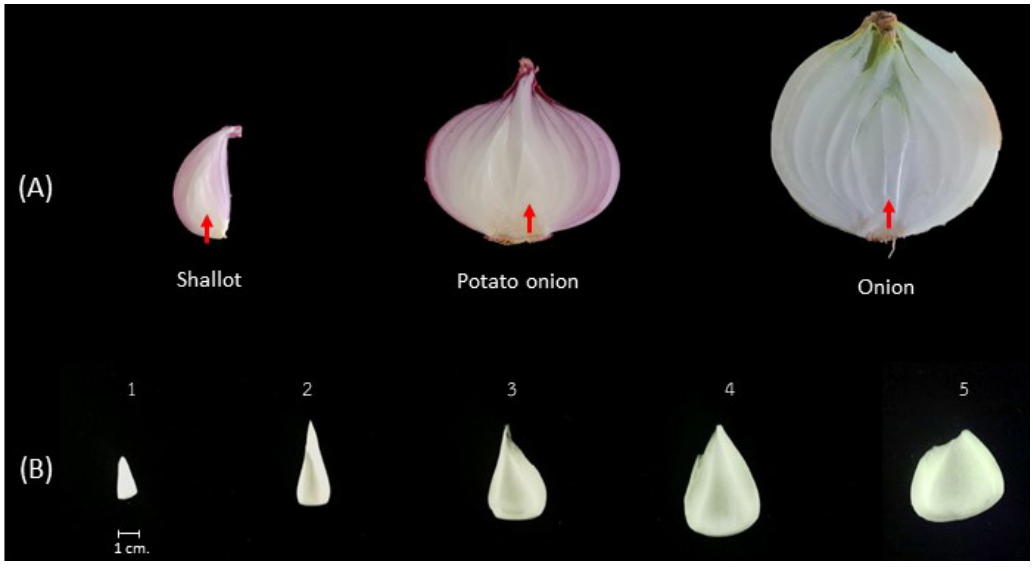

Figure 1 (A) Longitudinal section of *Allium* for extracting DNA from each layer, the red arrow indicates the innermost layer. (B) Layers of onion scales. 1= the innermost scale, 2–5 = outer scales

เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ Quantum P โดยตั้งค่าการนับจำนวนนิวเคลียสสูงสุดที่ 10,000 นิวเคลียส (Cousin *et al*, 2009; David, 2009) อ่านค่าปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม CyPAD®

4. การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอในหัวหอมแต่ละชนิด

เมื่อได้ชั้นกลีบของหัวหอมที่มีความเหมาะสมในการเป็นตัวแทนวัดปริมาณดีเอ็นเอแล้ว จึงทำการศึกษาความหลากหลายของปริมาณดีเอ็นเอในหัวหอมทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ หอมใหญ่ หอมแดงลำพูน หอมแดงกาญจนบุรี หอมแขกอินเดีย หอมแขกมยิต้า หอมแขกโมนยวา และหอมแขกมยินจาน โดยสกัดนิวเคลียสแต่ละตัวอย่างจากกลีบหอมชั้นในสุด แล้วนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ Quantum P โดยตั้งค่าการนับจำนวนนิวเคลียสสูงสุดที่ 10,000 นิวเคลียส อ่านค่าปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม CyPAD®

5. การคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ

นำผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ มาอ่านค่าปริมาณดีเอ็นเอสูงสุดของตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ ด้วยโปรแกรม CyPAD® ที่ตำแหน่ง 200 (peak 2C) ของช่องแสงฟลูออเรสเซนต์ FL-1 channel เป็นตำแหน่งของปริมาณดีเอ็นเอของชุดโครโมโซม 2 ชุด (Cousin, 2009) ที่แสดงปริมาณนิวเคลียสสูงสุดในรูปแบบกราฟ (peak) จากนั้น ทำการเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างด้วยการเปรียบเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐาน ของ *A. cepa* ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอ 33.7 pg.2C^{-1} (Barow and Meister, 2002) ดังสูตรการคำนวณ (1) มีหน่วยเป็น pg.2C^{-1} นำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple-range test (DMRT)

สูตรการคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ

$$\text{2C DNA content} = \frac{(\text{sample peak mean}) \times (\textit{A. cepa} \text{ peak mean})}{\textit{A. cepa} \text{ peak mean}} \qquad (1)$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละชั้นกลีบของหัวหอม

การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละชั้นของกลีบหอมนั้น พบว่า กลีบชั้นในสุด มีดีเอ็นเอที่เป็น diploid มากที่สุด แปรผันกับปริมาณดีเอ็นเอที่เป็น polyploid น้อยที่สุด มีค่าความแปรปรวนต่ำ ฐานของกราฟที่แคบ สอดคล้องกับกระบวนการ endoreduplication ที่เกิดขึ้น (Figure 2) ซึ่งสามารถอ่านค่าดีเอ็นเอ diploid (2N) tetraploid (4N) และ octaploid (8N) ที่ค่า 200 400 และ 800 บนแกน X ของกราฟ ส่งผลให้การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอสามารถอ่านค่าได้อย่างแม่นยำ หอมเป็นพืชที่เกิดกระบวนการ endoreduplication ผลงานวิจัยของ Traas *et al.* (1998) และ D'Amato (1950) พบว่า เกิดกระบวนการ endoreduplication ในรากหอม และในกลีบหอมชั้นนอก ส่งผลต่อปริมาณนิวเคลียสดีเอ็นเอที่ทำการตรวจวัด นอกจากนี้ Kende and Zeevaart (1997) รายงานถึงผลกระทบของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่มีผลต่อกระบวนการ endoreduplication โดย Singh *et al.* (1983) พบว่า Gibberellin (GA) และ Naphthyl Acitic Acid (NAA) ช่วยให้หัวหอมมีผลผลิต และคุณภาพสูง เป็นผลมาจากการส่งเสริมกระบวนการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในชั้นกลีบซึ่งส่งผลต่อการผลิตสารสำคัญในการเจริญเติบโตของหอม รวมถึงรายงานของ Dewitte and Murray (2003) และ

Menges *et al.* (2006) ที่พบว่า cytokinin และ auxin มีผลต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้ ช่วงวันยังมีผลต่อการลงหัว โดยที่การลงหัวหรือการสะสมอาหาร จะต้องการช่วงแสงวันยาว การเจริญด้านต้นใบต้องการช่วงแสงสั้น การตอบสนองต่อช่วงแสงจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของหอมด้วย (Heath, 1945) ดังนั้น ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลหอมจำเป็นต้องทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่กลีบชั้นใน ผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละชั้นกลีบของหัวหอมจากการทดลองนี้สามารถแสดงถึงลักษณะ endoreduplication ของหอมทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ หอมหัวใหญ่ของแขก หอมแดง และหอมอินเดีย แต่ผลจากการวัดกลีบชั้นนอกสุดของหอมอินเดีย พบว่า มีความแปรปรวนของปริมาณดีเอ็นเอที่สูงมาก ทำให้ไม่สามารถอ่านค่าปริมาณดีเอ็นเอได้ (Figure 2) ผลการทดลองขั้นตอนนี้สรุปได้ว่า กลีบชั้นในสุด มีความเหมาะสมต่อการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของหอม เนื่องจาก มีฐาน peak แคบ ทำให้การตรวจวัดมีความแม่นยำสูง และมีปริมาณนิวเคลียสมากที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jones *et al.* (1998).

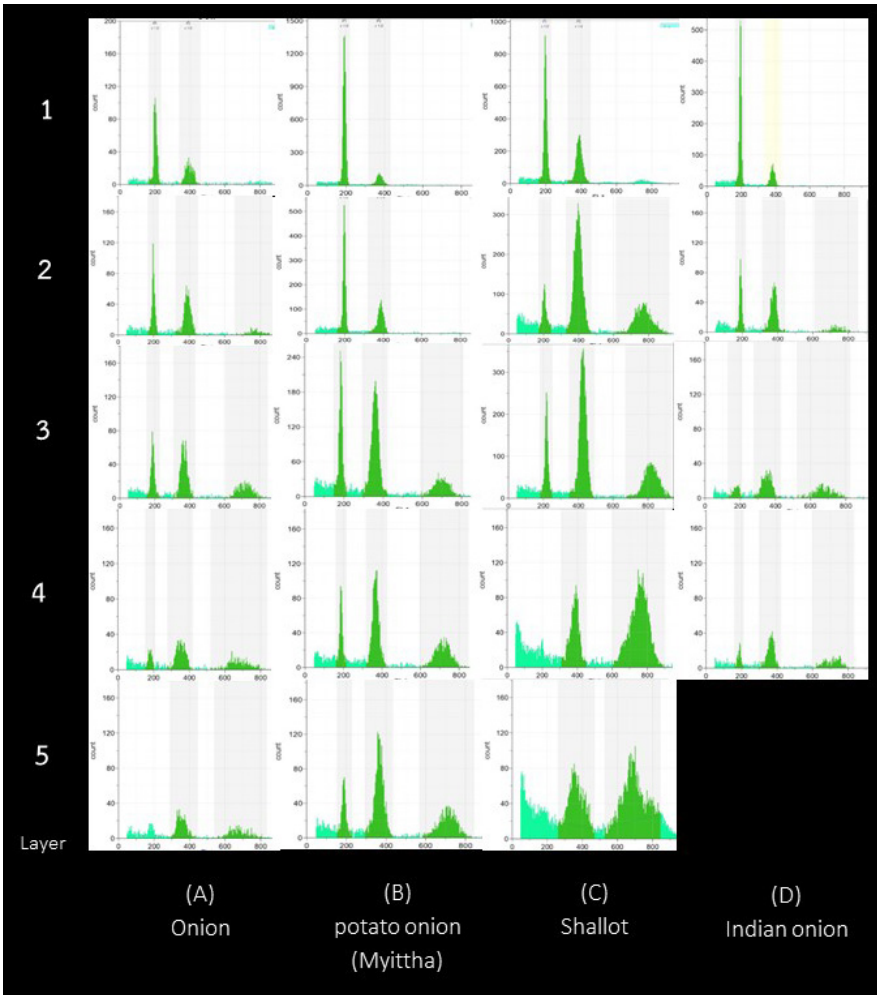

Figure 2 DNA content and endopolyploidy in scale layers of *Allium*. The X-axis represents relative nuclear DNA content at channel number (ploidy level) Peak at 200 = 2C, 400 = 4C, 600 = 6C, 800 = 8C, and the Y-axis represents the number of nuclei of onion (A), potato onion (Myittha) (B), shallot (C), Indian onion (D). 1 = the innermost scale, 2–5 = outer scales of the onion bulbs

2. ปริมาณดีเอ็นเอในในหัวหอมแต่ละชนิด

การทดลองนี้ใช้ค่า peak mean ของหอมใหญ่เป็นตัวควบคุมในการเปรียบเทียบ จากการทดลองพบว่า หอมทั้ง 7 ชนิด มีปริมาณดีเอ็นเอ อยู่ระหว่าง 31.74–33.7 pg.2C^{-1} โดยค่าปริมาณดีเอ็นเอของหอมแต่ละชนิดที่ทำการวัดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1) และสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยหอมใหญ่ มีปริมาณดีเอ็นเอ 33.7 pg.2C^{-1} และหอมแขกมยิต้า (Myittha) มีปริมาณดีเอ็นเอ 33.53 pg.2C^{-1} กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย หอมแขกโมนยวา (Monywa) หอมแขกมยินจาน (Myingyan) หอมแดงกาญจนบุรี หอมแดงลำพูน และหอมแขกอินเดีย (Figure 3) มีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 31.74-32.41 pg.2C^{-1} ปริมาณดีเอ็นเอของหอมใหญ่ในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Ricroch *et al.* (2005) ที่พบว่า *A. cepa* มีปริมาณดีเอ็นเอ 32.4 pg.2C^{-1} ถึงแม้ว่าเทคนิควิธีการ และสารย้อมจะส่งผลต่อปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจวัด อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า หากมีการใช้ตัวอย่างชนิดหรือสายพันธุ์มาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบอ้างอิงการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอมีความสามารถในการจำแนกได้ในระดับสายพันธุ์ของพืชชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Table 1 DNA content in *Allium cepa* based on flow cytometry

Allium cepa	**DNA content (2C)** (pg.2C^{-1})	**200 peak range**
Onion	33.7 a [1/]	198.9 – 206.6
Potato onion Myittha	33.53 a	198.9 – 205.4
Shallot Lamphun	32.41 b	188.8 – 203.0
Potato onion Myingyan	32.30 b	191.7 – 195.8
Indian onion	32.09 b	189.6 - 195.9
Potato onion Monywa	31.89 b	189.7 – 194.9
Shallot Kanchanaburi	31.74 b	189.1 – 192.3
CV (%)	2.82	

[1/] Mean in the same column followed by a common letters are significantly different at the 5% level by DMRT

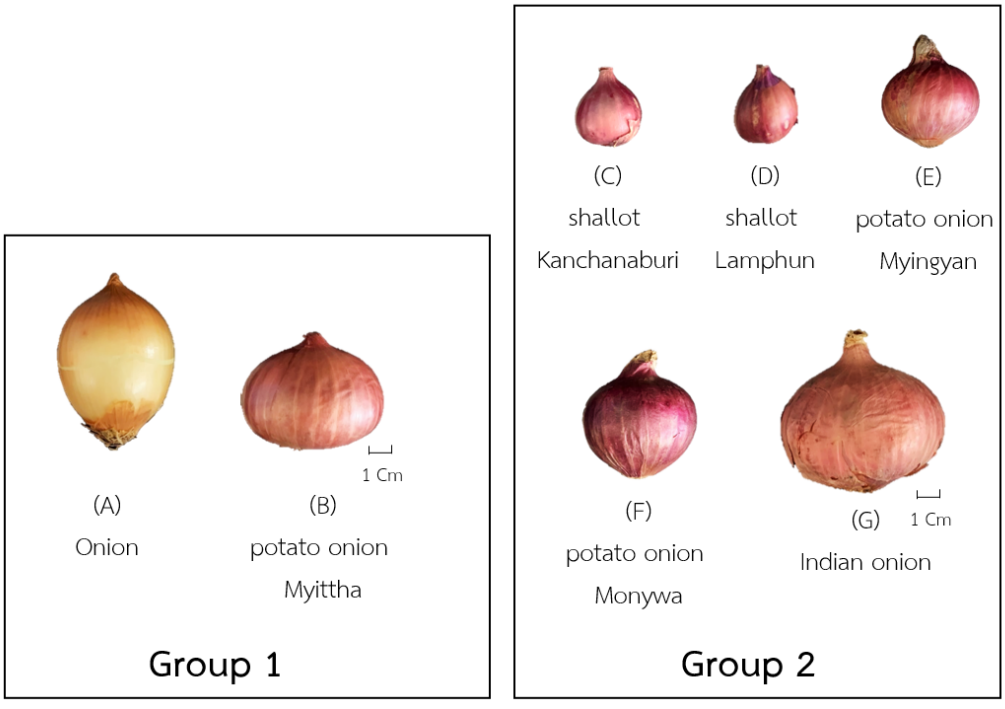

Figure 3 The grouping of *Allium cepa.* based on DNA content using a flow cytometer

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนของปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลหอม แม้จะมีแหล่งที่มาจากประเทศพม่าเหมือนกัน แต่พบว่าหัวหอมที่ระบุเป็นหอมแขกนั้นมีความแปรปรวนทางสายพันธุ์และจัดอยู่คนละกลุ่ม (Figure 3) ซึ่งจะช่วยแก้ปัญหาการจัดกลุ่มชนิดหอมแขกพม่าที่ไม่สามารถทำได้ด้วยวิธีสัณฐานของหัวจากการผ่าขวาง เนื่องจากหัวหอมที่มาจากเมืองที่ต่างกันแสดงลักษณะทั้งมีหัวเกาะกลุ่มเหมือนหอมแดงและหัวเดี่ยวเหมือนกับหอมหัวใหญ่ นอกจากนี้การจัดจำแนกชนิดหัวหอมด้วยปริมาณดีเอ็นเอในกลีบชั้นในสุด ยังมีความสอดคล้องกับ ศิริยา และปรีดา (2559) ที่ทำการศึกษาความหลากหลายของพันธุ์หอมแดงในเขตภาคเหนือของประเทศไทยด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR พบว่า สามารถแบ่งหอมได้ 8 กลุ่ม และจัดหอมแขกอยู่ในกลุ่มพันธุ์หอมแดง เช่นกัน

ดังนั้น การจำแนกพันธุ์ของหัวหอมนอกจากพิจารณาจากลักษณะสัณฐานของหัวหอมแหล่งเพาะปลูกแล้ว การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่กลีบชั้นในสุดด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์สามารถช่วยระบุกลุ่มของหอมใหญ่และหอมแดงได้อย่างชัดเจน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการคิดภาษีนำเข้าของพืชชนิดนี้ให้ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

สรุปผลการทดลอง

กลีบชั้นในสุดของหัวหอมเหมาะสมต่อการนำมาใช้ตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ เนื่องจาก มีปริมาณนิวเคลียสที่เป็น 2N มากที่สุด ให้ค่า CV ไม่เกิน 8 % ของความแปรปรวนปริมาณดีเอ็นเอในการตรวจสอบ เพื่อเป็นการควบคุมปริมาณดีเอ็นเอในหอมที่พบความแปรปรวนที่สูง การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่กลีบชั้นในสุดในหอมทั้ง 7 ชนิด ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ สามารถแยกหอมได้ 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ หอมใหญ่ และหอมแขกมยิต้า (Myittha) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ หอมแขกโมนยวา (Monywa) หอมแขกมยินจาน (Myingyan) หอมแดงกาญจนบุรี หอมแดงลำพูน และหอมแขก

อินเดีย ดังนั้น ในการระบุประเภทของหอมจากพม่าควรระบุแหล่งที่มาของหอมให้ชัดเจนและทำการตรวจที่เอ็นเอที่กลีบชั้นในสุดเพื่อความแม่นยำในการจัดจำแนกกลุ่มของหอม

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกลุ่มผู้ประกอบการนำเข้าหอม ดร.ณัษฐพงษ์ อัครวริทธิ์ และคุณจีรวัฒน์ เสียงดัง บริษัทพันไมล์ อินเตอร์เทรด ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างหอมจาก 3 แหล่งปลูกจากประเทศพม่าเพื่อใช้ในการดำเนินงานวิจัย รวมถึงนิสิตและเจ้าหน้าที่วิจัยทุกท่านที่มีส่วนสนับสนุนให้การศึกษานี้สามารถตอบโจทย์วิจัยได้สำเร็จดังจุดประสงค์

เอกสารอ้างอิง

กรมการค้าต่างประเทศ. 2564. การนำเข้าสินค้าเกษตรตามพันธกรณีความตกลงระหว่างประเทศ. กองบริหารสินค้าข้อตกลง และมาตรการการค้า กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์. แหล่งข้อมูล: https://dl.parliament.go.th/handle/20.500.13072/599295. สืบค้น: 9 กุมภาพันธ์ 2566.

ธวัช ดอนสกุล และสมเกียรติ พรพิสุทธมาศ. 2553. คาริโอไทปของพืชสกุลหอมกระเทียม 6 ชนิดในประเทศไทย. *ว.มหาวิทยาลัยนเรศวร.* 18(1) : 34–39.

นิพนธ์ ไชยมงคล. ม.ป.ป. หอมหัวใหญ่. แหล่งข้อมูล: https://vegetweb.com/wp-content/download/Onions.pdf สืบค้น: 9 กุมภาพันธ์ 2566.

ศิริยา มากมี และปรีดา นาเทเวทน์. 2559. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์หอมแดงในเขตภาคเหนือของประเทศไทยด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR. หน้า 31-38 *ใน*: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 54: สาขาพืช, วันที่ 2-5 ก.พ. 2559 . กรุงเทพฯ

ศิริลักษณ์ อินทะวงศ์ วีณัน บัณฑิตย์ และณัฐา ควรประเสริฐ. 2547. การจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี. *ว.เกษตร.* 20 (2): 152-158.

สโรชา อังคปัทมากุล อรุณรัตน์ ฉวีราช ธวัดชัย ธานี และรุ่งลาวัลย์ สุดมูล. 2556. การวิเคราะห์ระดับโมเลกุลและเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุล Allamanda. หน้า 544-554. *ใน*: โครงการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 13 มหาวิทยาลัยขอนแก่น. วันที่ 17 กุมพาพันธ์ 2555.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2566. 4 พืชหัว กระเทียม-หอมแดง-หอมหัวใหญ่-มันฝรั่ง ปีนี้ให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นทุกชนิด ขณะนี้ออกตลาดแล้วจนถึงเมษายนนี้. แหล่งข้อมูล: https://www.oae.go.th/view/1/รายละเอียดข่าว/ข่าว%20สศก.ฝ40689/TH-TH สืบค้น: 9 กุมภาพันธ์ 2566.

Barow, M. and A. Meister. 2002. Lack of correlation between AT frequency and genome size in higher plants and the effect of nonrandomness of base sequences on dye binding. *Cytometry.* 47: 1-7.

Cousin, A., K. Heel, W.A. Cowling and M. N. Nelson. 2009. An efficient high-throughput flow cytometric method for estimating DNA ploidy level in plants. *Cytometry.* 75A (12): 1015-1019.

D'Amato, F. 1950. On the occasional occurrence of highly polyploid roots in an onion bulb. *Caryologia* 2 : 160-164.

David, W. G. 2009. Simultaneous flow cytometric quantification of plant nuclear DNA contents over the full range of described angiosperm 2C values. *Cytometry*. 75A (8): 692-698.

Dewitte, W. and J.A.H. Murray. 2003. The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology.* 54: 235–264.

Doležel, J., J. Greilhuber and J. Suda. 2007. Flow cytometry with plant cell. Wiley¯VCH, Germany. 479 p.

Doležel, J., S. Sgorbati and S. Lucretti. 1992.

Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum.* 85: 625–631.

Heath, O.V.S. 1945. Formative effects of environmental factors as exemplified in the development of the onion plant. *Nature*. 155: 623-631.

Johnston, J., D. Bennett, A. Rayburn, W. Galbrith and H. Jame. 1999. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*. 86(5): 609–613.

Jones, W.E., A.R. Kuehnle and K. Arumuganathan. 1998. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on Dendrobium. *Annals of Botany*. 82: 189–194.

Kende, H. and J.A.D Zeevaart. 1997. The five classical plant hormones. *The Plant Cell.* 9: 1197–1210.

Menges, M., A.K. Samland., S. Planchais and J. A.H Murray. 2006. The D-type cyclin CYCD3; 1 is limiting for the G1-to S-phase transition in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 18: 893–906.

Rabinowitch, H.D. and J.L. Brewster. 1990. Onions and Allied Crops. Volume I Botany, Physiology, and Genetics. CRC press, Inc., Florida. 273 p.

Ricroch, A., R. Yockteng., S. Brown. and S. Nadot. 2005. Evolution of genome size across some cultivated *Allium* species. *Genome*. 48: 511–520.

Seregin A.P., G. AnaČkov and N. Friesen. 2015. Molecular and morphological revision of the *Allium* saxatile group (Amaryllidaceae): geographical isolation as the driving force of underestimated speciation, *Botanical Journal of the Linnean Society*. 178 (1): 67–101.

Singh, A.R., S.L. Pankaj and G.N. Singh. 1983. Effect of growth regulators on growth, yield and quality of onion. *The Punjab horticultural journal*. 23 (1 and 2): 100–103.

Sulistyaningsih, E. and Y. Tashiro. 2003. Determination of ploidy levels of shallot and Japanese bunching onion by flow cytometry. *Ilmu Pertanian* 10(1): 9–15.

Traas, J., M. Hulskamp., E. Gendreau and H. Hofte. 1998. Endoreduplication and development. *Plant Biology*. 1: 498–503