

การจำแนกชนิด พันธุ์ สายต้นของทุเรียน (*Durio spp.*) ด้วยเทคนิค DNA
Amplification Fingerprinting (DAF)

Identification of Durian (*Durio spp.*) Cultivars, Clones by DNA Amplification
Fingerprinting (DAF)

ทรงพล สมศรี^{1/} สุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล^{2/} วนิดา งามเงิน^{2/} อีรวุฒิ วงศ์วัฒน์^{2/}
Songpol Somsri^{1/} Suchirat Sakuanrungsirikul^{2/} Wanida Ngam-Ngern^{2/} Therawut Wongvarat^{2/}

ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR) - based DNA amplification fingerprinting (DAF) approach was used to investigate genetic relationships among 9 species of genus *Durio*, 56 cultivars of common durian (*D. zibethinus* Murr.). Pairwise similarity matrix were developed using band-sharing data generated by the selected 12 primers out of 180 primers such as Operon A-04, A-06, A-09, A-19, A-20, B-01, B-03, B-16, C-06, G-20, S-01 and S-02. These experiments were conducted at Chanthaburi Horticultural Research Center and Horticulture Research Institute between October 1999 - September 2005. In the first experiment with 8 species and 18 cultivars, there are 187 polymorphic loci from 217 loci or 86.17 % for species and cultivars identification. Second experiment with 9 species and 56 cultivars, 278 polymorphisms were identified from a total of 298 produced bands or 93.29 %. The third experiment, 48 polymorphic loci from 192 loci or ~~25.00~~ % were identified for selected clones of 4 commercial cultivars. Dendrograms were constructed using the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA), could separate the genotypes of species and cultivars into 4 and 3 groups, and the genotypes of selected clones into 4 groups for these experiments, respectively.

Key words : *Durio spp.*, *D. zibethinus*, identification, DNA fingerprinting, DAF

^{1/} สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

Horticulture Research Institute, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

^{2/} ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี อ.แหลมสิงห์ จ.จันทบุรี 22110

Chanthaburi Horticultural Research Centre, Laem Sing district, Chanthaburi 22110

บทคัดย่อ

การศึกษาและตรวจสอบลักษณะประจำพันธุ์ในระดับพันธุกรรมของทุเรียน 9 ชนิด (species) 56 พันธุ์ด้วยเทคนิค DNA Amplification Fingerprinting (DAF) และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA จากการใช้ primer ที่คัดเลือกแล้วจำนวน 12 primers จาก 180 primers ได้แก่ Operon A-04 A-06 A-09 A-19 A-20 B-01 B-03 B-16 C-06 G-20 S-01 และ S-02 โดยแบ่งเป็น 3 การทดลองดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และสถาบันวิจัยพืชสวน ระหว่าง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2542 - กันยายน พ.ศ. 2547 พบว่าในการทดลองที่ 1 สามารถจำแนกทุเรียน 8 ชนิด (species) และทุเรียน 18 พันธุ์ ออกได้เป็น 4 กลุ่ม โดยพบ polymorphic loci 187 ตำแหน่งจากจำนวน loci ทั้งหมด 217 ตำแหน่ง คิดเป็น polymorphic loci 86.17% ในการทดลองที่ 2 สามารถจำแนกทุเรียน 9 ชนิด (species) และทุเรียน 56 พันธุ์ ออกได้เป็น 3 กลุ่ม โดยพบ polymorphic loci 278 ตำแหน่งจากจำนวน loci ทั้งหมด 298 ตำแหน่ง คิดเป็น polymorphic loci 93.29% และในการทดลองที่ 3 สามารถจำแนกทุเรียนสายต้นทุเรียนพันธุ์การค้า 4 พันธุ์ ได้แก่ ชะนิ ก้านยาว หมอนทอง และกระดุมทอง ที่ชนะการประกวดเชิงวิชาการ โดยพบ polymorphic loci 48 ตำแหน่งจากจำนวน loci ทั้งหมด 192 ตำแหน่ง คิดเป็น polymorphic loci 25.00%

คำหลัก : ทุเรียน การจำแนกชนิด พันธุ์ สายต้น
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ DAF

คำนำ

ทุเรียนเป็นไม้ผลที่สามารถปลูกได้ดีในเขตร้อนชื้น เป็นพืชในวงศ์ Bombacaceae ซึ่งมีมากกว่า 51 สกุล และมีจำนวนชนิดมากกว่า 200 ชนิด (Subhadrabandhu and Ketsa, 2001) โดยทุเรียนเป็นพืชในสกุล *Durio* ซึ่งมีอยู่ 27 ชนิด (species) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แถบประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย (Wilson, 1954) ปัจจุบันมีการปลูกกระจายตัวอยู่ที่ประเทศแถบเส้นศูนย์สูตรขึ้นไปทางเหนือและใต้ประมาณ 13-14 องศา ซึ่งมีอากาศร้อนชื้น ได้แก่ ประเทศในแถบเอเชีย คือ มาเลเซีย อินโดนีเซีย พม่า อินเดีย ศรีลังกาและไทย นอกจากนี้มีปลูกในประเทศแถบแอฟริกา อเมริกากลาง หมู่เกาะอินดีส์ตะวันตก และหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก โดยแพร่กระจายอยู่ในบริเวณเกาะบอร์เนียว 19 ชนิด ซาบาร์ท 14 ชนิด ซาราวัค 16 ชนิด มาเลเซีย 16 ชนิด และในสุมาตรา 7 ชนิด (Subhadrabandhu and Ketsa, 2001) ในประเทศไทย เต็ม (2523) รายงานว่ามีทุเรียน 6 ชนิด ได้แก่ *D. malaccensis* Planch. ex Mast., *D. pinangianus* Ridl., *D. griffithii* Bakh., *D. lowianus* Scott. ex King, *D. mansoni* Bakh. และ *D. zibethinus* Murr. ต่อมาทรงพล (2546) รายงานว่ามี 9 ชนิด ได้แก่ ทุเรียนดอน (*D. malaccensis*) ทุเรียนนก (*D. lowianus*) ทุเรียนข้าวติด (*D. graveolens* Becc.) ทุเรียนรากขา (*D. kutejensis* Becc.) ทุเรียนซาเรียน (*D. mansoni*) ทุเรียนขนยาว (*D. oxleyanus*) ทุเรียนนก (*D. griffithii*) ทุเรียนบ้าน (*D. zibethinus*) และทุเรียนไม่มีหนาม (*Durio* sp.) ตามรายงานของ Soengeng-Reksodihardjo (1962) พบว่ามีทุเรียนที่สามารถรับประทานได้อย่างน้อย 6 ชนิดที่มีรสชาติ

ดีเป็นที่ยอมรับ โดยทุเรียนรากขา (*D. kutejensis*) มีรสชาติดี หวาน และกลิ่นของเนื้อไม้ฉุนรุนแรง ผู้บริโภคบางคนนิยมบริโภคทุเรียน ชนิดนี้มากกว่าทุเรียนทั่วไป ส่วนทุเรียนชนิดอื่นๆ ที่ใช้บริโภคผลสดและมีคุณภาพดีเป็นที่ยอมรับ ได้แก่ ทุเรียนขนยาว (*D. oxleyanus* Griffith) ทุเรียนข้าวติด (*D. graveolens* Becc.) *D. dulcis* Becc. ทุเรียนเต่า (*D. testudinarium* Becc.) และ *D. grandiflorus* Becc. โดยทุเรียนบ้าน (*D. zibethinus*) เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากที่สุด (ทรงพล, 2546; Vangnai, 1996, Kanzaki *et al.*, 1998) และพบว่ามีมากกว่า 227 ชื่อพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย(ศิริชัยและคณะ, 2541) แต่ที่เป็นการค้าในปัจจุบันมีเพียง 4-5 พันธุ์ ได้แก่ ชะนี ก้านยาว กระดุมทอง หมอนทอง และพวงมณี เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ทุเรียนไทยเป็นที่รู้จักดีในเรื่องของรสชาติ กลิ่นและเนื้อสัมผัส ทำให้ประเทศไทยเป็นผู้นำในการส่งออกทุเรียน รองลงมา คือ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย (Nanthachai, 1994) โดยในปี พ.ศ. 2546 ประเทศไทยมีการส่งออกทุเรียนผลสดหรือแช่แข็งประมาณ 106,849 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,999.6 ล้านบาท (นิรนาม, 2547;) พื้นที่ปลูกที่สำคัญ อยู่ที่ภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศไทย จังหวัดที่มีการผลิตมากที่สุด คือ จันทบุรี 47.4% รองลงมา คือ ระยอง 12% และชุมพร 6.3% (Somsri and Khaegkad, 2002)

วิจิตร (2519) และแสง (2527) รายงานว่ามีพันธุ์ทุเรียนดั้งเดิมเพียง 5 พันธุ์เท่านั้น ที่เป็นต้นกำเนิดของทุเรียนพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย ได้แก่

1. พันธุ์ลวงเป็นต้นกำเนิดของพันธุ์ลวงเขียว ชะนี ชมพูศรี และย่ามะหวาด

2. พันธุ์การะเกดเป็นต้นกำเนิดของพันธุ์กบแม่เต่า กบพวง และกบเล็บเหยี่ยว

3. พันธุ์ทองสุกเป็นต้นกำเนิดของพันธุ์ก้านยาว ศรีสุวรรณ และก้านยาววัดลัก

4. พันธุ์ทองย้อยเป็นต้นกำเนิดของพันธุ์ทองย้อยฉัตร นมสวรรค์ สีนสมุทร ฉัตรสีนาค ฉัตรเงิน ฉัตรสีทอง และธรรณีไหว

5. พันธุ์กำปับเป็นต้นกำเนิดของพันธุ์กำปับเหลือง ชายมะไฟ และกำปับสีนาค

ในอดีตและปัจจุบันการจำแนกพันธุ์พืชสามารถจำแนกได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะต้น ใบ ดอก ผลและเมล็ด แต่การจำแนกในสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันอาจเกิดความสับสนและผิดพลาด หากปลูกในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน หรือต่างจากถิ่นเดิม ซึ่ง Boonyakome (1955) ได้จำแนกพันธุ์ทุเรียนเป็น 6 กลุ่ม จาก 83 พันธุ์ ได้แก่ กลุ่มกบ 25 พันธุ์ กลุ่มทองย้อย 17 พันธุ์ กลุ่มก้านยาว 7 พันธุ์ กลุ่มกำปับ 11 พันธุ์ กลุ่มลวง 10 พันธุ์ และกลุ่มเบ็ดเตล็ด 13 พันธุ์ ต่อมาศิริชัยและคณะ (2531, 2541) ศึกษารวบรวมพันธุ์ทุเรียนโดยพบว่าลักษณะใบ รูปทรงผล และหนามผลเป็นลักษณะจำเพาะสำหรับพันธุ์ของทุเรียนที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ จำแนกเป็น 6 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มกบ มี 38 พันธุ์ ได้แก่ กบแม่เต่า กบเล็บเหยี่ยว กบตาขำ กบพิกกุล กบวัดกล้วย กบชายน้ำ กบสงวน้อย กบสุวรรณ กบเจ้าคุณ กบตาห้วม กบตาปูน กบหน้าศาล กบจำปา กบเบา กบรัศมี กบตาไห กบตาแจ่ม กบทองคำ กบสีนาค กบทองก้อน กบไว กบงู กบตาเต่า กบชมพู กบพลเทพ กบพวง กบวัดเพลง กบก้านเหลือง กบตานวล กบตามาก กบทองเพ็ง กบราชเนตร

กบแก้ว กบตานุช กบตามิตร กลีบสมุทร กบตา
แมน และการะเกด

2. กลุ่มลวง มี 7 พันธุ์ ได้แก่ ลวงทอง
ลวงมะรุม ชะนี ชะนีกิ่งม้วน ชมพูศรี ย่ำมะหวาด
และสายหยุด

3. กลุ่มก้านยาว มี 7 พันธุ์ ได้แก่ ก้านยาว
ก้านยาววัดลัก ก้านยาวสีนาค ก้านยาวพวง
ก้านยาวใบต่าง ทองสุก และชมพูบาน

4. กลุ่มกำป็น มี 11 พันธุ์ ได้แก่ กำป็น
เดิมกำป็นเหลือง กำป็นแดง กำป็นตาแพ กำป็นพวง
ชายมะไฟ ปิ่นทอง เม็ดในกำป็น เหารา หมอนเดิม
และหมอนทอง

5. กลุ่มทองย้อย มี 10 พันธุ์ ได้แก่
ทองย้อยเดิม ทองย้อยฉัตร ฉัตรสีทอง พวงฉัตร
นมสวรรค์ ทับทิม ธรณีโหว นกหยิบ แดงรัศมี
และอีอึ้ง

6. กลุ่มเบ็ดเตล็ด ได้แก่ พันธุ์ทุเรียนที่
ไม่ได้จัดอยู่ใน 5 กลุ่มข้างต้น เช่น กะเทยเนื้อขาว
กะเทยเนื้อแดง กระเกยเนื้อเหลือง กระดุมทอง
กระดุมสีนาค กระโปรงทอง กระปุกทอง ก้อนทอง
เขี้ยวดำลิ่ง ขุนทอง จอกลอย ชายม้งคุด แดงช่าง
เขียน แดงตาน้อย แดงตาเพื่อน แดงสาวน้อย
ดาวกระจาย ตะพานน้ำ ตะโก ตุ่มทอง ทศพิณ
ทองคำตาพรวด ทองม้วน ทองคำ นกกระจิบ
บาตรทองคำ บางขุนนนท์ เบ็ดถบ ฝอยทอง
พวงมัลลย์ พวงมณี เม็ดในยายปราง ยินดี ลำเจียก
เม็ดในบางขุนนนท์ สีทอง สีไพร สาวชมเห็ด
สาวชมฟักทอง หางสิงห์ เหริยอุทอง ไอ้เซ่
อินทรชิต อีล่า อีลิบ อียักษ์ อีหนัก และอื่นๆ

ต่อมามีการนำเทคนิค molecular markers
มาช่วยเสริมในการจำแนกและตรวจสอบพันธุ์พืช
ทั้งพืชใหม่และพืชท้องถิ่น ซึ่งข้อมูลลายพิมพ์ DNA

อาจใช้เป็นหลักฐานอย่างหนึ่งในการพิจารณา
จดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ เพื่อแสดงความเป็น
กรรมสิทธิ์ในพันธุ์พืชใหม่ตามพระราชบัญญัติ
คุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542 รวมทั้งพันธุ์ลูกผสม
พันธุ์ใหม่ด้วย เพื่อแสดงแตกต่างจากพันธุ์เดิม
หรืออาจใช้จำแนกพันธุ์พืชป่า พันธุ์พืชพื้นเมือง
พันธุ์พืชท้องถิ่นที่เป็นพันธุ์ดั้งเดิมของท้องถิ่น
เพื่อประโยชน์ต่อชุมชนในกรณีที่มีผู้นำไปใช้
ประโยชน์ทางการค้า ซึ่งต้องแบ่งปันผลประโยชน์
ให้แก่ชุมชน

เทคนิค DNA fingerprint เป็นเทคนิค ที่
ขยายเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ และใช้ตรวจสอบ
ลักษณะประจำพันธุ์ของพืช ซึ่งมีหลายเทคนิค
ที่ได้รับความสนใจ และนำมาใช้แพร่หลายในการ
จำแนกพันธุ์พืช ได้แก่ เทคนิค RFLP RAPD DAF
และ AFLP เป็นต้น โดย DNA Amplification
Fingerprinting (DAF) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ไพรเมอร์
oligodeoxynucleoside ที่สั้นมากเพียง 7-8
นิวคลีโอไทด์ ในการหาความสัมพันธ์ของ DNA
profile ไพรเมอร์ที่ทำการคัดเลือกจะขยายเพิ่ม
ปริมาณแถบ DNA ซึ่งแถบ DNA มีลักษณะเป็น
polymorphic คือ มีมากกว่าหนึ่งรูปแบบ แสดง
ให้เห็นถึงความแตกต่างรูปแบบของยีน ซึ่ง
สามารถศึกษาถึงลักษณะการถ่ายทอดทาง
พันธุกรรม หรือใช้ในการจำแนกเฉพาะตัว
ได้จากข้อมูลลายพิมพ์ DNA โดยเฉพาะจากเทคนิค
DAF สามารถนำไปใช้จำแนกความแตกต่างของ
สิ่งมีชีวิต ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ไม่ว่าใน
แบคทีเรีย เชื้อรา พืชและมนุษย์ (Scott et al.,1996)
เทคนิค DAF ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการศึกษา
ลักษณะประจำพันธุ์ และลักษณะทางพันธุกรรม
(Williams et al.,1990; Caetano-Anolles,1994)

ในการตรวจสอบลักษณะประจำพันธุ์ และเป็นแกนหลักในการจำแนกความหลากหลายของพันธุ์พืชหลายสกุล (Caetano-Anolles, 1994) เช่น การจำแนกชนิดของพิทูเนีย (pitunia) ที่เป็นดอกสีม่วง 3 ชนิด ดอกสีขาว 2 ชนิด ซึ่งเทคนิค RFLP ไม่สามารถจำแนกได้สำเร็จ การจำแนกชนิดของมันเทศและผักนึ่ง (Connolly *et al.*, 1994; Jarret and Austin, 1994; He *et al.*, 1995) การจำแนกพันธุ์เบญจมาศที่มีลักษณะใกล้เคียงกันได้ (Scott *et al.*, 1996) และยังสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์และเพศในมะละกอได้ (Stile *et al.*, 1993; Sondur *et al.*, 1996; Somsri *et al.*, 1998) นอกจากนี้อาจใช้ในการจำแนกลักษณะสีเนื้อ ลักษณะเมล็ดดิบ-เมล็ดเต็ม หรือลักษณะถ่ายทอดทางพันธุกรรมต่างๆ ได้ เช่น การต้านทานโรคและแมลง เป็นต้น ดังนั้น จึงได้มีการนำเทคนิค DNA amplification

fingerprinting (DAF) มาใช้ในการจำแนกความสัมพันธ์ของชนิดทุเรียนต่างๆ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ทุเรียน หรือการคุ้มครองพันธุ์ทุเรียนไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ใบทุเรียน

ใบทุเรียนชนิดต่างๆ พันธุ์ต่างๆ และสายพันธุ์ทุเรียนลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ปลูกรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และสถานีทดลองยางทุ่งพล จ.จันทบุรี โดยแบ่งเป็น 3 การทดลอง คือ

1.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาจำแนกทุเรียน 8 ชนิด และ 18 พันธุ์พ่อพันธุ์แม่ที่ใช้ในการผสมพันธุ์ระหว่างปี พ.ศ. 2529-2535 (Table 1)

1.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาจำแนกทุเรียน 9 ชนิดและ 56 พันธุ์ (Table 2)

Table 1. List of 8 *Durio* species and 18 cultivars at Chanthaburi Horticultural Research Centre were used for DAF analysis in first experiment.

Scientific name	Cultivar name
<i>Durio zibethinus</i>	Monthong (MT), Chomphusri (CS), Kradum Thong (KT), Kathoei, Phuang Mani (PM), Kob Phikun (KP), Kob Nasan (KBS), Kob Suwan (KBW), Kob Takhum (KBK), Kob Maethao (KBM), Nokyip (NY-1), E-lip (EL), E-nak (EN), Foithong (FH), Thongyoichat (TC), Kanyao (KY), Yammawat (YUM), Chani (CN)
<i>D. malaccensis</i>	Don (DON)
<i>D. graveolens</i>	Kuatid (KD)
<i>D. kutejensis</i>	Rakkha (RK)
<i>D. masoni</i>	Charian (CR)
<i>D. sp.</i>	Rainam (RN)
<i>D. griffithii</i>	Nok-1 (N1)
<i>D. lowianus</i>	Nok-2 (N2)

Table 2. List of 9 *Durio* species and 56 cultivars at Chanthaburi Horticultural Research Centre were used for DAF analysis in ^{second} experiment.

Scientific name	Cultivar name
<i>Durio zibethinus</i>	Taphapnam (TAP), Daeng Saonoe (DSN), Longlab-lae (LSL), Chai Mangkhut (CMK), Kob Langvihan (KBH), Kob Nasan (KBS), Kob Suwan (KBW), Kob Takhum (KBK), Kob Ratsami (KBR), Kob Maethao (KBM), Kob Si-nak (KBN), Kob Chaokhum (KBJ), Kob Thongkam (KBT), Kob Mangkon (KBG), Kob Watklual (KBV), Kob Tathuam (KBA), Nokyip (NY-1), E-tui (ET), Eaimen (OM), Eaimai (ON), E-lip (EL), E-nak (EN), Tonyai (TY), Saoyai (SY), Nuealueng (NLG), Chat Sithong (CHT), Thongmuan (TM), Foithong (FH), Fakthong (PH), Khunthong (KH), Luangthong (LH), Sithong (SH), Pinthong (IN), Thongpheng (TP), Thongdaeng (TD), Thongyoichat (TC), Tongnoppakun (TK), Tongyoidoem (TI), Krapuk Thong (KRH), Kathoei Nueakhao (KNK), Kathoei Nueadaeng (KND), Kanyao Si-nak (KBN), Taptim (TUP), Kanyao Watsak (KYS), Kanyao (KY), Chok-loi (JL), Yammawat (YUM), Tosamsao (TOS), Thoraniwai (TNV), Chai Mafai (CMF), Daokrachai (DAW), Yindi (YIN), Ruang Thong (RH), Kampan Dam (KUD), Mangkon (MK), Chani (CN)
<i>D. malaccensis</i>	Don (DON)
<i>D. graveolens</i>	Kuatid (KD)
<i>D. kutejensis</i>	Rakkha (RK)
<i>D. mansonii</i>	Charian (CR)
<i>D. sp.</i>	Rainam (RN)
<i>D. oxleyanus</i>	Khonyao (OXL)
<i>D. griffithii</i>	Nok-1 (N1)
<i>D. lowianus</i>	Nok-2 (N2)

1.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาจำแนกสายต้นทุเรียนการค้า 4 พันธุ์ที่ชนะการประกวดเชิงวิชาการระหว่างปี พ.ศ. 2530-2532 (Table 3)

2. การสกัด DNA

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA คือ cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) ตามวิธีการของ Graham และคณะ (1994) และ

นำมาประยุกต์ใช้โดย Somsri และคณะ (1998) และ Somsri (1999) โดยเลือกใบยอดทุเรียนจำนวน 10 ใบ น้ำหนักประมาณ 0.2 กรัม มาทำให้แห้งทันที โดยเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว นำใบทุเรียนที่ได้มา บดด้วยโกร่งแล้วใส่ในหลอดทดลอง เติม CTAB buffer (2% (W/V) CTAB 1.4 M NaCl 100 mM Tris, 20 mM EDTA pH5.5) 10 มล. แล้วบ่มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55 °C นาน 20 นาที

Table 3. List of selected clones of 4 commercial cultivars at Chanthaburi Horticultural Research Centre were used for experiment by DAF analysis.

Scientific name	Cultivar name
<i>Durio zibethinus</i>	Chani (CN 01, CN 03, CN 05, CN 08 และ CN 09) Monthong (MT 01, MT 03, MT 04, MT 06 และ MT 08) Kanyao (KY 01, KY 02, KY 04, KY 05 และ KY 06) KradumThong (KT 01, KT 02, KT 04, KT 05 และ KT 06)

จากนั้นนำตัวอย่างไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำใสใส่ในหลอดใหม่โดยเติม 1/2 volumn ของ Chloroform:iso-amyl alcohol (24:1) แล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็นน้ำใสไปใส่ในหลอด Falcon 50 ml tuber แล้วเติม 1/10 volumn ของ 3 M sodium acetate (pH 5.2) และ 2 volumns ของ cold absolute ethanol นำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้าง DNA ที่ได้ด้วย 70% cold ethanol 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งนำ DNA ที่ได้เข้าเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีการสูญเสีย DNA เก็บ DNA ให้แห้งด้วย

อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นเติม 400 μ l TE buffer (pH8.0) ซึ่งมี 10 μ l/ml RNase A (Sigma) แล้วนำไปเก็บที่ +4 °C จนพร้อมจะนำไปใช้ทำการตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพและความเข้มข้นของ Genomic DNA โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer จากนั้นนำไปใช้ในการศึกษาจำแนกชนิดพันธุ์ หรือลักษณะถ่ายทอดทางพันธุกรรมต่างๆ ตามขั้นตอนต่อไป

3. การคัดเลือกไพรเมอร์

ทำการคัดเลือกไพรเมอร์จากไพรเมอร์สำเร็จรูปของบริษัท Operon จำนวนทั้งหมด 8 ชุดประกอบด้วย ชุด A B C D E F G และ S โดย 1 ชุด ประกอบด้วย 20 ไพรเมอร์ จากนั้น

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของพืชในสกุล *Durio* ชนิดละ 1 ตัวอย่างเพื่อเพิ่มปริมาณสำหรับการทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 8 ชุด นำผลที่ได้จากการทำ PCR มาแยกด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสตามเทคนิค DAF และคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความสามารถในการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอและเกิด polymorphism ซึ่งให้ความแตกต่างรูปแบบของแถบ DNA

4. การเพิ่มปริมาณ DNA

DAF protocol ได้รับการพัฒนาโดย Bentley และ Bassam (1996) และมีการนำมาประยุกต์ใช้โดย Somsri และคณะ (1998) และ Somsri (1999) โดยทำการคัดเลือก primer 10 mer

(Operon technologies) ใช้แทน primer 8 mer และใช้วงจรอุณหภูมิ (temperature cycles) แบบ "touch down" ที่ระดับอุณหภูมิสูงกว่า Template DNA (25 ng) ถูก amplified ใน 20 μ l reaction ซึ่งประกอบด้วย 2.5 mM random 10 mer primers, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) 10 mM KCl 5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs และ 3 units Ampli Taq Stoffel fragment (Perkin Elmer) ส่วนผสม reaction ถูกบรรจุและแสดงปฏิกิริยาใน 200 μ l Thin-walled PCR tubes ในเครื่อง Perkin Elmer 9600 thermal cycler

Thermocycling protocol ประกอบด้วย



5. การแยกแถบ DNA

DNA amplification products (2 μ l) กับ 1 μ l loading buffer 40% (w/v) urea 3% Ficoll 400, 10 mM Tris (pH 7.5), 3 mM EDTA, 0.02% (w/v) xylene cyanol, 0.02% (w/v) bromophenol blue)) ถูกแยกด้วย polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) โดยใช้เครื่อง Mini-Protean II apparatus (Bio-Rad) และแถบ DNA จะปรากฏโดยใช้ silver staining (Bassam *et al.*, 1991 ; Bentley *et al.*, 1996 ; Somsri *et al.*, 1998 ; Somsri, 1999)

6. การเตรียม Gel

Polyacrylamide gels ประกอบด้วย 10% (w/v) polyacrylamine, 10% (w/v) urea, 5% (v/v) glycerol และ TBE buffer เพื่อประสิทธิภาพของการ staining ใช้ gel 0.5 mm บน Gel Bond PAGE backing film gels ที่ถูก run ใน TBE ที่ 300 V เป็นเวลา 40 นาที gels ถูก fixed ด้วย 7.5% (v/v) acetic acid เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที จากนั้นย้อมด้วย 0.01% (w/v) silver nitrate, 0.15% formaldehyde เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วย

น้ำเป็นเวลา 20 วินาที หลังจากนั้น developed ด้วย 3% disodium carbonate, 0.3% (v/v) formaldehyde, 0.02% (w/v) sodium thiosulphate เป็นเวลาประมาณ 2-4 นาที แล้วหยุด developing ด้วย 7.5% (v/v) cold acetic acid เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำอีก 5 นาที

Gels ถูกทำให้แห้งโดยปล่อยให้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิห้องและเก็บได้อย่างถาวร โดยใส่ในอัลบั้ม ส่วน size marker ใช้ 10 ng ของ pGEM DNA markers (Promega) (Somsri, 1999)

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

ความแตกต่างของ DAF band ของแต่ละลักษณะพันธุกรรม ถ้ามีความแตกต่างโดยมีแถบ band บันทึกลงเป็น (1) ถ้าไม่มีแถบ band บันทึกลงเป็น (0) นำลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค DAF มาวิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป NTSYS pc รุ่น 2.00 (Rohlf, 1997) และจัดกลุ่มทุเรียนด้วยวิธี unweighted pair grouping method using arithmetic average (UPGMA) (Sneath and Sakal, 1973) แสดงผลในรูปของ phylogenetic tree

ผลการทดลองและวิจารณ์

ศึกษาจำแนกพืชสกุลทุเรียน 9 ชนิด จากแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และสถานที่ทดลองอย่างทุ่งเพล จ.จันทบุรี คือทุเรียนดอน (*D. malaccensis*) ทุเรียนข้าวตีด (*D. graveolens*) ทุเรียนรากชา (*D. kutejensis*) ชาเรียน (*D. mansonii*) ทุเรียนไม่มีหนาม (*Durio sp.*), ทุเรียนขนยาว (*D. oxleyanus*) ทุเรียนนก

(*D. lowianus*) และทุเรียนบ้าน (*D. zibethinus*) จำนวน 56 พันธุ์ สายต้น (clone) ทุเรียนพันธุ์ การค้า 4 พันธุ์ด้วยเทคนิค DAF ซึ่งมีผลการทดลองดังนี้

1. การจำแนกชนิด และพันธุ์ทุเรียน

1.1 การทดลองที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ 10 สาย ในการ วิเคราะห์ DAF-PCR ของทุเรียน 8 ชนิด (species) และ 18 พันธุ์ (Table 1, 4) พบว่ามี แถบ DNA ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) 187 ตำแหน่งจากจำนวนทั้งหมด 217 ตำแหน่ง คิดเป็น 86.17% ความแตกต่างของขนาดแถบ DNA ที่เห็นเด่นชัดอยู่ระหว่าง 179-2645 bp โดย primer OPB 16 และ primer OPS 01 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ 28 แถบ และ primer OPA 04 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด 15 แถบ (Table 4) การใช้ primer OPA 04 พบ แถบดีเอ็นเอขนาด 485 bp สามารถใช้แยก ทุเรียนนก (*D. griffithii*) และทุเรียนชาเรียน (*D. mansonii*) ออกจากชนิดและพันธุ์ทุเรียนอื่นๆ ได้ โดยพบว่าทุเรียนทั้ง 2 ชนิดจะไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 485 bp ส่วนแถบขนาด 261 bp ไม่พบใน ทุเรียนไม่มีหนาม (*Durio sp.*) และทุเรียนดอน (*D. malaccensis*) ทำให้แยกทุเรียนทั้ง 2 ชนิดออกจากชนิดและพันธุ์อื่น (Figure 1a) แถบขนาด 396 bp ไม่พบในพันธุ์นกหยิบ แต่พบแถบขนาด 179 bp จึงสามารถแยกออกจากพันธุ์อื่นๆ แถบขนาด 460 bp ไม่พบในพันธุ์พวงมณีแต่พบแถบ ขนาด 222 bp จึงสามารถแยกออกจากพันธุ์อื่นๆ และแถบดีเอ็นเอ ขนาด 334 bp ไม่พบในทุเรียนพันธุ์ชะนี อีลิบ กระเทย กบหน้าศาล และทุเรียนรากชา (*D. kutejensis*) ทำให้แยกทุเรียนทั้ง 5 พันธุ์ ออกจากทุเรียนพันธุ์

Table 4. Synthetic deoxyribonucleotides used as primer for amplification of durian DNA in first, second and third experiment

Primers	Nucleotide sequence (5' to 3')	Second experiment		
		Band (no.)	Polymorphisms (no.)	% Polymorphism
OPA04	AAT CGG GCT G	18	17	94.44
OPA06	GGT CCC TGA C	24	21	87.50
OPA09	GGG TAA CGC C	26	24	92.30
OPA19	CAA ACG TCG G	29	28	96.55
OPA20	GTT GCG ATC C	22	18	81.82
OPB01	GTT TCG CTC C	25	23	92.00
OPB03	CAT CCC CCT G	27	26	96.26
OPB16	TTT GCC CGG A	17	16	94.12
OPC06	GAA CGG ACT C	26	25	96.15
OPC20	TCT CCC TCA G	28	26	92.86
OPS01	CTA CTG CGC T	28	28	100.00
OPS02	CCT CTG ACT G	28	26	92.86
Total		298	278	93.29

Primers	Nucleotide sequence (5' to 3')	Third experiment		
		Band (no.)	Polymorphisms (no.)	% Polymorphism
OPB11	GTA GAC CCG T	21	6	28.57
OPB12	CCT TGA CGC A	28	13	46.43
OPB16	TTT GCC CGG A	13	2	15.38
OPB18	CCA CAG CAG T	17	2	11.76
OPC11	AAA GCT GCG G	20	3	15.00
OPC14	TGC GTG CTT G	22	5	22.73
OPC16	CAC ACT CCA G	22	5	22.73
OPC18	TGA GTG GGT G	17	4	23.53
OPD03	GTC GCC GTC A	18	3	16.67
OPD011	AGC GCC ATT G	14	5	35.71
Total		192	48	25.00

Table 4 Synthetic deoxyribonucleotides used as primer for amplification of durian DNA in first, second and third experiment

Primers	Nucleotide sequence (5' to 3')	First experiment		
		Band (no.)	Polymorphisms (no.)	% Polymorphism
OPA-04	AAT CGG GCT G	15	13	86.66
OPA-06	GGT CCC TGA C	20	18	90.00
OPA-09	GGG TAA CGC C	23	19	82.61
OPA-19	CAA ACG TCG G	-	-	-
OPA-20	GTT GCG ATC C	-	-	-
OPB-01	GTT TCG CTC C	24	23	95.83
OPB-03	CAT CCC CCT G	23	18	78.26
OPB-16	TTT GCC CGG A	28	27	96.42
OPC-06	GAA CGG ACT C	17	14	82.35
OPG-20	TCT CCC TCA G	23	19	82.61
OPS-01	CTA CTG CGC T	28	25	89.29
OPS-02	CCT CTG ACT G	16	11	68.75
Total		217	187	86.17

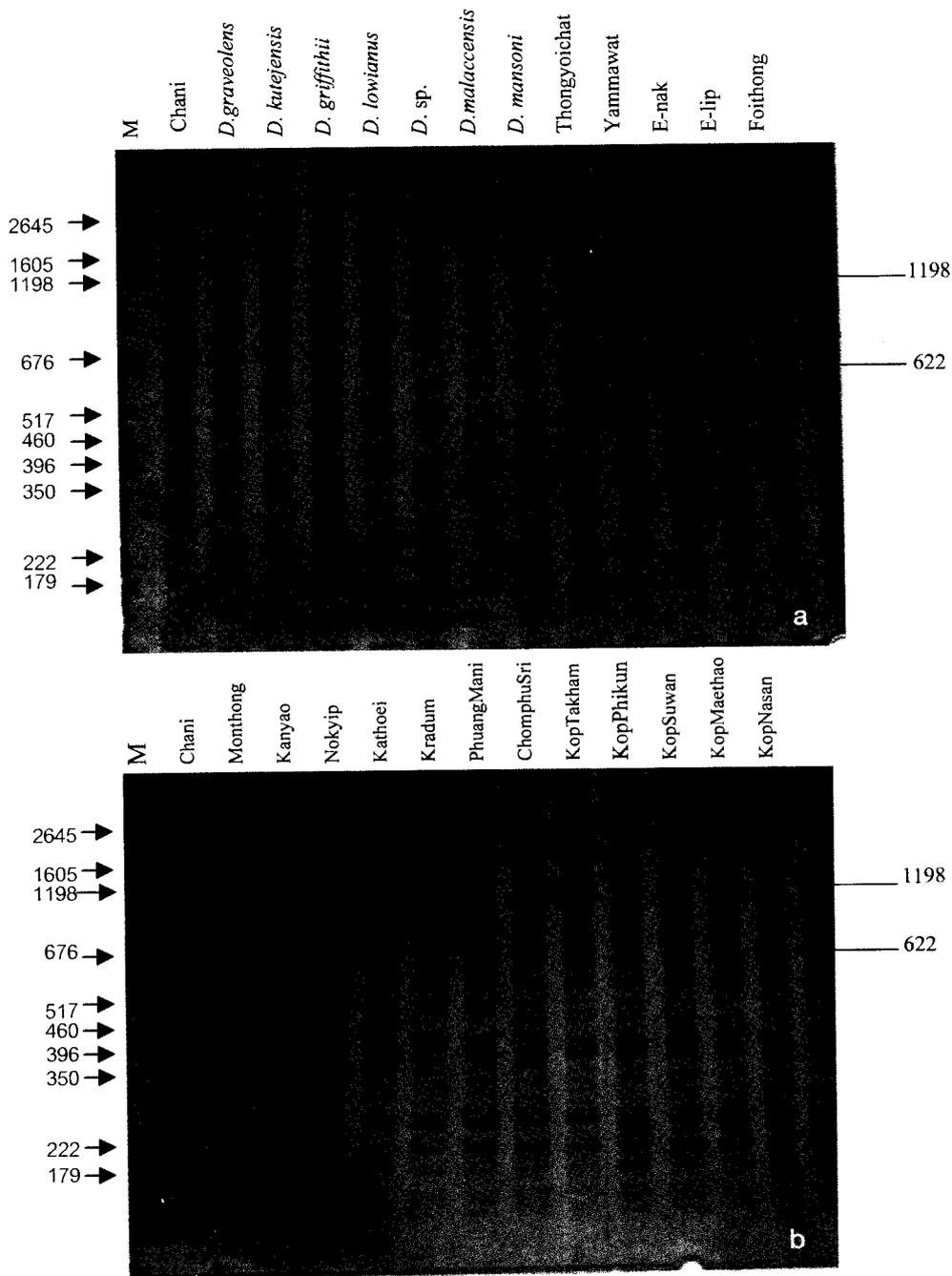


Figure 2. Polyacrylamide gel of DAF-modified durian DNA. DNA from each of the eight species, eighteen cultivars was amplified using primer OPB 16 and separated on a 10% polyacrylamide gel as described in the methods (a, b).

และชนิดอื่นๆ ได้ (Figure 1a, 1b)

การใช้ primer CPB16 พบว่าแถบดีเอ็นเอ ขนาด 622 bp และ 1198 bp สามารถแยกทุเรียนพันธุ์ต่างๆ (*D. zibethinus*) ได้แก่ พันธุ์ทองย้อยฉัตร ย่ำมะหวาด อีหนัก อีลิบ ฝอยทอง ชะนี หมอนทอง ก้านยาว นกหยิบ กระเทย กระดุม พวงมณี ชมพูศรี กบตาขำ กบพิกุล กบสุวรรณ กบแม่เต่า และกบหน้าศาล ออกจากทุเรียนชนิดอื่นๆ ได้ โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 622 bp และ 1198 bp พบได้เฉพาะ *D. zibethinus* เท่านั้น แถบขนาด 676 bp สามารถแยกทุเรียนดอน (*D. malaccensis*) และทุเรียนซาเรียน (*D. mansonii*) ออกจากทุเรียนชนิดอื่นๆ ได้ (Figure 2a)

จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DAF จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เลือกมา 217 แถบ เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc. รุ่น 2.00 และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ได้ค่าดัชนีความเหมือน (similarity matrix) โดยพบว่าทุเรียนชนิดต่างๆ 8 ชนิด มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง 55-98% ขณะที่ทุเรียนพันธุ์ต่างๆ 18 พันธุ์ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง 70-98% (Table 5) และเมื่อแสดงในรูปของ dendrogram (Figure 3a) พบว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์ (similarity coefficient) เท่ากับ 0.70 สามารถแยกกลุ่มของตัวอย่างพันธุ์ได้เป็น 4 กลุ่มได้แก่

กลุ่มที่ 1 ทุเรียนซาเรียน (*D. mansonii*) ทุเรียนดอน (*D. malaccensis*)

กลุ่มที่ 2 ชะนี กระเทย ชมพูศรี พวงมณี กบพิกุล กบตาขำ กระดุม กบแม่เต่า กบหน้าศาล ก้านยาว หมอนทอง นกหยิบ กบสุวรรณ และ ทุเรียนข้าวตอก (*D. graveolens*)

กลุ่มที่ 3 อีลิบ อีหนักทองย้อยฉัตรย่ำมะหวาด

ฝอยทอง ทุเรียนนง (*D. lowianus*) ทุเรียนไม่มีหนาม (*Durio* sp.) และทุเรียนนง (*D. griffithii*)

กลุ่มที่ 4 ทุเรียนรากชา (*D. kutejensis*)

แสดงให้เห็นว่าทุเรียนข้าวตอก (*D. graveolens*) ทุเรียนนง (*D. griffithii*) ทุเรียนไม่มีหนาม (*Durio* sp.) และ ทุเรียนนง (*D. lowianus*) เป็นทุเรียนที่มีความใกล้ชิดกับ ทุเรียนบ้าน (*D. zibethinus*) มากกว่าทุเรียนดอน (*D. malaccensis*) ทุเรียนซาเรียน (*D. mansonii*) และทุเรียนรากชา (*D. kutejensis*) ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Kanzaki และคณะ (1998) แต่มีความแตกต่างกับการจัดกลุ่มในอดีตโดย Boonyakome (1955) และการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะใบ ทรงผล และหนามโดยหิรัญและคณะ, (2541) ในบางพันธุ์ เช่น พันธุ์ชะนี และชมพูศรีอยู่คนละกลุ่มกับย่ำมะหวาด แต่ยังคงมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง 75-77%

การทดลองที่ 2

1.2 ขนาดใช้ไพรเมอร์ 12 สาย ในการวิเคราะห์ DAF-PCR ของทุเรียน 9 ชนิด และ 56 พันธุ์ (Table 2, 4) พบว่ามี polymorphism 278 ตำแหน่งจากจำนวนทั้งหมด 298 ตำแหน่ง คิดเป็น 93.29% ความแตกต่างของขนาดแถบดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัดอยู่ระหว่าง 179-2645 bp โดย primer OPA19 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด 29 แถบ และ primer OPA16 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 17 แถบ (Table 4) จากการใช้ primer OPB016 พบว่าแถบขนาด 1198 bp และ 676 bp สามารถแยกพันธุ์อื่นๆ ออกจากพันธุ์อื่น ๆ ได้ (Figure 4a) แถบขนาด 517 bp สามารถแยกพันธุ์กบตาขำออกจากพันธุ์อื่นๆ (Figure 4a) แถบขนาด 1198 bp, 676 bp และ 460 bp สามารถแยกพันธุ์ไอ้เม่นออกจากพันธุ์อื่นๆ

Table 5. Similarity matrix of genetic distances among the 8 species and 18 durian cultivars obtained using the DNA amplification Fingerprinting (DAF) data in first experiment.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1.D. <i>mansoni</i>	1.000																								
2.D. <i>malaccensis</i>	0.703	1.000																							
3.D. <i>kutejensis</i>	0.592	0.579	1.000																						
4.D. sp.	0.676	0.637	0.676	1.000																					
5.D. <i>griffithii</i>	0.672	0.641	0.672	0.871	1.000																				
6.D. <i>lowianus</i>	0.681	0.676	0.699	0.756	0.778	1.000																			
7.D. <i>gruveolens</i>	0.610	0.553	0.610	0.641	0.646	0.646	1.000																		
8. Kanyao	0.597	0.557	0.615	0.672	0.685	0.641	0.907	1.000																	
9. Monthong	0.610	0.561	0.619	0.676	0.681	0.663	0.911	0.924	1.000																
10. Chari	0.632	0.575	0.659	0.699	0.703	0.676	0.889	0.911	0.924	1.000															
11. Chomphu Sri	0.619	0.553	0.619	0.668	0.672	0.681	0.920	0.920	0.938	0.924	1.000														
12. Yamnawat	0.668	0.928	0.694	0.752	0.765	0.792	0.712	0.743	0.747	0.769	0.747	1.000													
13. Nokvip	0.579	0.530	0.606	0.646	0.659	0.641	0.880	0.911	0.911	0.876	0.889	0.716	1.000												
14. Thongyichat	0.694	0.628	0.694	0.796	0.800	0.792	0.756	0.787	0.792	0.805	0.783	0.911	0.752	1.000											
15. Kradium	0.646	0.623	0.707	0.694	0.725	0.716	0.761	0.712	0.743	0.792	0.752	0.747	0.730	0.747	1.000										
16. Foithong	0.985	0.610	0.668	0.743	0.747	0.765	0.712	0.734	0.730	0.761	0.747	0.867	0.716	0.867	0.712	1.000									
17. E-nak	0.694	0.610	0.659	0.778	0.765	0.756	0.738	0.769	0.747	0.778	0.747	0.884	0.716	0.893	0.703	0.876	1.000								
18. E-lip	0.650	0.601	0.676	0.778	0.756	0.747	0.721	0.761	0.747	0.778	0.747	0.884	0.716	0.911	0.721	0.884	0.938	1.000							
19. Kathoei	0.615	0.539	0.632	0.654	0.676	0.668	0.880	0.893	0.915	0.976	0.933	0.761	0.884	0.778	0.774	0.743	0.743	0.743	1.000						
20. Phuang Mani	0.601	0.544	0.619	0.659	0.654	0.672	0.920	0.911	0.911	0.898	0.946	0.730	0.898	0.765	0.761	0.721	0.730	0.730	0.898	1.000					
21. Kop Suwan	0.584	0.491	0.654	0.641	0.646	0.663	0.840	0.853	0.876	0.936	0.876	0.703	0.809	0.730	0.761	0.703	0.712	0.721	0.836	0.907	1.000				
22. Kop Phikun	0.597	0.557	0.597	0.663	0.668	0.650	0.933	0.902	0.933	0.911	0.942	0.714	0.893	0.761	0.730	0.716	0.734	0.725	0.902	0.907	0.871	1.000			
23. Kop Takham	0.606	0.557	0.615	0.663	0.668	0.659	0.933	0.929	0.942	0.929	0.942	0.725	0.884	0.769	0.738	0.725	0.743	0.734	0.902	0.924	0.964	0.964	1.000		
24. Kop Nasan	0.628	0.553	0.610	0.676	0.690	0.681	0.911	0.915	0.938	0.907	0.938	0.756	0.889	0.792	0.743	0.756	0.747	0.756	0.915	0.911	0.884	0.924	0.915	1.000	
25. Kop Maethao	0.601	0.535	0.628	0.676	0.681	0.663	0.884	0.915	0.929	0.889	0.929	0.738	0.880	0.774	0.734	0.721	0.747	0.737	0.898	0.893	0.893	0.924	0.915	0.893	1.000

(Figure 4b) แถบขนาด 1605 bp และ 517 bp สามารถแยกพันธุ์ทุเรียนดอน (*D. malaccensis*) ออกจากทุเรียนข้าวตีด (*D. graveolens*) (Figure 4c) แถบขนาด 1605 bp และ 517 bp สามารถแยกพันธุ์ทุเรียนซาเรียน (*D. mansoni*) ออกจากทุเรียนรากชา (*D. kutejensis*) ทุเรียนนก (*D. lowianus*) และทุเรียนไม่มีหนาม (Figure 4d) และแถบขนาด 676 bp สามารถแยกพันธุ์มังกรออกจากพันธุ์ลวงทองและกำปันดำ (Figure 4d)

จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DAF จำนวนแถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด 298 แถบ เมื่อนำมาวิเคราะห์และคำนวณค่าดัชนีความเหมือน พบว่า ทุเรียนพันธุ์ต่าง ๆ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง 70-98% เช่นกัน และเมื่อแสดงในรูปของ Dendrogram (Figure 3b) ที่ค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.80 พบว่า สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มได้แก่

กลุ่มที่ 1 ชายมังคุด กบหน้าศาล กบหลังวิหาร ตะพานน้ำ แดงสาวน้อย และหลงลับแล จำนวน 6 พันธุ์

กลุ่มที่ 2 ชะนี ธรณีไหว กบเจ้าคุณกบสีนาค กบแม่เต่า กบรัศมี กบตาขำ กบสุวรรณ กบตาท้วม กบทองคำ ตอสามเส้า ย่ามะหวาด ทองนพคุณ จอกลอย ปิ่นทอง กบมังกร กบวัดกล้วย นกหยิบ ชายมะไฟ ดาวกระจาย ยินดี ฟอยทอง ทองม้วน พิภพทอง กระเทยเนื้อเหลือง ฉัตรสีทอง ต้นใหญ่ อีลิบ อีหนัก สาวใหญ่ ไ้อ้ใหม่ ก้านยาว สีนาค กระเทยเนื้อแดง กระเทยเนื้อขาว กระปุก ทองสีทอง ก้านยาววัดสัก ทับทิม ก้านยาว ขุนทอง ลวงทอง ทองย้อยฉัตร ทองย้อยเดิม ทองเพ็ง ทองแดง กำปันดำ มังกร อีทุยและไอ้เม่นจำนวน 49 พันธุ์

กลุ่มที่ 3 รวงทอง ทุเรียนไม่มีหนาม (*Durio* sp.) ทุเรียนนก (*D. griffithii*) ทุเรียนรากชา (*D. kutejensis*) ทุเรียนนก (*D. lowianus*) ทุเรียนขนยาว (*D. oxleyanus*) ทุเรียนข้าวตีด (*D. graveolens*) ทุเรียนดอน (*D. malaccensis*) และทุเรียนซาเรียน (*D. mansoni*)^{จำนวน} 1 พันธุ์ 8 ชนิด

แสดงให้เห็นว่าทุเรียนนก (*D. griffithii*) ทุเรียนไม่มีหนาม (*Durio* sp.) ทุเรียนรากชา (*D. kutejensis*) ทุเรียนนก (*D. lowianus*) ทุเรียนข้าวตีด (*D. graveolens*) ทุเรียนขนยาว (*D. oxleyanus*) เป็นทุเรียนที่มีความใกล้ชิดกับทุเรียนบ้าน (*D. zibethinus*) มากกว่าทุเรียนดอน (*D. malaccensis*) และทุเรียนซาเรียน (*D. mansoni*) สอดคล้องกับการทดลองของ Kanzaki และคณะ (1998)

และผลการทดลองยังสอดคล้องกับการทดลองที่ 1 ยกเว้นทุเรียนรากชา (*D. kutejensis*) แต่เมื่อเทียบกับการจัดกลุ่มพันธุ์ในอดีตและจัดกลุ่มพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยหิรัญ และคณะ (2541) พบว่า จากจำนวน 56 พันธุ์ แบ่งเป็นอยู่ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 6 พันธุ์ กลุ่มที่ 2 49 พันธุ์ และกลุ่มที่ 3 จำนวน 1 พันธุ์ กับ 8 ชนิด ในกลุ่มที่ 1 มีการจำแนกพันธุ์กบหน้าศาล และกบหลังวิหารอยู่ในกลุ่มนี้ ขณะที่กลุ่มที่ 2 ก็มีการจำแนกพันธุ์กบหลายพันธุ์อยู่กับพันธุ์อื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องจากโดยรากฐานนั้นทุเรียนบ้าน (*D. zibethinus*) นั้นมาจากพันธุ์ดั้งเดิมเพียง 5 พันธุ์ คือพันธุ์ลวง การเกิด ทองลูก และทองย้อย^{เอ๊ะ}กำปัน (วิจิตร, 2519; แสง, 2527) ซึ่งอาจเกิดการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ทำให้ได้ทุเรียนหลากหลายพันธุ์ แต่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในระดับ 70-98% จึงมีลักษณะพันธุกรรมที่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้แต่อย่างไรก็ตาม ก็มีความแตกต่างอย่างเด่นชัดระหว่าง

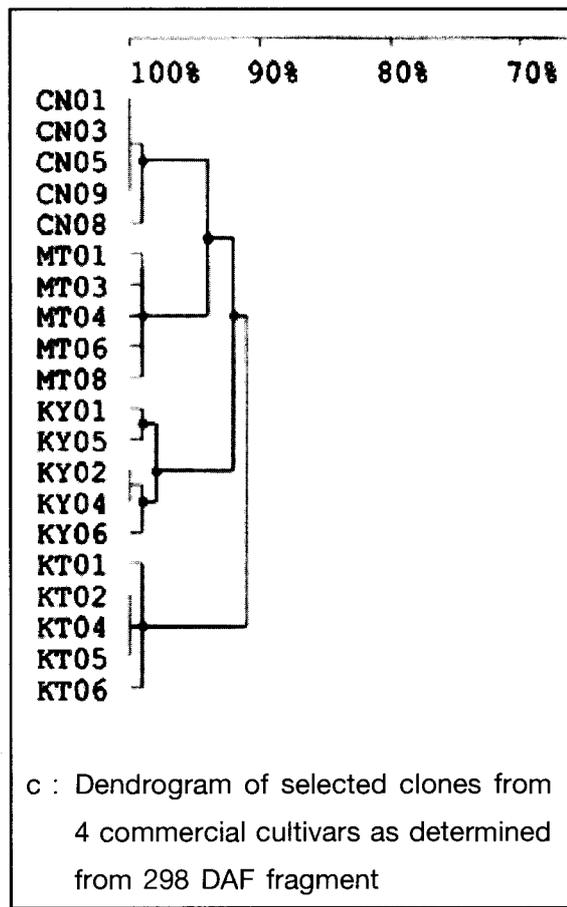
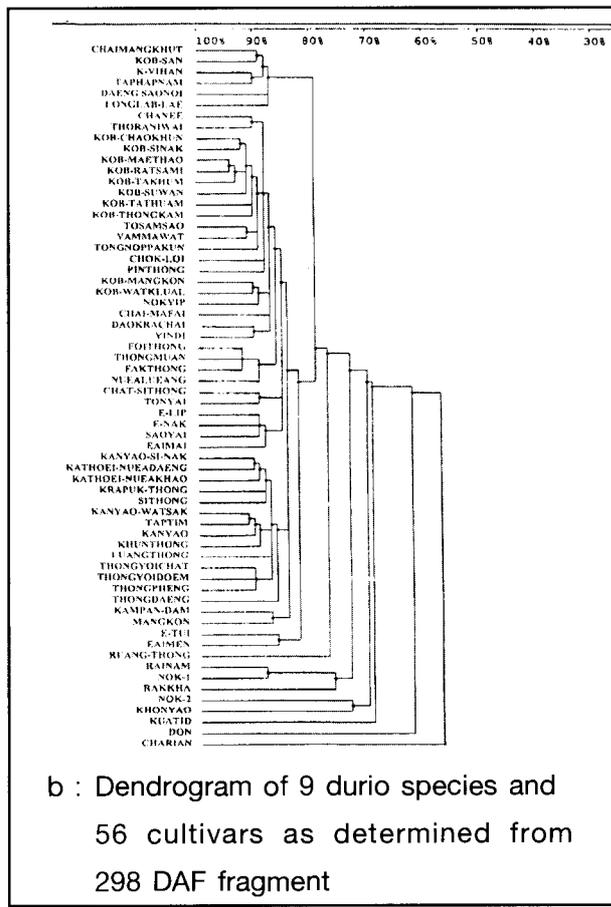
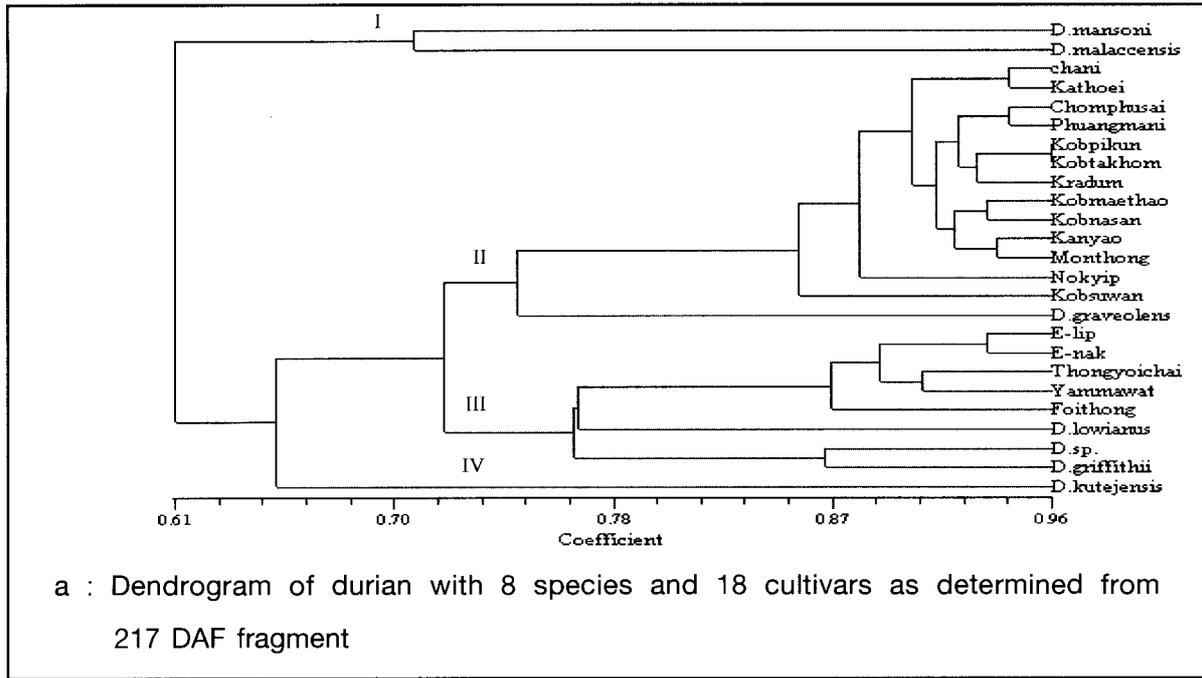
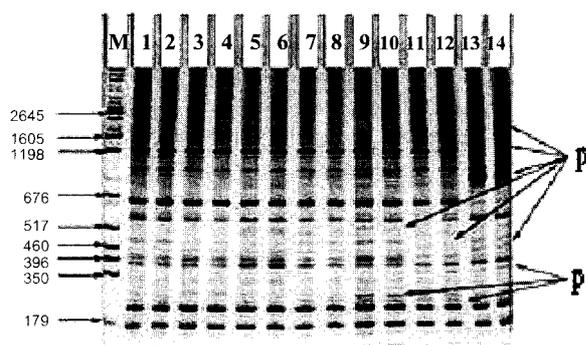


Figure 3. Dendrogram of durian species, cultivars, clones, the pair-wise coefficients of correlation were clustered using UPGMA and assembled into the dendrogram as described in the methods.

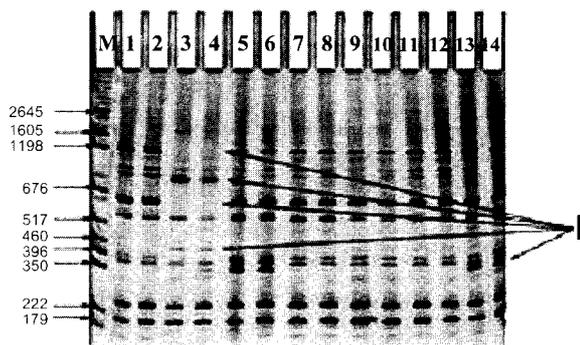
Table 6. Similarity matrix of genetic distances among the selected clones from 4 commercial cultivars obtained using the DNA amplification fingerprinting (DAF) data in third experiment.

Cultivar/clone	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21
CN01 (L2)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.91	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.93	0.93	0.93	0.93	0.95	0.94	0.94	0.95	0.95
CN03 (L3)		1.00	1.00	1.00	1.00	0.91	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.93	0.93	0.93	0.93	0.95	0.94	0.94	0.95	0.95
CN05 (L4)			1.00	1.00	1.00	0.91	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.93	0.93	0.93	0.93	0.95	0.94	0.94	0.95	0.95
CN08 (L5)				1.00	1.00	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.93	0.93	0.93	0.93	0.92	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
CN09 (L6)					1.00	0.91	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.93	0.93	0.93	0.93	0.95	0.94	0.94	0.95	0.95
KT01 (L7)						1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	0.92	0.92	0.92	0.92	0.91	0.94	0.94	0.94	0.94	0.95
KT02 (L8)							1.00	1.00	1.00	1.00	0.92	0.91	0.91	0.92	0.91	0.95	0.94	0.94	0.95	0.95
KT04 (L9)								00	1.00	1.00	0.92	0.91	0.91	0.92	0.91	0.95	0.94	0.94	0.95	0.95
KT05 (L10)									1.00	1.00	0.92	0.91	0.91	0.92	0.91	0.95	0.94	0.94	0.95	0.95
KT06 (L11)										1.00	0.92	0.91	0.91	0.91	0.91	0.94	0.94	0.94	0.94	0.95
KY01 (L12)											1.00	0.99	0.99	0.99	0.98	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92
KY02 (L13)												1.00	1.00	1.00	1.00	0.92	0.92	0.91	0.91	0.92
KY04 (L14)													1.00	1.00	1.00	0.92	0.92	0.91	0.91	0.92
KY05 (L15)														1.00	0.99	0.92	0.92	0.91	0.92	0.92
KY06 (L16)															1.00	0.92	0.91	0.91	0.91	0.91
MT01 (L17)																1.00	0.99	0.99	0.99	1.00
MT03 (L18)																	1.00	0.99	0.99	0.99
MT04 (L19)																		1.00	1.00	0.99
MT06 (L20)																			1.00	1.00
MT08 (L21)																				1.00

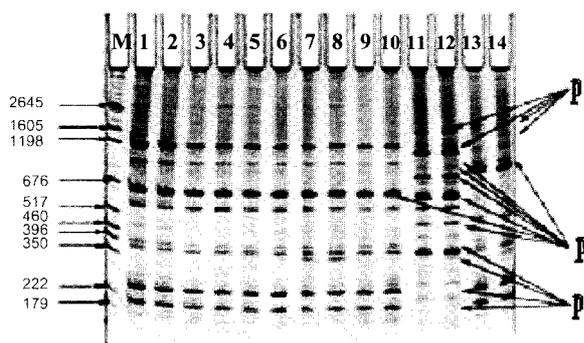
Durio DNA Fingerprint (Durian)



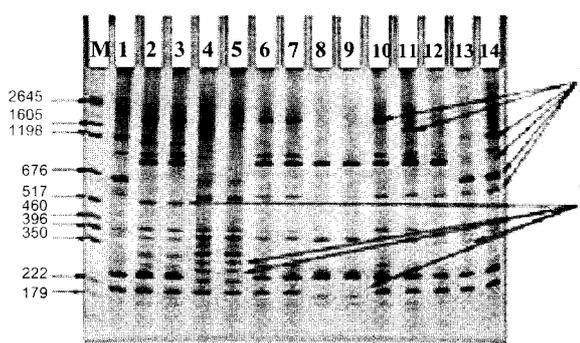
a : 1, 2 = Chani, 3, 4 = Kob Thongkam,
5, 6 = Kob Mangkon, 7, 8 = Kob
watklual, 9, 10 = Kob tathuam,
11, 12 = Nokyib, 13, 14 = E-tui



b : 1, 2 = Chani, 3, 4 = Eaimen, 5, 6 =
Eaimai, 7, 8 = E-lip, 9, 10 = E-nak,
11, 12 = Tonyai, 13, 14 = Saoyai



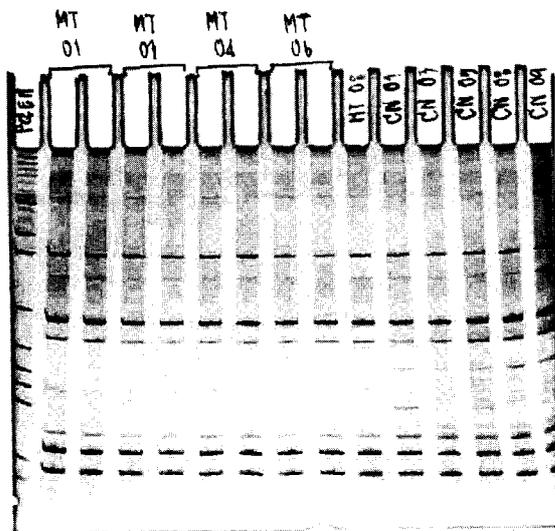
c : 1, 2 = Chani, 3, 4 = Thoraniwai,
5, 6 = Chai Mafai, 7, 8 = Daokrachai,
9, 10 = Yindi, 11, 12 = Don, 13, 14 =
Kuatid



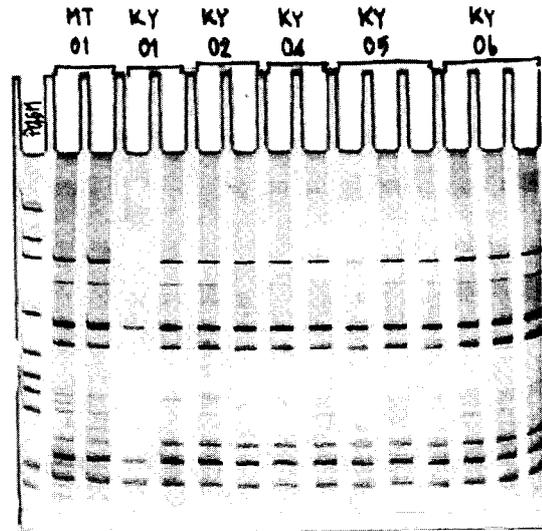
d : 1, 2 = Rakkha, 3, 4 = Charian, 5, 6 =
Rainam, 7, 8 = *D. oxleyanus*, 9 =
D. griffithii (Nok 1), 10 = *D. lowianus*
(Nok 2), 11 = Luangthong, 12 =
Kampan Dam, 13 = Mangkon

Figure 4. Polyacrylamide gel of DAF-modified durian DNA. DNA from each of the 9 species and 56 cultivars was amplified using primer OPB 16 and separated on a 10% polyacrylamide gel as described in the methods. The cultivar names were shown in Table 2.

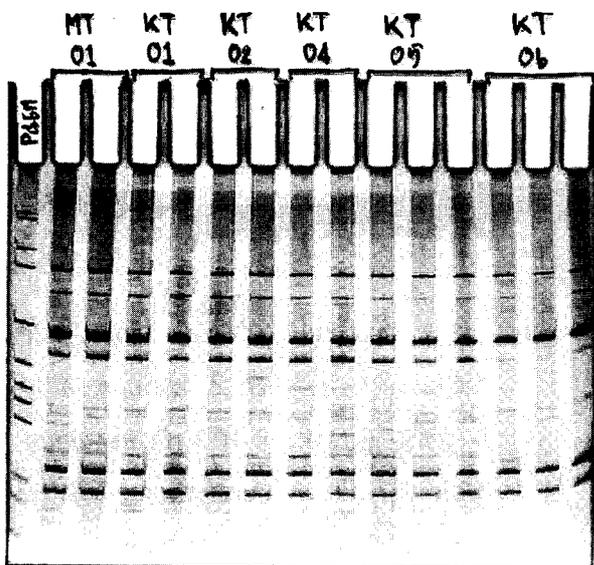
Lane M : DNA size markers. P is polymorphism. Number above each lane



a : 1 = DNA size markers, 2, 3 = MT 01,
4, 5 = MT 03, 6, 7 = MT 04 , 8, 9 =
MT 06, 10 = MT 08, 11 = CN 01,
12 = CN 03, 13 = CN 05, 14 = CN 08,
15 = CN 09



b : 1 = DNA size markers, 2, 3 = MT 01,
4, 5 = KY 01, 6, 7 = KY 02, 8, 9 =
KY 04, 10 11, 12 = KY 05, 13, 14,
15 = KY 06



c : 1 = DNA size markers, 2, 3 =
MT 01, 4, 5 = KT 01, 6, 7 =
KT 02, 8, 9 = KT 04, 10, 11, 12 =
KT 05, 13, 14, 15 = KT 06

Figure 5. Polyacrylamide gel of DAF-modified durian DNA. DNA from each of the selected clones from 4 commercial cultivars was amplified using primer OPB 16 and separated on a 10 % polyacrylamide gel as described in the methods.

Lane M : DNA size markers. Number above each lane corresponded to the following cultivars:

ทุเรียนบ้านกับทุเรียนต่างชนิด

ในการวิเคราะห์แบบการจัดแบ่งกลุ่ม (Figure 3a, 3b) พบว่าบางพันธุ์สามารถแยกความเหมือนความแตกต่างโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งมีการจัดแบ่งกลุ่มคล้ายกับจากการใช้เทคนิค DAF แต่บางพันธุ์ไม่ได้ถูกจัดแบ่งกลุ่มคล้ายกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะ ได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมหรือยีนที่ควบคุมบางลักษณะไม่มีการสุมกระจายผ่านทางพันธุกรรม ทำให้แถบดีเอ็นเอไม่ปรากฏเชื่อมโยงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา (วนิดา, 2547) อย่างไรก็ตาม ถ้าไพรเมอร์ที่เลือกให้ความแตกต่างของ polymorphic profile สูง สามารถใช้เพียง 2-3 ไพรเมอร์ในการจำแนกพันธุ์ทุเรียนที่มีความใกล้เคียงกันได้

การทดสอบที่ 3
1.3 ขนาดใช้ไพรเมอร์ 10 สายในการวิเคราะห์ DAF-PCR ของสายต้น (clone) ทุเรียน 4 พันธุ์ที่ชนะการประกวดเชิงวิชาการ (Table 3, 4) มี polymorphic 48 ตำแหน่งจากจำนวนทั้งหมด 192 ตำแหน่งคิดเป็น 25.00% (Table 4) จากการใช้ primer OPB 16 พบว่าส่วนใหญ่แถบดีเอ็นเอของทุเรียนลูกผสมมีลักษณะคล้ายคลึงกับพ่อแม่พันธุ์ได้ เมื่อนำมาวิเคราะห์และคำนวณค่าดัชนีความเหมือน พบว่าทุเรียนสายต้น 4 พันธุ์ มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 91-100% โดยสายต้นชนะนี้ 5 ต้นมีความใกล้เคียงกัน 100% หมอนทองระหว่าง 99-100% ก้านยาวระหว่าง 91-100% กระดุมทองระหว่าง 91-100% (Table 6) และเมื่อแสดงในรูป dendrogram (Figure 3c) ที่ค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.90 พบว่าสามารถแบ่งจำแนกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 CN 01, CN 03, CN 05, CN 08

และ CN 09

กลุ่มที่ 2 MT 01, MT 03, MT 04, MT 06 และ MT 08

กลุ่มที่ 3 KY 01, KY 02, KY 04, KY 05 และ KY 06

กลุ่มที่ 4 KT 01, KT 02, KT 04, KT 05 และ KY 06

จะเห็นได้ว่า สายต้นทุเรียนที่ชนะการประกวดเชิงวิชาการทั้ง 5 สายต้นต่อพันธุ์ไม่ว่าจะเป็นพันธุ์ชนะนี้ หมอนทอง ก้านยาว หรือ กระดุมทอง มีความใกล้เคียงกันมากจนอาจถือได้ว่าแทบไม่มีความแปรปรวนภายในพันธุ์เดียวกัน เพียงแต่ต่างสายต้นกัน (Figure 5) ทั้งนี้เนื่องจากการขยายพันธุ์ทุเรียนที่เป็นการค้าในอดีตจนถึงปัจจุบันดำเนินการด้วยวิธีแบบไม่ใช้เพศคือการตอน ตัดตา ทาบกิ่ง และเสียบยอด จึงไม่น่ามีการกลายพันธุ์แต่ที่มีความแตกต่างกันบ้างอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมมากกว่า

สรุปผลการทดลอง

เทคนิค DNA Amplification Fingerprinting (DAF) สามารถจำแนกพืช สกุลทุเรียนที่ระดับค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.70 ได้เป็น 4 กลุ่ม และพบว่า ทุเรียนข้าวตอก (*D. graveolens*), ทุเรียนนก (*D. lowianus*) ทุเรียนไม่มีหนาม (*Durio* sp.) และ ทุเรียนนก (*D. griffithii*) เป็นทุเรียนที่มีความใกล้เคียงกับทุเรียนบ้าน (*D. zibethinus*) มากกว่า ทุเรียนซาเรียน (*D. mansonii*), ทุเรียนรากชา (*D. kutejensis*) และทุเรียนดอน (*D. malaccensis*)

เทคนิค DAF สามารถใช้ในการจัดกลุ่มของพืชในสกุล *Durio* ทั้งชนิด พันธุ์ สายต้นได้

เอกสารอ้างอิง

- ทรงพล สมศรี. 2546. จุดกำเนิดและการแพร่กระจายของเชื้อพันธุ์ทุเรียน. หน้า 174. ใน : *ฐานข้อมูลทุเรียน*. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.
- ทรงพล สมศรี. 2546. การรวบรวมและอนุรักษเชื้อพันธุ์ทุเรียน. หน้า 176. ใน : *ฐานข้อมูลทุเรียน*. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.
- เต็ม สมิตินันท์. 2523. *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์ - ชื่อพื้นเมือง)*. พันธุ์พืชเชิง กรุงเทพฯ. 379 หน้า.
- นิรนาม. 2547. ปริมาณและมูลค่าการส่งสินค้าเกษตร. 2545-2546 กรมศุลกากร สืบค้นจาก : <http://www.oae.th/stabsta/export/QVExp>.
- วิจิตร วังไฉ. 2519. *รายชื่อไม้ผลเมืองไทย*. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 31 หน้า.
- วนิดา งามเงิน. 2547. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียน และทุเรียนลูกผสมโดยเทคนิค DNA Amplification Fingerprinting (DAF). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 90 หน้า.
- แสวง ภูศิริ. 2527. *ทุเรียน*. วิทยาลัยเกษตรกรรมจังหวัดตรัง. 245 หน้า.
- หิรัญ หิรัญประดิษฐ์ ไพโรจน์ ผลประสิทธิ์ สงวน จันทรชู ปรีชา ภูสีเขียว. 2531. การรวบรวมพันธุ์ทุเรียนที่จะสูญเสียพันธุ์. หน้า.178-180 ใน : *รายงานผลการดำเนินงานวิจัย ปี 253 กรมวิชาการเกษตร*
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ.
- หิรัญ หิรัญประดิษฐ์ และสุขวัฒน์ จันทรปรณิก เสริมสุข สลักเพ็ชร 2541. *เทคโนโลยีการผลิตทุเรียน*. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 190 หน้า.
- Anon. 2004. Quantity and value of agricultural exports, 2002-2003. [Online]. Department of Customs. Available source : <http://www.oae.go.th/statistic/export/QVExp>
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. and P.M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196 : 80-83.
- Bentley, S. and B.J. Bassam. 1996. A robust DNA amplification fingerprinting system applied to analysis of genetic variation within *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense. *Phytopathol.* 144 : 207-213.
- Boonyakom C. 1955. *Knowledge of Durian*. Kasetsart University Publication, Bangkok, Thailand. 100 p.
- Caetano-Anolles, G. 1994. MAAP: A versatile and universal tool for genome analysis. *Plant Mol. Biol.* 25 : 1011-1026.

- Connolly, A.G., Godwin, I.D., Cooper, M. and I.H. DeLacy. 1994. Interpretation of randomly amplified polymorphic DNA marker data for fingerprinting sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. *Theor.Appl.Genet.* 88 : 332-336.
- Graham, G.C., Mayers, P. and P.M. Gresshoff. 1994. A simple and rapid method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *BioTechnique.* 16 : 48-50.
- He, G., Prakash, C.S. and R.L. Jarret. 1995. Analysis of genetic diversity in a sweetpotato (*Ipomoea batatas*) germplasm collection using DNA amplification fingerprinting. *Genome.* 38 : 938-945.
- Jarret, R.L. and D.F. Austin. 1994. Genetic diversity and systematic relationship in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and related species as revealed by RAPD analysis. *Genet.Res.Crop Evol.* 41 : 165-173.
- Kanzaki, S., Yonemori, K., Sugiura, A. and S. Subhadrabandhu. 1998. Phylogenetic relationships of the common durian (*Durio zibethinus*) to other edible fruited *Durio* spp. by RFLP analysis of an amplified region of cpDNA. *Hort.Sci.* 73(3) : 317-321.
- Nanthachai, S. 1994. *Durian : fruit development, postharvest physiology, handling and marketing in ASEAN.* ASAEAN Food Handling Bureau, Malaysia. 156 p.
- Rohlf, F.J. 1997. *NTSY Spec; Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.00.* Exeter. software, New York.
- Scott, M.C., Caetano-Anolles, G. and R.N. Trigiano. 1996. DNA Amplication Fingerprinting Identifies Closely Related Chrysanthemum Cultivars. *Amer. Soc. Hort. Sci.* 121(6) : 1043 -1048.
- Sneath, P.H.A. and R.R.Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy.* Freeman, Sanfrancisco. 573 p.
- Soegeng-Reksodihardjo, W. 1962. The species of *Durio* with edible fruits. *Ec.onomic Botany.* 16 : 270-82.
- Somsri, S., Fletcher, R.J., Jobin, M., Drew, R. Lawson, W. and M.W. Graham. 1998. Developing molecular markers for sex prediction in papaya (*Carica papaya* L.). *Acta Hort.* 461 : 141-148.
- Somsri, S. 1999. Improvement of Papaya (*Carica papaya* L.) for South-east Queensland : investigation of sex-type and fruit quality. Ph.D. thesis. University of Queensland, Gatton College, Queensland, Australia. 260 p.

- Somsri, S and Khaegkad, P. 2002. Comparisons of Durian Fruit Quality between F1 Hybrid Plants and Their Parents. *In* : Proceedings of the International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits. *Acta Hort.* 575 : 313-322.
- Sondur, S.N., Manshardt, R.M. and J.I. Stiles. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 547-553.
- Stiles, J.I., Lemme C., Sondur S., Morshidi M.B., R. Manshardt 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 697-701
- Subhadrabandhu, S. and S. Ketsa. 2001. Durian: King of Tropical Fruit. CABI. Pub. 178 p.
- Vangnai V. 1996. Status Report on Genetic Resources of Durian in Thailand (IPGRI Project No. B06). Collaboration with IPGRI Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania. Singapore. 16 p.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and V.S. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Wilson, T.B. 1954. The marketing of durian fruit from Parit District, Perak, *Malaysian Agric. J.* 37(4): 211-17.