

**การรวบรวมและศึกษาพันธุ์มะกอกน้ำมัน : ศึกษาลักษณะพันธุ์มะกอกน้ำมัน
โดยเทคนิค RAPD**

**Collection and Varietal Study of Olive : Molecular Characterization
of Olive Cultivars Using RAPD**

เสริมสกุล พจนการุณ¹ ดิเรก ตนพยอม¹
Sermasakul Pojanagaroon¹ Derake Tonpayom¹

ABSTRACT

Eighteen Olive (*Olea europaea* L.) cultivars from Spain, Italy and Israel were grown at Phurua, Loei (927 m asl, 17°17' N 101°24' E). They were studied using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Twenty random decamer primers were screened : sixteen of these produced 128 reproducible polymorphic amplification fragments. Each of the 18 cultivars can be discriminated with a few primers. Results were analysed for a similarity among the cultivars, and an unweighted pair group method cluster analysis was performed. The analysis revealed that the cultivar could be divided into eight groups. The dendrogram showed a good correlation between the banding patterns of olive cultivars and their utilization of fruits. In addition, the correlation between the banding patterns and their geographic origin was obviously.

Keywords : Olive, *Olea europaea*, cultivar identification, cultivar classification, molecular characterization, fingerprinting, RAPD, RAPD marker

¹ สถานีทดลองเกษตรที่สูงภูเรือ อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย 42160

¹ Phurua Highland Agricultural Experiment Station, Amphur Phurua, Loei 42160

บทคัดย่อ

ทำการรวบรวมมะกอกน้ำมันจากประเทศ สเปน อิตาลี และอิสราเอล จำนวน 18 พันธุ์ มาทดลองปลูก ในปี พ.ศ 2540 ณ สถานีทดลองเกษตรที่สูงภูเรือ อ. ภูเรือ จ. เลย (927 m asl, 171) แล้วศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 40 ไพรเมอร์ พบว่ามี 16 ไพรเมอร์ที่สามารถสร้างแถบเครื่องหมายแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์มะกอกน้ำมันทั้ง 18 พันธุ์ ได้จำนวน 128 แถบเครื่องหมาย เมื่อจัดกลุ่มที่คล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted pair group method cluster analysis แล้วทำเป็น dendrogram พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มมะกอกน้ำมันออกได้เป็น 8 กลุ่ม โดยพบความสัมพันธ์ที่ตีระหว่างแถบเครื่องหมายของพันธุ์มะกอกน้ำมันกับลักษณะการใช้ประโยชน์ของผล นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์กับประเทศแหล่งกำเนิดด้วย

คำหลัก : มะกอกน้ำมัน มะกอกโอลีฟ การแบ่งกลุ่ม การจำแนกพันธุ์ ลายพิมพ์ RAPD เทคนิค RAPD เครื่องหมายโมเลกุล RAPD

คำนำ

มะกอกน้ำมัน (Olive: *Olea europaea* L.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ได้แก่ อิตาลี สเปน โปรตุเกส เป็นต้น โดยประมาณ 2 ใน 3 ของมะกอกทั่วโลกปลูกในเขตนี้ (ศรปราชญ์, 2539) ส่วนต่างๆของต้นมะกอกน้ำมันสามารถสร้างประโยชน์ได้มากมาย โดยผลเป็นส่วนที่สำคัญที่สุด ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากผลมะกอกน้ำมัน ได้แก่ น้ำมันมะกอก (olive oil) และผลมะกอกน้ำมันรับประทาน (table olive) ทั้งในรูปผลสดของมะกอกเขียว (green olive) และมะกอกดำ (black olive) หรือผลิตภัณฑ์มะกอกน้ำมันกึ่งแปรรูป-แปรรูป ในทาง

โภชนาการถือว่าน้ำมันจากมะกอกน้ำมันเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพดีเยี่ยมของโลก คือมีส่วนประกอบของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid) โดยเฉพาะกรดโอเลอิก (oleic acid) มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Fernandes *et al.*, 1997) ซึ่งน้ำมันชนิดนี้สามารถช่วยลดปริมาณโคเลสเตอรอล (cholesterol) ชนิดเลว (LDL) ที่ก่อให้เกิดการอุดตันของไขมันในกระแสโลหิตได้อย่างดี อีกทั้งมี Cycloarthanol ที่สามารถจับกับโคเลสเตอรอลไม่ให้เข้าสู่กระแสโลหิต จึงลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจได้ นอกจากนี้มีสาร antioxidant ได้แก่ α -tocopherol ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของสาร free radical จึงลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง (Renowden, 1999) ประโยชน์อื่นคือน้ำมันมะกอกใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตสบู่และน้ำมันนวด ไบมะกอกใช้ในการปรุงอาหารและบำบัดรักษาทางการแพทย์ ในขณะที่ส่วนลำต้นและเนื้อไม้ซึ่งมีลวดลายสวยงามนิยมนำมาแกะสลักและทำผลิตภัณฑ์เฟอร์นิเจอร์ (ศรปราชญ์, 2539) ทางโครงการส่วนพระองค์ฯสวนจิตรลดาและกรมวิชาการเกษตรได้ทำการรวบรวมพันธุ์มะกอกน้ำมันที่มีอยู่ในภูมิภาคต่างๆที่เป็นแหล่งปลูกการค้าของโลก ได้แก่สเปน อิตาลีและอิสราเอล มาปลูกศึกษาและทดสอบ ณ สถานีทดลองเกษตรที่สูงภูเรือ เพื่อคัดเลือกพันธุ์ที่สามารถปรับตัวจากสภาพแวดล้อมแบบเมดิเตอร์เรเนียนที่มีลักษณะภูมิอากาศอบอุ่นชื้นให้เหมาะสมกับลักษณะภูมิอากาศแบบร้อนชื้นของประเทศไทยในที่สูงภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

เนื่องจากในปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องหมาย DNA หรือลายพิมพ์ DNA มีประโยชน์อย่างมากเนื่องจาก 1) ใช้ในการจำแนกตรวจสอบสายพันธุ์ที่ให้ผลแม่นยำโดยไม่ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตหรือชิ้นส่วนพืช 2) ใช้ในการหาความสัมพันธ์และความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ต่างสปีชีส์และภายใน

ในสปีชีส์เดียวกัน 3) ใช้ในการหาความหมายระหว่างลักษณะที่สำคัญทางพืชกับเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อประโยชน์ในการคัดเลือกและผสมลักษณะที่สำคัญนี้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เทคนิคที่นิยมใช้ในการสร้างลายพิมพ์ DNA ในพืชหลายชนิดโดยเฉพาะมะกอกน้ำมัน ได้แก่ การสร้างลายพิมพ์ DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ลำดับเบสไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primer) ในเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA หรือ RAPD (Fabbri *et al.*, 1995 ; Lavee *et al.*, 1999 ; Mekuria *et al.*, 1999 ; Vergari *et al.*, 1999 ; Sanz-Cortés *et al.*, 2001) เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชภายในสปีชีส์เดียวกัน (intraspecific variation) และต่างสปีชีส์กัน (interspecific variation) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะใช้ในการจำแนกพันธุ์ในแหล่งรวบรวมพันธุ์ที่เป็นการค้าและทำสิทธิบัตรพันธุ์พืช (Baird *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ได้หลายตำแหน่งในเวลาเดียวกัน (Lynch and Walsh, 1998) และไม่ต้องมีความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับลำดับเบสของตัวอย่าง DNA อีกทั้งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว ที่สำคัญ คือ ค่าใช้จ่ายต่อหน่วยจะน้อยมากหากมีจำนวนตัวอย่างน้อย (Morell *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตาม RAPD ก็มีข้อเสีย ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญคือ การไม่เกิดซ้ำของ RAPD fragment ในการทดลองครั้งหลัง ซึ่งเกิดขึ้นกับบาง fragments ทำให้รูปแบบ DNA (RAPD banding pattern) ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์หนึ่งๆ ไม่มีความสม่ำเสมอ (ปรีชา, 2543)

ในงานวิจัยนี้เป็นการสร้างลายพิมพ์ DNA โดยอาศัยเทคนิค RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์มีลำดับเบสสุ่มขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ เพื่อศึกษาพื้นฐานทางพันธุกรรมของมะกอกน้ำมันที่มีการนำสายพันธุ์จากต่างประเทศมาปลูกทดสอบในประเทศไทย โดยวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (similarity index) ระหว่างมะกอกน้ำมันทั้ง 18 พันธุ์ นำมาสร้าง dendrogram เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของใบ การออกดอกติดผล, แหล่งกำเนิดที่รวบรวมพันธุ์มาและลักษณะการใช้ประโยชน์ของผล ตลอดจนเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์มะกอกน้ำมันที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ห่างไกลกัน โดยเทคนิคต่างๆ เพื่อให้เกิดพันธุ์ใหม่ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์มะกอกน้ำมันที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 18 พันธุ์ โดยรวบรวมและนำเข้าจากประเทศสเปน อิตาลี และอิสราเอลมาปลูกทดสอบ ณ สถานีทดลองเกษตรที่สูงภูเรือ ต.ปลาป่า อ.ภูเรือ จ.เลย (927 m asl, 17°17' N 101°24' E) เมื่อปี พ.ศ. 2540 ได้แก่ Arbequina, Barnea, Carolea, Cipressino, Coratina, Cornicabra, Hojiblanca, Gordal, Grossa-di-cassano, Itrana, Maiatica, Manzanilla, Moresca, Nabadee, Nocellare-del-belice, Nocellare-messinese, Picual และ Roggianella (Table 1)

Table 1 Olive cultivars included in this study, their country of origin and their utilization of olive fruits.

No.	Cultivars	Country	Use	No.	Cultivars	Country	Use
1	Arbequina	Spain	Oil	10	Itrana	Italy	T(b)
2	Barnea	Israel	O/T	11	Manzanilla	Spain	T(g)
3	Carolea	Italy	O/T	12	Moresca	Italy	Oil
4	Comicabra	Spain	Oil	13	Nabadee	Israel	O/T
5	Coratina	Italy	Oil	14	Nocellare-del-Belice	Italy	T(g)
6	Grossa-di-cassano	Italy	Oil	15	Nocellare-Messinese	Italy	T(g)
7	Cipressino	Italy	Oil	16	Piqual	Spain	Oil
8	Gordal	Spain	T(g)	17	Maiatica	Italy	T(b)
9	Hojiblanca	Spain	O/T	18	Roggianella	Italy	T(b)

Note T = Table, g = green, b = black, O/T = dual purpose (Oil/Table)

ทำการเก็บตัวอย่างใบมะกอกน้ำมันแต่ละพันธุ์เพื่อสกัด DNA โดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบอ่อนจากกิ่งมะกอกน้ำมัน 10 กิ่งๆ ละ 4 ใบ แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -70°C ตามวิธีของ Fabbri *et al.*, (1995) ทำการสกัด DNA ทั้งหมดจากใบอ่อนมะกอกน้ำมันแต่ละพันธุ์ประมาณ 100 mg โดยวิธี CTAB ของ Doyle and Doyle (1987) ที่ดัดแปลงโดย Fabbri *et al.*, (1995) และดัดแปลงเล็กน้อยโดยเพิ่มขั้นตอนการใช้ Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25:24:1) จากการใช้ Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) เดิม DNA ที่สกัดได้นำมาเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ Operon kit B, AD และ E จำนวน 40 ไพรเมอร์ ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 μl ประกอบด้วย genomic DNA 50 ng ; 10 x PCR buffer (Gibco BRL) ; 1.9 mM MgCl_2 (Gibco BRL) ; 100 μM (dNTP) ได้แก่ dGTP, dCTP, dTTP, dATP (Amresco/Boerinhger); 0.4 μM primer (Operon Technology) และ 0.75 U DNA polymerase (Gibco BRL) ปฏิกิริยาดำเนินในเครื่อง

Perkin Elmer รุ่น Gene Amp PCR system 2400 โดยตั้งอุณหภูมิ 94°C 2 นาที แล้วตามด้วยโปรแกรมการเพิ่มปริมาณ DNA 3 ระดับ คือ 92°C 45 วินาที (Denaturation), 36°C 2 นาที (Primer annealing), 72°C 2 นาที (Primer extension) จำนวน 40 รอบ แล้วปรับปฏิกิริยาให้มีอุณหภูมิ 72°C 5 นาที ตามวิธีการของ Williams *et al.*, (1990) ที่ดัดแปลงโดย Fabbri *et al.*, (1995) โดยวิเคราะห์ใน 1.4% agarose gel electrophoresis (AGE) บันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพและบันทึกในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้แถบเครื่องหมายที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ (polymorphic markers) ของไพรเมอร์ที่สามารถให้แถบครบทุกพันธุ์ จำแนกกลุ่มพันธุ์มะกอกน้ำมันที่ศึกษาด้วยวิธี Unweighted pair group method cluster analysis ในการสร้าง dendrogram จากค่า similarity index เพื่อแสดงความใกล้ชิดและความห่างของพันธุ์ โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows version 7.5

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการวิจัยจำนวน 40 ไพรเมอร์ (Operon kit B, AD และ E) สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่สร้างลายพิมพ์ DNA ได้ครบทั้ง 18 พันธุ์จำนวน 16 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPB-01, OPB-06, OPB-08, OPB-10, OPB-11, OPB-13, OPB-15, OPB-20, OPAD-03, OPAD-05, OPAD-06, OPAD-14, OPAD-16, OPAD-18, OPAD-19 และ OPAD-20 ซึ่งสามารถสร้างลายพิมพ์ DNA ที่แสดงความแตกต่างของแถบ DNA (polymorphic DNA band) ระหว่างมะกอกน้ำมันทั้ง 18 พันธุ์ แถบเหล่านี้จึงถือได้ว่าเป็น polymorphic RAPD markers ทั้งหมดจำนวน 128 แถบ ดังแสดงตัวอย่างลายพิมพ์ DNA ของมะกอกน้ำมันทั้ง 18 พันธุ์ที่ใช้ไพรเมอร์ OPB-08, OPB-10 และ OPB-20 ใน Figure 1 และที่ใช้ไพรเมอร์ OPAD-14, OPAD-16 และ OPAD-18 ใน Figure 2 โดยแต่ละไพรเมอร์มีลำดับเบสและ polymorphic DNA band แสดงดัง Table 2 ค่าเฉลี่ยของแถบเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์มะกอกน้ำมันต่อหนึ่งไพรเมอร์คิดเป็น 8.00 แถบเครื่องหมายไพรเมอร์ตัวอื่นอีก 24 ไพรเมอร์ที่ทำการคัดทิ้ง เนื่องจากให้ DNA band ไม่ครบทุกพันธุ์ เช่น OPAD-01 ไม่สามารถสร้างลายพิมพ์ DNA สำหรับพันธุ์ Carolea, OPAD-11 ไม่สามารถสร้างสำหรับพันธุ์ Barnea, OPB-02 และ OPB-12 ไม่สามารถสร้างสำหรับพันธุ์ Barnea และ Maiatica ได้, OPB-03 ไม่สามารถสร้างสำหรับพันธุ์ Barnea และ Nocellare-Messinese, OPB-04 ไม่สามารถสร้างสำหรับพันธุ์ Barnea และ Necellare-del-Belice เป็นต้น ซึ่งพันธุ์ที่ไม่ปรากฏลายพิมพ์ DNA นี้ได้ทำ positive test โดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกในการทำ PCR ที่สามารถสร้างลายพิมพ์ DNA ได้มาทดสอบ DNA ของ Barnea พบว่าสามารถสร้างลายพิมพ์จาก DNA นั้นได้ แสดงว่า DNA ที่ใช้ไม่ผิดปกติแต่ไพรเมอร์อาจ

ไม่มีลำดับเบสที่เหมาะสมที่สามารถจับกับตำแหน่งของจีโนมบริเวณที่ทำให้เกิดแถบเครื่องหมาย จึงไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณ PCR ได้ ซึ่งจุดนี้เป็นประเด็นที่น่าสนใจมากกว่าพันธุ์ Barnea มีลักษณะทางพันธุกรรมโดยเฉพาะลำดับเบสแตกต่างจากพันธุ์อื่นมาก นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ Carolea, Maiatica และ Nocellare-Messinese ที่ไม่สามารถสร้างลายพิมพ์ DNA ได้ในบางไพรเมอร์ด้วย

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows version 7.5 ด้วยวิธี Unweighted pair group method cluster analysis ในการจัดกลุ่มพันธุ์มะกอกน้ำมันจากค่าความคล้าย (Similarity Index) ของแถบเครื่องหมาย DNA ที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์มะกอกน้ำมัน แล้วสร้างเป็นแผนภาพ dendrogram ดัง Figure 3 แสดงให้เห็นว่าสามารถจัดแบ่งกลุ่มมะกอกน้ำมันทั้ง 18 พันธุ์ออกได้เป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่หนึ่ง มี 4 พันธุ์ ได้แก่ Manzanilla, Nabadee, Hojiblanca และ Picual,
- กลุ่มที่สอง มี 2 พันธุ์ ได้แก่ Cipressino และ Moresca
- กลุ่มที่สาม มี 4 พันธุ์ ได้แก่ Gordal, Itrana, Nocellare-del-belice และ Grossa-di-cassano
- กลุ่มที่สี่ มี 2 พันธุ์ ได้แก่ Cornicabra และ Coratina
- กลุ่มที่ห้า มี 2 พันธุ์ ได้แก่ Arbequina และ Roggianella
- กลุ่มที่หก มี 2 พันธุ์ ได้แก่ Nocellare-Messinese และ Maiatica
- กลุ่มที่เจ็ด มี 1 พันธุ์ ได้แก่ Carolea
- กลุ่มที่แปด มี 1 พันธุ์ ได้แก่ Barnea

Table 2 List of the 8 selected decamer primers, their sequence (5'→3') and numbers of polymorphic RAPD markers among the 18 cultivars studied.

Selected Primer	Sequence (5'→3')	Polymorphic fragments (No)
OPB-01	GTT TCG CTC C	4
OPB-06	TGC TCT GCC C	9
OPB-08	GTC CAC ACG G	15
OPB-10	CTG CTG GGA C	10
OPB-11	GTA GAC CCG T	6
OPB-13	TTC CCC CGC T	6
OPB-15	GGA GGG TGT T	6
OPB-20	GGA CCC TTA C	11
OPAD-03	TCT CGC CTA C	3
OPAD-05	ACC GCA TCG G	11
OPAD-06	AAG TGC ACG G	3
OPAD-14	GAA CGA GGG T	16
OPAD-16	AAC GGG CGT C	8
OPAD-18	ACG AGA GGC A	10
OPAD-19	CTT GGC ACG A	6
OPAD-20	TCT TCG GAG G	4
Total (band)		128
Mean (band/primer)		8.0

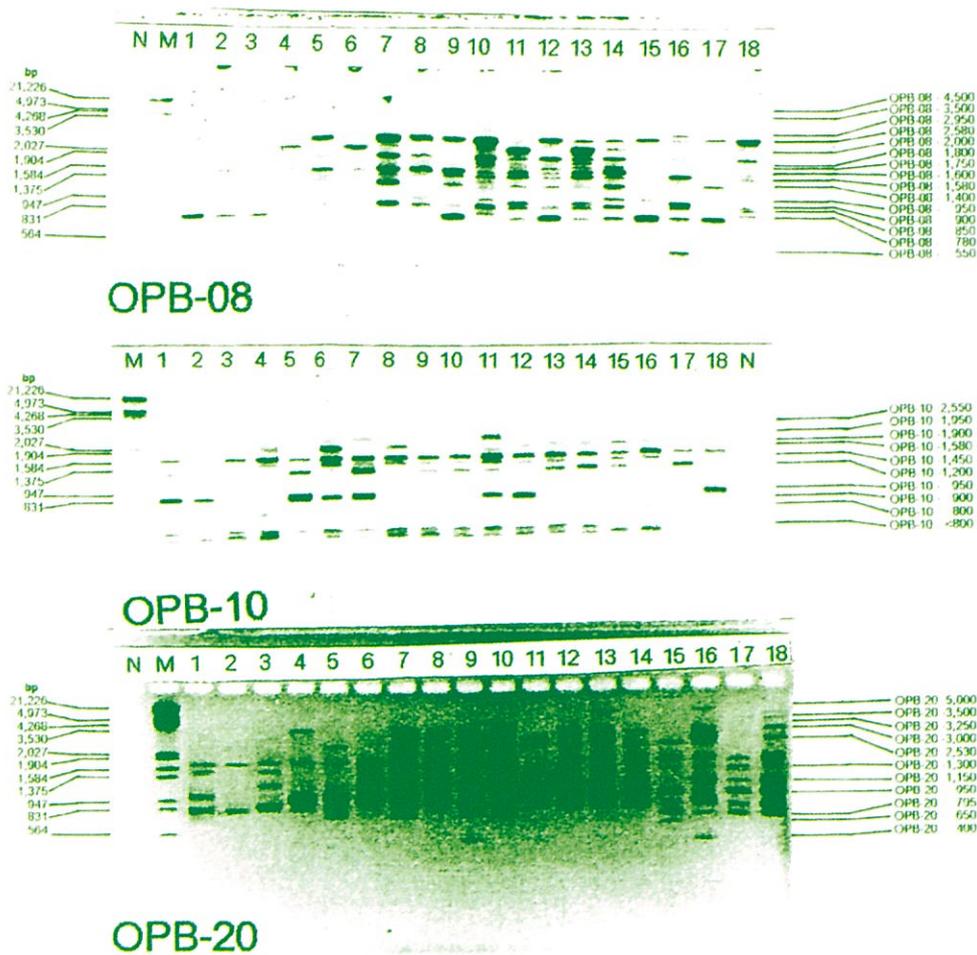


Figure 1 RAPD amplification productions patterns of the 18 introduced olive obtained with the primer (Operon kit B) : OPB-06, OPB-10 and OPB-20 under Agarose Gel Electrophoresis (AGE). The selected amplification fragments (polymorphic RAPD markers) are indicated with arrows, shown the name of Operon decamer primers and the molecular weight of fragment (bp). The letter at the top of the photographs correspond to the banding patterns. (M= the molecular marker, N= the negative control, the number 1 to 18 = the olive cultivars which have the serial number according to the name of their cultivars shown in Table 1.)

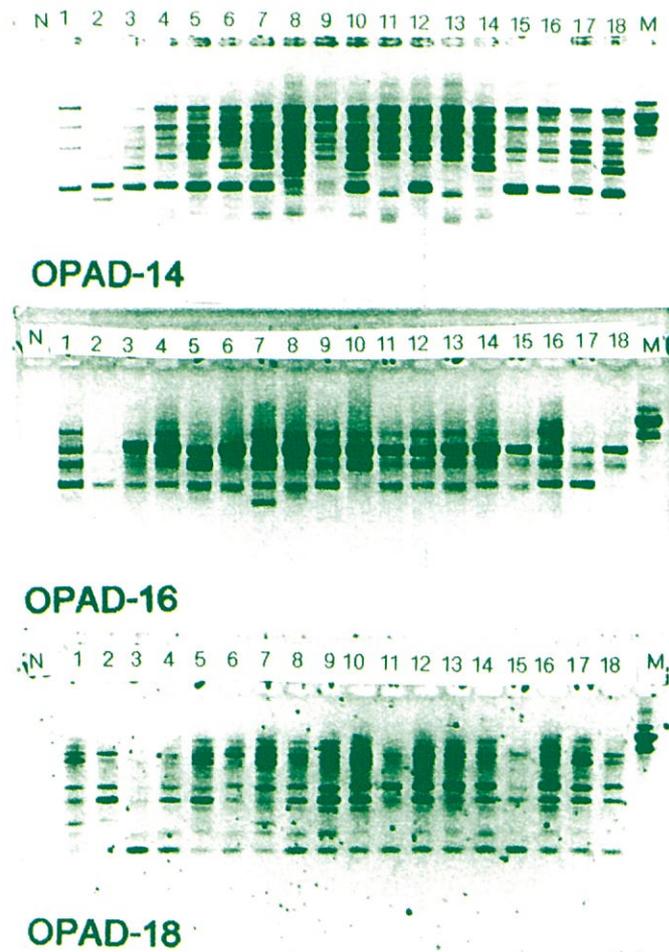


Figure 2 RAPD amplification productions patterns of the 18 introduced olive obtained with the primer (Operon kit AD) : OPAD-14, OPAD-16 and OPAD-18 under Agarose Gel Electrophoresis (AGE). The letter at the top of the photographs correspond to the banding patterns. (M= the molecular marker, N= the negative control, the number 1 to 18 = the olive cultivars which have the serial number according to the name of their cultivars shown in Table 1.)

เมื่อเปรียบเทียบ dendrogram ที่สร้างจาก ลักษณะทางพันธุกรรม (Figure 3) กับ dendrogram ที่สร้างจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของ ใบมะกอกน้ำมัน (เสริมสกุล และ ติเรก, 2544) พบว่า มีความคล้ายคลึงกันเพียงบางส่วนเท่านั้น ได้แก่ ความใกล้เคียงกันระหว่างพันธุ์ Hojiblanca กับ Piqual ; ระหว่างพันธุ์ Cipressino กับ Moresca; และระหว่างพันธุ์ Barnea กับ Carolea นอกจากนี้ ไม่เห็นความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของใบอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sanz-Cortés *et al.*, (2001) ที่ทำการจำแนกมะกอกน้ำมัน 40 พันธุ์ จาก Valencia ประเทศสเปนโดยใช้เทคนิค RAPD สรุปว่า ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพันธุกรรมที่ได้จากลายพิมพ์ DNA กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะกอกน้ำมันแต่อย่างใด และงานวิจัยของ Barone *et al.*, (1994) ที่ได้ศึกษาความน่าเชื่อถือของการใช้ลักษณะผลมะกอกน้ำมันเปรียบเทียบกับการใช้ลักษณะและสีของใบเป็นเกณฑ์ในการจำแนกกลุ่มมะกอกน้ำมัน 25 พันธุ์ใน Sicilia พบว่า ลักษณะของผลให้ความถูกต้องในการจำแนกสายพันธุ์ได้สูงถึง 87% ขณะที่การใช้ลักษณะและสีใบเป็นเกณฑ์ในการจำแนกพันธุ์มีความถูกต้องต่ำกว่า 50% อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของผลมะกอกน้ำมันเป็นเกณฑ์ในการจำแนกพันธุ์ในขั้นนี้ได้ เนื่องจากมะกอกน้ำมันที่รวบรวมปลูกและศึกษาที่สถานีทดลองเกษตรที่สูงภูเรือ ส่วนมากยังไม่ออกดอกหรือออกดอกได้แต่ไม่ติดผลหรือเลี้ยงผลจนแก่สมบูรณ์พร้อมเก็บเกี่ยวได้ มีเพียง 3 พันธุ์เท่านั้นที่ออกดอกติดผล คือ Comicabra, Arbequina และ Barnea (เสริมสกุล และ ติเรก, 2545) สำหรับลักษณะการออกดอกและติดผลของมะกอกน้ำมันทั้ง 3 พันธุ์ดังกล่าว เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับ dendrogram (Figure 3) แล้วไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะการออกดอกติดผลกับลายพิมพ์ RAPD

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมของมะกอกน้ำมันพันธุ์ต่างๆ จาก dendrogram ของลายพิมพ์ RAPD กับประเทศแหล่งกำเนิด พบว่า พันธุ์ที่มาจากประเทศอิตาลีน่าจะยังคงความคล้ายคลึงกันทางด้านพันธุกรรมมากกว่าพันธุ์ที่มาจากประเทศอื่น โดยสังเกตได้จากพันธุ์ Cipressino และ Moresca ในกลุ่มที่สอง ; Itrana, Nocellare-del-belice และ Grossa-di-cassano ในกลุ่มที่สาม ; Nocellare-Messinese และ Maiatica ในกลุ่มที่เจ็ด และ Coralea ในกลุ่มที่แปด ขณะที่พันธุ์จากประเทศอิสราเอลมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมากจะเห็นได้ชัดระหว่างพันธุ์ Barnea ในกลุ่มที่แปด กับพันธุ์ Nabadee ในกลุ่มที่หนึ่ง อาจเป็นไปได้ว่า พันธุ์มะกอกน้ำมันต่างๆ ในแต่ละประเทศมีการพัฒนาการทางพันธุกรรมเพื่อปรับตัวให้อยู่ได้ในสภาพแวดล้อมเหล่านั้น ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมมากขึ้นแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่าลายพิมพ์ RAPD มีความสัมพันธ์กับประเทศแหล่งกำเนิดพอสมควร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sanz-Cortés *et al.*, (2001) ที่ศึกษาพบว่ามะกอกน้ำมัน 40 พันธุ์จาก Valencia ประเทศสเปนมีสหสัมพันธ์กันระหว่างกลุ่มที่แบ่งได้กับประเทศแหล่งกำเนิด และ Trujillo *et al.*, (1990) พบว่าการใช้ isozyme polymorphisms ในการแบ่งกลุ่มพันธุ์มะกอกน้ำมันสอดคล้องกับประเทศแหล่งกำเนิด

เมื่อพิจารณาผลมะกอกน้ำมันซึ่งแบ่งตามลักษณะการใช้ประโยชน์ของผล สามารถแบ่งได้ 3 ประเภท คือ 1) ผลมะกอกน้ำมันสำหรับผลิตน้ำมันมะกอก (olive oil) มีลักษณะผลขนาดเล็ก มีปริมาณน้ำมันมะกอกในผลมาก, 2) ผลมะกอกน้ำมันรับประทาน (table olive) ทั้งรูปผลมะกอกเขียว (green olive) และผลมะกอกดำ (black olive) มักมีลักษณะผลขนาดใหญ่ เนื้อมากเปลือกหนา ทนต่อการแปรรูป แต่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันมะกอกในผลน้อยกว่า, 3) ผลมะกอกน้ำมันอเนกประสงค์ (dual purpose, O/T) ใช้ทั้งรับประทาน

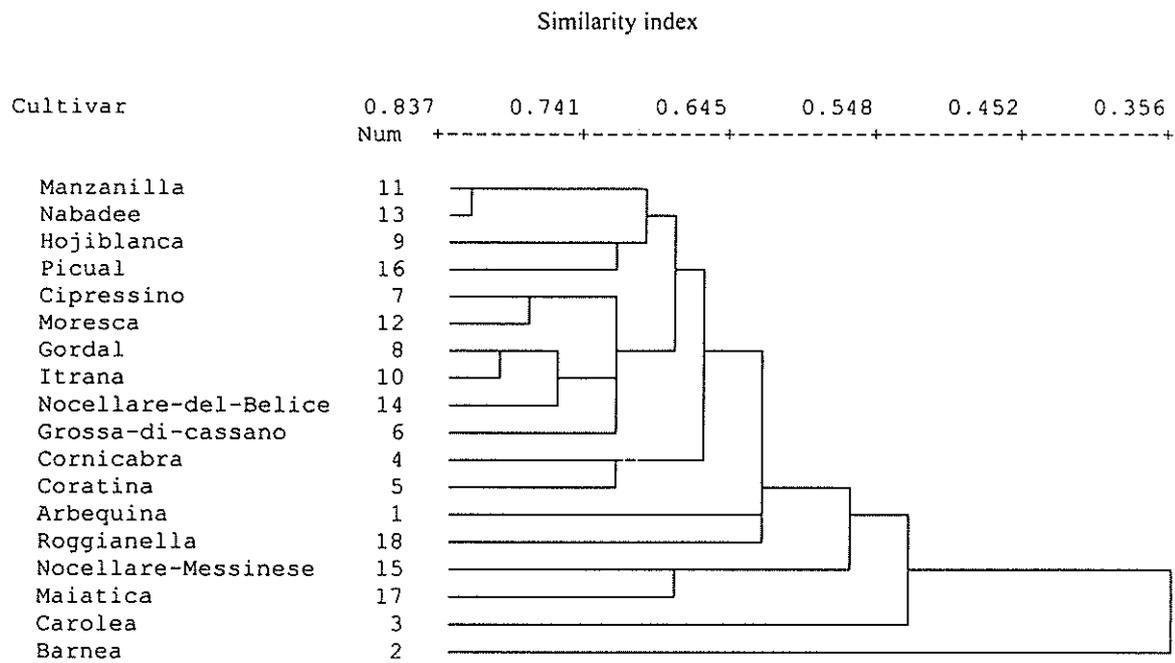


Figure 3 Dendrogram obtained by UPGMA cluster analysis from the Ochiai Similarity index among 18 introduced olive cultivars for 128 polymorphic RAPD

ผล และผลิตน้ำมันมะกอกซึ่งมีลักษณะผสมทั้ง 2 ลักษณะ มีขนาดผลปานกลางถึงใหญ่ แต่ละพันธุ์มีการใช้ประโยชน์ดัง Table 1 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ dendrogram ของลายพิมพ์ RAPD (Figure 3) ข้างต้นที่แบ่งกลุ่มพันธุ์มะกอกน้ำมันออกเป็น 8 กลุ่ม พบว่า กลุ่มที่สองและสี่ เป็นมะกอกน้ำมันประเภทผลิตน้ำมันมะกอกทั้งหมด ; กลุ่มที่สามและหก เป็นมะกอกน้ำมันรับประทานผลทั้งหมด ยกเว้น Grossa-di-cassano ที่ใช้ผลิตน้ำมันมะกอก กลุ่มที่หนึ่ง, เจ็ดและแปด ใช้สองลักษณะคือทั้งผลิตน้ำมันมะกอก และรับประทานผล ยกเว้นพันธุ์ Manzanilla ที่ใช้รับประทานผลเท่านั้น จึงอาจกล่าวได้ว่ากลุ่มมะกอกน้ำมันที่มีลักษณะคุณสมบัติภายในผล (ได้แก่ ปริมาณส่วนประกอบน้ำมันในผล, ขนาดผล, ปริมาณเนื้อผล และความหนาของเปลือกผล) คล้ายคลึงกัน น่าจะมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน นั่นคือมีความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้จากลายพิมพ์ RAPD กับลักษณะการใช้ประโยชน์ของผลมะกอกน้ำมัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fabbri *et al.*, (1995) ที่พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ RAPD กับขนาดของผล โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ให้ผลขนาดเล็กสำหรับการผลิตน้ำมันมะกอก กับกลุ่มผลที่มีขนาดปานกลางถึงใหญ่สำหรับใช้ในการบริโภคผลมะกอกน้ำมัน และยังพบว่าการใช้ขนาดผลเป็นเกณฑ์ในการแยกพันธุ์มะกอกน้ำมันมีความสามารถในการแยกสูงสำหรับแหล่งรวบรวมพันธุ์มะกอกน้ำมัน (olive germplasm)

สำหรับงานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์เพียงไม่กี่ตัวก็สามารถให้ polymorphic DNA band ได้จำนวนมาก อาจเนื่องมาจาก พันธุ์มะกอกน้ำมันที่นำมาปลูกทดสอบมาจากหลายแหล่ง จึงมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันมาก คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Bogani *et al.*, (1994) ได้ใช้เทคนิค RAPD-PCR ในการจำแนกพันธุ์มะกอกน้ำมัน 11 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primer)

จำนวน 5 ไพรเมอร์ โดยคัดเลือกให้เหลือเพียง 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ AG1, 1281 และ 1283 ซึ่งให้ polymorphic band เฉลี่ยสูงถึง 8-14 band ต่อไพรเมอร์ สามารถใช้จำแนกและให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะกอกน้ำมันทั้ง 11 พันธุ์ได้ และงานวิจัยของ Fabbri *et al.*, (1995) ใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้จำนวน 17 ไพรเมอร์ โดยสุ่มจากไพรเมอร์ 40 ไพรเมอร์ให้ polymorphic DNA band 47 แถบ สามารถแยกมะกอกน้ำมัน 17 พันธุ์ได้ ความห่างไกลกันทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาสามารถนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์มะกอกน้ำมันโดยการผสมพันธุ์ เพื่อสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมให้กับมะกอกน้ำมันสำหรับคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะดีเด่นในแง่ต่างๆ เช่น การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของแหล่งปลูกในประเทศไทย การให้ผลผลิตที่มีคุณภาพสูง ให้ปริมาณผลผลิตต่อต้นสูง หรือต้านทานต่อโรคและแมลงได้ดี เป็นต้น อย่างไรก็ตามหากมีวัตถุประสงค์ในการใช้แบ่งกลุ่มมะกอกน้ำมันพันธุ์เดียวกันที่มาจากหลายแหล่งของประเทศ หรือแบ่งพันธุ์มะกอกน้ำมันที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมากๆ หรือใช้จำแนกพันธุ์มะกอกน้ำมันที่มีชื่อพ้องกันแต่สะกดต่างกัน เช่นในงานของ Lavee *et al.*, (1999) ทำการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในพันธุ์ Nabali Baladi งานวิจัยของ Vergari *et al.*, (1999) ศึกษาความแตกต่างของมะกอกน้ำมันพันธุ์ Manzanilla 15 จีโนไทป์ หรืองานวิจัยของ Sanz-Cortés *et al.*, (2001) ที่แยกมะกอกน้ำมัน 40 พันธุ์จาก Valencia ประเทศสเปนที่มีความใกล้เคียงกันอย่างมาก เป็นต้น อาจต้องทำการคัดเลือกไพรเมอร์จากการสุ่มจากไพรเมอร์จำนวนมาก เพราะแต่ละไพรเมอร์แทบจะไม่สามารถให้แถบลายพิมพ์ DNA ที่มีความแตกต่างกันได้เลย จึงจำเป็นต้องใช้จำนวนไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้มากกว่า 20 ไพรเมอร์ เพื่อให้ได้ polymorphic DNA band มากเพียงพอในการจำแนกความแตกต่างได้ ในการพิจารณาแถบ

เครื่องหมายจากไพรเมอร์จำนวนมากย่อมช่วยให้การตรวจสอบแม่นยำสูงขึ้น เช่นงานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ 16 ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 40 ไพรเมอร์ จะให้ความสัมพันธ์ทั้งในแง่การจัดกลุ่มตามประเทศแหล่งกำเนิด และการใช้ประโยชน์ได้ชัดเจนขึ้นกว่าที่เคยจัดกลุ่มมะกอกน้ำมันมาก่อนโดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้เพียง 8 ไพรเมอร์จากทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ (เสริมสกุล และดิเรก, 2545) แต่ขณะเดียวกันควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายประกอบด้วย เนื่องจากไพรเมอร์แต่ละชุดและสารเคมีที่ใช้มีราคาสูงมากและสิ้นเปลืองเวลามากด้วย อย่างไรก็ตามเทคนิค RAPD เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายต่อหน่วยต่ำกว่าวิธีการอื่นหากมีจำนวนตัวอย่างน้อย และไม่มีความจำเป็นต้องมีความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับตัวอย่าง DNA (Morell *et al.*, 1995) ซึ่งงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค RAPD สามารถใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์มะกอกน้ำมันได้ และจำนวนแถบเครื่องหมาย RAPD ที่จำเพาะแต่ละไพรเมอร์สามารถใช้เป็นเครื่องมือรับรองพันธุ์พืช และขึ้นส่วนพืชสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตพันธุ์มะกอกน้ำมัน ตลอดจนเป็นพื้นฐานทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลขั้นต้นสำหรับการทำแผนที่ยีน เพื่อใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยเทคนิคพันธุวิศวกรรมต่อไป (Belaj *et al.*, 2001)

สรุป

เครื่องหมายโมเลกุล RAPD สามารถใช้ศึกษาลักษณะลายพิมพ์ DNA ของมะกอกน้ำมัน 18 พันธุ์ที่รวบรวมเข้ามาปลูก โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 16 ไพรเมอร์ ให้จำนวนแถบเครื่องหมาย RAPD จำเพาะต่อพันธุ์มะกอกน้ำมัน 128 แถบเครื่องหมาย สามารถใช้จำแนกมะกอกน้ำมันพันธุ์คัดเลือกได้เป็น 8 กลุ่ม และพบความสัมพันธ์ที่ตีระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมกับลักษณะการใช้ประโยชน์ของผลมะกอกน้ำมัน ตลอดจนพบความสัมพันธ์กับประเทศแหล่งกำเนิดด้วย

คำนิยาม

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ นายพรชัย จุฑามาตรองผู้อำนวยการโครงการสวนพระองค์ฯสวนจิตรลดาที่กรุณาให้เอกสารความรู้เกี่ยวกับมะกอกน้ำมัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มานิตย์ เทวรัศมิ์พิทักษ์ ผู้อำนวยการศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการวิจัย ขอขอบคุณนางสาวเรือนแก้ว ประพฤติ และนางสาวอัมพร ยอดดี นักวิทยาศาสตร์ประจำศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ปรีชา ประเทพา. 2543. พันธุศาสตร์ยุคใหม่ : เทคโนโลยีดีเอ็นเอเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุกรรม. อภิชาติการพิมพ์. มหาสารคาม. 106 หน้า.
- ศรปราชญ์ ธโนศวรรยงกูร. 2539. ว่าด้วยความรู้เรื่องมะกอก (*Olive, Olea europaea L.*) ในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. 29 หน้า.
- เสริมสกุล พจนการุณ และ ดิเรก ตนพยอม. 2544. การรวบรวมและศึกษาพันธุ์มะกอกน้ำมัน. หน้า 13. ใน : เอกสารประกอบการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 1 วันที่ 11-13 กรกฎาคม 2544. กรุงเทพมหานคร. สถาบันวิจัยพืชสวน. กรมวิชาการเกษตร.
- เสริมสกุล พจนการุณ และดิเรก ตนพยอม. 2545. การรวบรวมและศึกษาพันธุ์มะกอกน้ำมัน : จำแนกพันธุ์โดยเทคนิค RAPD. หน้า 46-53. ใน : เอกสารเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ

- ครั้งที่ 40 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช
ภาคบรรยาย วันที่ 4-7 กุมภาพันธ์ 2545.
กรุงเทพมหานคร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
เสริมสกุล พจนการุณ และดิเรก ดนพยอม. 2545.
การรวบรวมและศึกษาพันธุ์มะกอกน้ำมัน : การ
เจริญเติบโตและการออกดอกติดผลของ
มะกอกน้ำมัน. หน้า 66. ใน : เอกสาร
กำหนดการประชุมและบทคัดย่อการประชุม
วิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 2 ภาคบรรยาย
วันที่ 28-30 พฤษภาคม 2545. ขอนแก่น.
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Baird, W.V.; R.E. Ballard; S. Rajapakse and A.G.
Abbott. 1996. Progress in Prunus Mapping
and Application of Molecular Markers
to Germplasm Improvement. *Hort Science*.
31 : 1099-1106.
- Barone, E.; L. Di Marco; A. Motisi and T. Caruso.
1994. The Sicilian Olive Gerplasm and
Its Characterization by Using Statistical
Methods. *Acta Hort*. 356: 66-69.
- Belaj, A.; I. Trujillo; R. dela Rosa; L. Rallo and
M.J. Gimenez. 2001. Polymorphism and
Descrimination Capacity of Randomly
Amplified Polymorphic Markers in an
Olive Germplasm Bank. *J. Amer. Soc.
Hort. Sci*. 26(1) : 64-71.
- Bogani, P.; D. Cavalieri; R. Petruccelli; L. Polsinelli
and G. Roselli. 1994. Identification of
Olive Tree Cultivars by Using Random
Amplified Polymorphic DNA. *Acta Hort*.
356 : 98-101.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A Rapid Isola-
tion Procedure for Small Quantities of
Fresh Leaf Tissue. *Phytochem. Bul*. 19:
11-15.
- Fabbri, A.; J.I. Hormaza and V.S. Polito. 1995.
Random Amplified Polymorphic DNA
Analysis of Olive (*Olea europaea* L.) Cul-
tivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*. 120 (3) :
538-542.
- Fernández, A.G.; M.J. Fernández Diez and D.R.
Adams. 1997. Table Olive: Production and
Processing. Chapman & Hall. London.
495p.
- Lavee, S.; N. Avidan and Z. Wiesman. 1999.
Genetic Variation within the Nabali Baladi
Cultivar of the West Bank. *Acta Hort*.
474: 129-132.
- Lynch, M. and B. Walsh. 1998. Principles of Mark-
ers Based Analysis. Pages 379-429. In :
Genetics and Analysis of Quantitative
Traits, Sinauer Associates, Inc.,
Massachusetts.
- Mekuria, G.T.; G.G. Collins and M. Sedgley. 1999.
Genetic Variability between Different Ac-
cessions of Some Common Commercial
Olive Cultivars. *J. Hort. Sci. Biotech*. 74(3):
309-314.
- Morell, M. K; R. Peakall; R. Preston and H. L.
Lloyd. 1995. DNA Profiling Techniques
for Plant Variety Identification. *Aust. J.
Exp. Agri*. 35 : 807-819.
- Renowden, G. 1999. The Olive Book. Canterbury
University Press. Canterbury. 146p.
- Sanz-Cortés, F.; M.L. Badenes; S. Paz; A. Iniguez
and G. Llácer. 2001. Molecular Charac-
terization of Olive Cultivars using RAPD
Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*. 126(1) :
7-12.

Trujillo, I.; L. Rallo; E.A. Carbonell and M.J. Asins. 1990. Isozymatic Variability of Olive Cultivars according to Their Origin. *Acta Hort.* 286: 137-140.

Vergari, G.; M. Patumi and G. Fontanazza. 1999. Varietal Discrimination of 15 Genotypes of Olive (*Olea europaea* L.) Belonging to

CV. Manzanilla. *Acta Hort.* 474: 141-145.

Williams, J.K.; A.R. Kubelik; K.J. Livak; J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6531-6535.
