

การปรับปรุงพันธุ์มะขามด้านเชื้อราด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ยีน *rbcL* ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฉายรังสีแกมมา

Antifungal *Tamarindus indica* L. crop improvement by *rbcL* gene analysis in combination of tissue culture and gamma ray irradiation techniques

เบญจพร ศรีสุวรรณ^{1*}, จินตนา สนามชัยสกุล², สมพงษ์ แสนเสนยา³, เทพ เพียมะลัง²

สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง¹

**Benchaporn Srisuvoramas^{1*}, Chintana Snamchaiskul², Sompong Sansenya³, Tep Piamalang²
Surachest Aiumsumang¹**

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ เพชรบูรณ์ 67000

²สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ เพชรบูรณ์ 67000

³สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ เพชรบูรณ์ 67000

¹Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun 67000, Thailand

²Department of Plant Science, Faculty of Agricultural Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun 67000, Thailand

³Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun 67000, Thailand

*Corresponding author: benmas.benmas@yahoo.co.th

บทคัดย่อ

การทดลองนี้ใช้เมล็ดมะขาม 6 พันธุ์ปลูก ทั้งจากต้นที่ขึ้นราและไม่ขึ้นรา ในจังหวัดเพชรบูรณ์ ประเทศไทย ซึ่งผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน 5 ระดับ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและลำดับเบสของยีน *rbcL* ในคลอโรพลาสต์จีโนม โดยทำการเพาะเมล็ดในดินปลูกตามธรรมชาติและเพาะด้วยระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สกัด DNA จากใบอ่อนด้วยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ผลการทดลองพบว่ายีนต้นเชื้อราไม่ได้อยู่บนยีน *rbcL* และอาจไม่มียีนต้นเชื้อราอยู่ในใบมะขาม แต่พบว่ายีน *rbcL* สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูก (cultivars) ของมะขามได้เป็นอย่างดี ผลการทดลองพบว่าทั้งเชื้อราและรังสีแกมมามีผลก่อให้เกิดการกลาย (mutation) ในมะขามทั้ง 6 พันธุ์ปลูก (ยกเว้นเชื้อราไม่มีผลต่อพันธุ์ปลูกศรีชมภู) ต้นอ่อนทุกทรีทเมนต์อายุ 3-4 สัปดาห์ที่ได้รับรังสีจะมีใบแห้งแตกเป็นใบลายแบบโมเสก ลักษณะโมเสกหายไป เมื่อมีการสร้างใบแห้งต่อมา จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *rbcL* ด้วยเทคนิค single nucleotide analysis (SNA) ของต้นอ่อนอายุ 3 ปี พบว่าการแทนที่ของเบสสูงสุด 75 ตำแหน่งจาก 496 คู่เบส คิดเป็น 15.12% ที่ปริมาณรังสี 150 Gy ของพันธุ์ปลูกประกายทอง และเป็นทำนองเดียวกันทุกพันธุ์ปลูก นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ทรีทเมนต์ 150 Gy ของทุก พันธุ์ปลูก เมื่อเปรียบเทียบรูปร่างภายนอก (morphology) ของทั้ง 2 กลุ่ม พบว่ากลุ่มที่ได้รับรังสี 150 Gy จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นใหญ่ เตี้ยเป็นทรงพุ่ม แตกกิ่งก้านมาก ใบประกอบมาก ใบย่อยมีขนาดกว้างและยาวกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีรูปทรงแบบทรงกระบอกตรงๆ มีลำต้นสูงยาว แตกกิ่งก้านสาขาน้อย ซึ่งยังเป็นระยะกำลังเจริญเติบโต (juvenile stage) การทรีทเมนต์ทุกระดับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p\text{-value} < 0.05$

ABSTRACT

In the present of this study, the seeds of six tamarind cultivars which were born in Phetchabun province, Thailand. They were subjected to five levels of acute gamma radiation to investigate the morphological and the nucleotide characteristic of *rbcL* gene in chloroplast genome. The young leaves were DNA extraction by cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method. Using the way of growing the seeds in natural soil and tissue culture techniques, it was found that the antifungal activity was not on the *rbcL* gene, and maybe no more resistant gene on tamarind's leaves. In the opposite, it was found that the sequence of *rbcL* gene could be used as good molecular marker for identify the different cultivar level of Tamarinds. The results indicated that, both fungi and gamma rays could be induced mutation on 6 tamarind cultivars (exception, the fungi no effect to Srichompoo cultivar). At the all dose, the leaves of 3–4 weeks irradiated tamarind seedling were found to be a mosaic similar of leaf mosaic disease, but this symptom will disappear when the plant produce the second true leaves. After three years of cultured, we identified the sequences of *rbcL* gene in chloroplast genome to characteristic of nucleotide sequences of irradiated and non-irradiated plants. The irradiated plant nucleotide substitutions were found at the all dose of gamma ray. While at doses of 150 Gy of Prakaitong cultivar causes the highest nucleotide substitution (75 site = 15.12% of 496 bp). They showed in the same results in all of six cultivars. When compared the morphology of them. It was found that the irradiated plants are bigger than control in trunk dimension, wider and longer of leaflet, more compound leaves, but shorter in plant height, while the controls are small in trunk dimension, no branching and still in juvenile stage. All treatments are significant differences at p -value < 0.05).

คำสำคัญ: การฉายรังสีแกมมา; การปรับปรุงพันธุ์มะขามต้านเชื้อรา; การวิเคราะห์ยีน *rbcL*; การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม; เทคนิค SNA

Keywords: gamma ray radiation; antifungal *Tamarindus indica* L. crop improvement; *rbcL* gene analysis; morphological changes; SNA techniques

บทนำ

มะขามเป็นพืชเศรษฐกิจของจังหวัดเพชรบูรณ์ ปัจจุบันกำลังประสบปัญหาการติดเชื้อราในฝักสุก ของมะขามหวานอย่างมาก ผลผลิตและราคาตกต่ำ อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของโลก แต่มะขามเปรี้ยวพื้นเมืองและเปรี้ยวยักษ์ซึ่งให้ผลผลิตในช่วงเวลาที่แตกต่างจากมะขามหวาน จะไม่พบการติดเชื้อรา พันธุ์ปลูกศรีชมภูและขันตี ซึ่งมีฝักสุกเร็วกว่า 1–2 เดือน จะพบการติดเชื้อราน้อยกว่าพันธุ์ปลูกประกายทองและสีทอง ซึ่งมีฝักสุกระหว่างเดือนธันวาคมและมกราคม และมักจะเกิดภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง เช่น ฝนตกหนักสลับอากาศร้อนจัด ทั้งที่เป็นฤดูหนาวหรือหนาวจัดผิดปกติจนเกิดน้ำค้างแข็งบนยอดหญ้า จากการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อของมะขามหวานมาเป็นเวลาหลายปี ทำให้ทราบว่า เชื้อราเข้าไปในฝักมะขามได้ 4 วิธี (เบญจพร และคณะ, 2552) คือ 1) ทางพื้นดินและเข้าไปเจริญอยู่ในมัดท่อลำเลียงของลำต้น (vascular bundle) และใบ 2) สปอร์ของเชื้อราที่ใบและในสิ่งแวดล้อมเข้าไปในรังไข่ตั้งแต่ระยะดอกบาน และเจริญไปพร้อมกับไข่อ่อนที่ถูกปฏิสนธิ 3) เชื้อราจากสิ่งแวดล้อมเข้าทางรอยตัดของข้อฝักของมะขามคาบหมูที่เก็บลงมาจากต้นเพื่อบ่มให้สุก และ 4) เข้าทางรอยแตกร้าวของฝักที่เกิดจากขนส่งหรือถ่ายเปลี่ยนภาระหน้าที่ใช้บรรจุ นอกจากนี้ เบญจพรและจินตนา, 2554 ยังพบอีกว่า เชื้อที่พบในมะขามหวานเป็นราที่ปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค เป็นราจำพวก endophyte และราพวกนี้ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดสารต้านมะเร็งหรือแอนติออกซิแดนท์ในเนื้อมะขามที่ขึ้นราสีขาวเหมือนน้ำตาลไอซิ่ง (*Pestalotiopsis sydowiana* (Bres.) B.Sutton) สูงกว่ากลุ่ม

ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01 ราในมะขามหวานแม้ไม่เป็นอันตราย แต่ไม่เป็นที่นิยมของผู้บริโภค และกำจัดได้ยาก การใช้รังสีแกมมาหรือสารก่อกลายพันธุ์ใดหรือคัดเลือกพันธุ์ที่มีวงชีวิตเปลี่ยนไป ทำให้ได้ผลผลิตเร็วขึ้นหรือช้าลง และมีระยะพักสุกที่ไม่ตรงกับฤดูกาลที่เปลี่ยนไป อาจทำให้ได้มะขามที่มีคุณภาพดี แต่มะขามก็เป็นพืชที่เจริญเติบโตช้ามาก อายุยืนยาว เมื่อปลูกด้วยเมล็ดจะใช้เวลา 10–20 ปี จึงจะออกดอกให้ผลผลิต Srisuvoramas *et al.*, 2012 พบว่าสามารถใช้ ยีน *rbcl* ในการตรวจสอบและจำแนกมะขามในระดับพันธุ์ปลูก (cultivar) ได้ และตรวจสอบคัดเลือกพันธุ์ได้แม่นยำตรงตามพันธุ์ที่ต้องการในเวลาอันรวดเร็วทำให้ไม่เสียเวลาในการปลูก ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์มะขามด้านเชื้อราด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ยีน *rbcl* ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฉายรังสีแกมมา น่าจะช่วยแก้ปัญหามะขามหวานติดเชื้อมาได้ระดับหนึ่ง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองนี้ใช้ เมล็ดมะขาม 6 พันธุ์ปลูก คือ ประกายทอง สีทอง ศรีชมภู ขันดี เปรี๊ยะพื้นเมือง และเปรี๊ยะยักษ์ ทั้งจากต้นที่ไม่ติดเชื้อมาและต้นที่ติดเชื้อมา รวมทั้งหมด 600 ฟัก (100 ฟัก/พันธุ์ปลูก) ซึ่งผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน 5 ระดับ คือ 0, 50, 100, 150 และ 200 Gy ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้สูตร Woody Plant Medium (WPM) ที่พัฒนา โดยเบญจพร และคณะ, 2544 และ 2545 เพื่อเลี้ยงต้นที่ขึ้นราและนำไปฉายรังสีแกมมา ในการจัดทรีทเมนต์เพื่อการเพาะเมล็ดมะขามทั้งในดินและในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนการจัดทรีทเมนต์เพื่อนำตัวอย่างไปฉายรังสีใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล แบบจำแนกทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้สถิติ *F-test* และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ตามวิธีของ Duncan's Multiple-Range Test (DMRT) ทั้ง 20 ทรีทเมนต์คอมบิเนชัน/พันธุ์ปลูก เก็บใบมะขามทุกพันธุ์ปลูกทุกทรีทเมนต์ อายุ 4 สัปดาห์ ไปทำการสกัด DNA โดยวิธี CTAB โดยใช้ชุดสกัด Real Genomics ของบริษัท RBC Bioscience Crop ประเทศไต้หวัน ซึ่งเป็นวิธีประยุกต์จากวิธี CTAB ทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *rbcl* ของมะขามที่มีอยู่ใน Gen Bank คือ *rbcl*-Tam-F03 ซึ่งมีลำดับเบส : CAT GGG AAG AAA TGA TAA AAA และ *rbcl*-Tam-R04 ซึ่งมีลำดับเบส : CAT GGG AAG AAA TGA TAA AAA จากนั้นตรวจวิเคราะห์ PCR Products ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่ง PCR products ไปที่บริษัท FIRST BASE ประเทศมาเลเซีย เมื่อได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identity) หรือเปอร์เซ็นต์ความต่าง ซึ่งใช้เกณฑ์ต่างกันเกิน 5% ถือว่ามี การแทนที่ของเบสมากจนมีการกลาย (mutation) เกิดขึ้น โดยใช้โปรแกรม Clustal W2 และวิเคราะห์ลำดับเบสเป็นรายจุด (single nucleotide analysis; SNA) ด้วยโปรแกรม BioEdit เปรียบเทียบกับ BLASTn ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งใช้กับเครื่องคอมพิวเตอร์ทุกตัวไป

ผลการทดลองและวิจารณ์

ใบอ่อนของมะขามมีลักษณะเหมือนกันหมดทุกพันธุ์ปลูก โดยมีอัตราการงอกและการเจริญต่างกันในแต่ละพันธุ์ปลูก และลักษณะใบลายหายไปหมด แต่เมื่อมีการสร้างใบแท้ชุดต่อมา (Figure 1) เซลล์มีกลไกในการซ่อมแซมตัวเองทำให้ใบแท้ชุดต่อๆ มาเจริญเป็นใบปกติ ลักษณะใบลายเป็นโมเสกเหมือนผลของใบมันฝรั่งที่ถูกทรีทด้วยไวรัสจากการทดลองของ Dmitriev *et al.*, 2009 แสดงว่ารังสีแกมมาและไวรัสมีผลทำให้ใบพืชเกิดเป็นใบลายแบบโมเสกได้เหมือนกัน และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Melki and Marouani, 2010 ซึ่งพบว่ารังสีแกมมามีผลต่อการงอกของเมล็ดข้าวสาลี และเมื่อตรวจดูลำดับเบสของยีน *rbcl* ในมะขามที่ได้รับรังสีเทียบกับต้นปกติ พบว่ามีการกลาย 0.82–51.87%

เทคนิคการนำเมล็ดไปฉายรังสีแล้วจึงนำไปเพาะเพื่อตรวจดู DNA มีปัญหาหรือข้อบกพร่องในเรื่องการนำเมล็ดจากฝักที่ขึ้นราไปฉายรังสี เพราะรังสีอาจทำให้เชื้อราตายจนไม่มีผลต่อการกลายในเมล็ด และไม่ทราบว่ามีเมล็ดก่อนฉายรังสีถูกเชื้อราทำลายไปมากน้อยเพียงไร และหากการกลายเป็นผลมาจากเชื้อรา หรือรังสี หรือเป็นอิทธิพลร่วม

ระหว่างเชื้อรากับรังสี ทำให้สรุปไม่ได้ในกรณีผลของเชื้อรา อย่างไรก็ตาม ผลของรังสีต่อเมล็ดจากฝักที่ไม่ติดเชื้อรา ได้ทำการทดลองโดยนำยอดอ่อนไปเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้ต้นที่มีขนาดและอายุเท่ากันก่อนนำไปฉายรังสี ทำให้ทราบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูก และอิทธิพลของรังสี เป็นการควบคุมตัวแปรที่ดี เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดและเห็นผลชัดเจน ผลการตรวจขนาดของยีนที่ศึกษา ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) พบว่า PCR products มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส แสดงดัง Figure 2

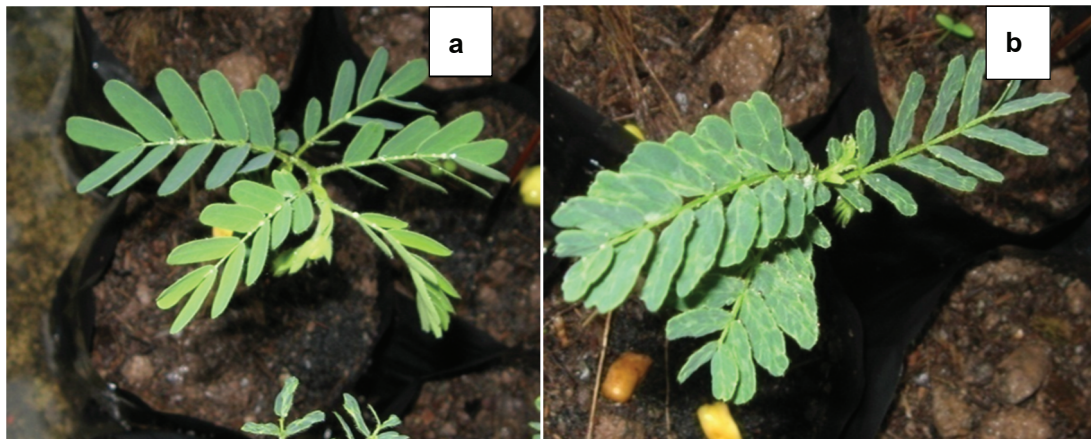


Figure 1 One month seeding of Tamarind (a) Non – irradiated tamarind seedling, (b) The irradiated tamarind seedling was found to be a mosaic similar of leaf mosaic disease.

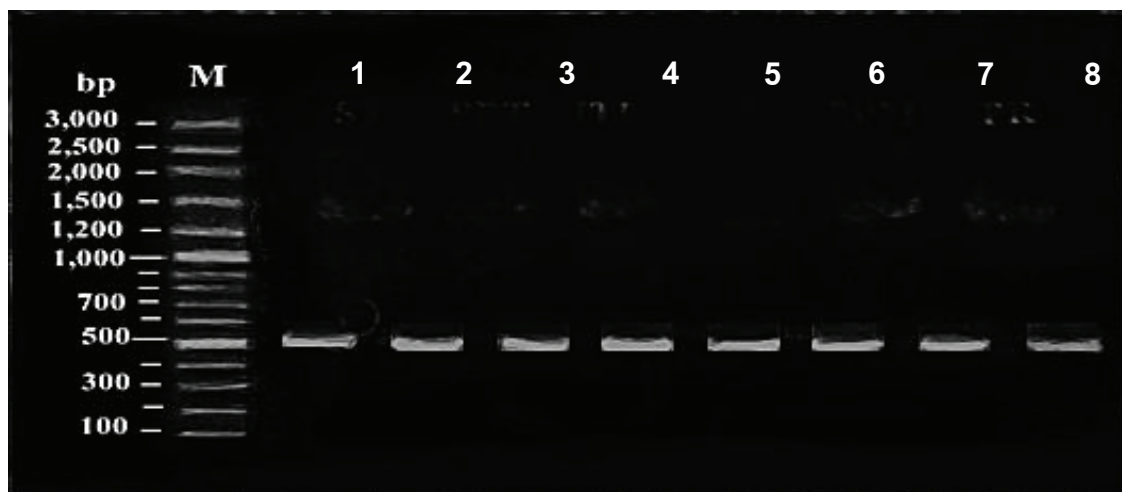


Figure 2 The PCR product of Prakitong cultivar (PKT). M: DNA marker, 1: native PKT, 2: PKT5 Treated with 50 Gy), 3: PKT10 (Treated with 100 Gy), 4: PKT15 (Treated with 150Gy), 5: PKT20 (Treated with 200 Gy), 6: PKTF1 (1st Fungal Resistant Prakitong), 7: PKTF2 (2nd Fungal Resistant Prakitong), 8: PKTM (Fungal Prakitong).

ผลการวิเคราะห์ของมะขาม 6 พันธุ์ปลูก ในด้านต่าง ๆ ได้ผล โดยสรุปดังนี้

มะขามกลุ่มประกายทอง (Figure 3)

เชื้อราไม่มีผลต่อส่วนหนึ่งของยีน *rbcl* และยีนด้านเชื้อราไม่ได้อยู่ในส่วนหนึ่งของยีน *rbcl* ช่วงที่ใช้ในการทดลองนี้ (496 คู่เบส) การฉายรังสี ทั้ง 4 ระดับ คือ 50, 100, 150 และ 200 Gy ไม่มีผลต่อยีน *rbcl* ในมะขามพันธุ์ปลูกประกายทอง ยกเว้นความเข้มของรังสี 150 Gy เพียงระดับเดียวที่ก่อให้เกิดความแตกต่างจากต้น *T.indica* ใน GenBank 5.3% และมีความแตกต่างจากทริทเมนต์อื่นๆ เกิน 5% ทั้ง 7 ทริทเมนต์ คือ ต้นปกติ (PKT1) ต้นขึ้นรา (PKTM) ต้นด้านเชื้อราต้นที่ 1 (PKTF1) ต้นด้านเชื้อราต้นที่ 2 (PKTF2) ต้นที่ได้รับรังสี 50 Gy ต้นที่ได้รับรังสี 100 Gy และต้นที่ได้รับรังสี 200 Gy

รังสีที่มีความเข้ม 50, 100 และ 200 Gy ไม่ก่อให้เกิดการกลายในมะขามพันธุ์ปลูกประกายทอง คือ มีลำดับเบสเหมือนต้นปกติ 99.19% เพียงแต่ก่อให้เกิดการแทนที่ของเบสในตำแหน่งที่ต่างกันเท่านั้น คือเกิดความผิดปกติ 2 จุด 4 จุด และ 4 จุด ตามลำดับ สำหรับความเข้ม 150 Gy ก่อให้เกิดการกลายสูงสุด 75 จุด/ตำแหน่ง คิดเป็น 15.12% ของ 496 คู่เบส ตัวอย่างแสดงผลการทำ alignment และการสร้างแผนภูมิวงศาวินิจฉัยการของยีนที่ศึกษาแสดงใน Figure 4 และ Figure 5 ตามลำดับ



Figure 3 Pots and seeds of sweet tamarind “Prakaitong cultivar”. (a) Comparison of pots and seeds between non-fungal pots with normal seeds (i) and fungal pots with normal seeds (ii). They were not difference on the peel of the pots. (b) The fungal pots from (ii), that they were gotten off the peel, but the seeds still normal.

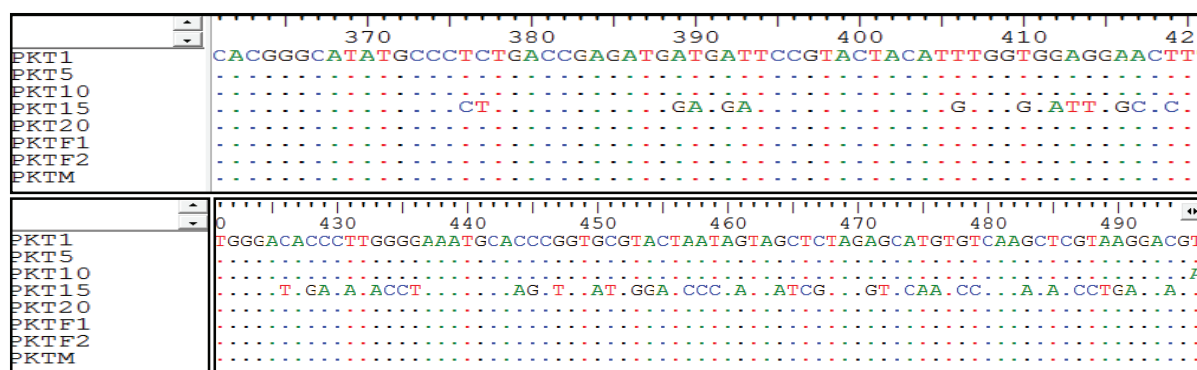


Figure 4 Features and similarities in alignment window of Prakaitong 9 treatments, present number of base 360-496 bp. While, PKT1 = Normal Prakaitong, PKT5 = Treated with 50 Gy, PKT10 = Treated with 100 Gy, PKT15 = Treated with 150 Gy, PKT20 = Treated with 200 Gy, PKTF1 = 1st Fungal Resistant Prakaitong. PKTF2 = 2nd Fungal Resistant Prakaitong, PKTM = Fungal Prakaitong. DOT(.) = view conservation by plotting identities to a standard as a dot.

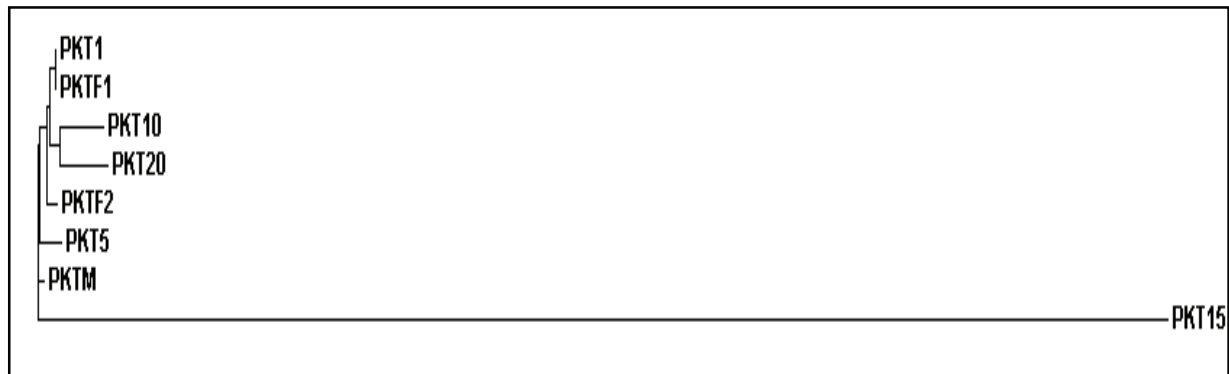


Figure 5 Phylogenetic tree of Prakaitong 8 treatments.

มะขามกลุ่มสีทอง (Figure 6)

มะขามสีทองหนักและสีทองเบามียีน *rbcl* แตกต่างกันเพียง 1.82% โดยเกิดการแทนที่ของเบส 10 จุดถือว่าเป็นพันธุ์ปลูกเดียวกันได้ และเมื่อพิจารณาจากช่วงเวลาการออกดอกหรือติดดอก โครงสร้างของดอก รูปร่างลักษณะของฝัก รสชาติ กลิ่น และสีสันของเนื้อเยื่อ ไม่แตกต่างกันมากนัก เพียงแต่พันธุ์ปลูกที่ชาวบ้านหรือเกษตรกรเรียกว่าสีทองเบาจะมีฝักสุกก่อน คือ ฝักสุกประมาณต้นเดือนมกราคม และทยอยสุกไปเรื่อยๆ สวนโน้นบ้าง สวนนี้บ้าง ไปจนถึงเดือนพฤษภาคม และเรียกต้นที่ฝักสุกช้าว่า สีทองหนัก ซึ่งเปรียบเหมือนคนเชื้อชาติเดียวกัน อยู่หมู่บ้านเดียวกัน อายุเท่ากัน บางคนเป็นสาวเร็ว มีลูกมาก บางคนเป็นสาวช้า มีลูกยาก มีลูกน้อย ฯลฯ แต่ทั้งหมดคือคนเชื้อชาติเดียวกัน มะขามสีทองจุกกับสีทองหนักและสีทองเบา มีลำดับเบสนยีน *rbcl* แตกต่างกัน คือ สีทองจุกต่างจากสีทองหนัก 6.18% และต่างจากสีทองเบา 6.38% สีทองจุกมีการแทนที่ของเบส 35 จุด คิดเป็น 6.38% ของ 549 คู่เบส เชื้อรามีผลต่อลำดับเบสนยีน *rbcl* ในมะขามหวานพันธุ์ปลูกสีทองจุกเพียงพันธุ์ปลูกเดียวเท่านั้น คือ ทำให้สีทองจุก (STJ) ต่างจากทรีทเมนต์อื่น 6.92%

รังสีทั้ง 4 ระดับคือ 50, 100, 150 และ 200 Gy มีผลต่อสีทองจุก (STJ) เพียง 3 ระดับ คือความเข้ม 50, 100 และ 150 Gy โดยก่อให้เกิดความแตกต่างของลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์สูงกว่า 5% ทั้งสิ้น โดยก่อให้เกิดความแตกต่างระหว่าง 6.38%–6.92% ยกเว้นรังสี 200 Gy ที่ก่อให้เกิดความแตกต่างในพันธุ์ปลูกสีทองจุก 4.37% ไม่เกิน 5% แต่ก็เป็นเปอร์เซ็นต์ที่ค่อนข้างสูงมาก นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความแตกต่างในทั้ง 7 ทรีทเมนต์ของพันธุ์ปลูกสีทอง โดยก่อให้เกิดความแตกต่างระหว่าง 4.37% ถึง 7.47% ตัวอย่างแสดงผลการ alignment และการสร้างแผนภูมิวงศัวัณวิวัฒนาการของยีนที่ศึกษาแสดงใน Figure 7 และ Figure 8 ตามลำดับ

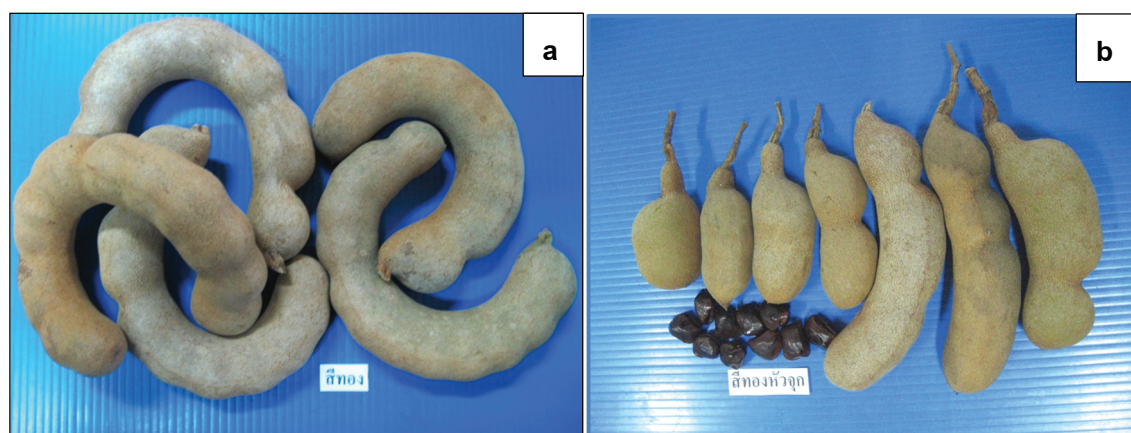


Figure 6 Pots and seeds of sweet tamarind “Seetong cultivar”. (a) Seetongnak and Seetongbow cultivar, which different in local name but similar in sequence base of *rbcl* gene, (b) Seetongjuk cultivar.

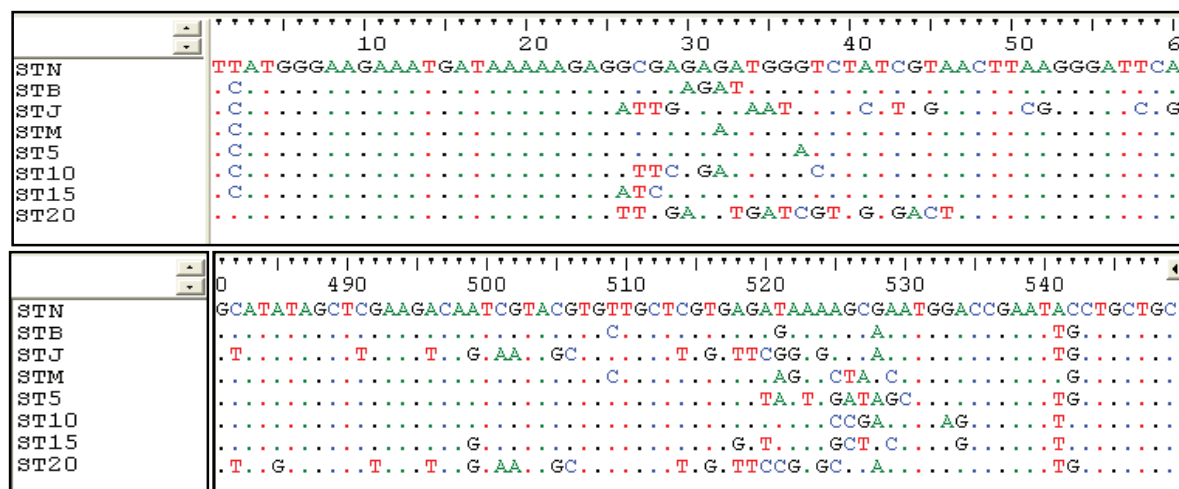


Figure 7 Features and similarities in alignment window of Seetong 8 treatments, present number of base 1–60 and 480–549 bp. While, STN = Normal Seetongnak, STB = Normal Seetongbow, STJ = Normal Seetongjuk, ST5 = Treated with 50 Gy, ST10 = Treated with 100 Gy, ST15 = Treated with 150 Gy, ST20 = Treated with 200 Gy, DOT(.) = view conservation by plotting identities to a standard as a dot.

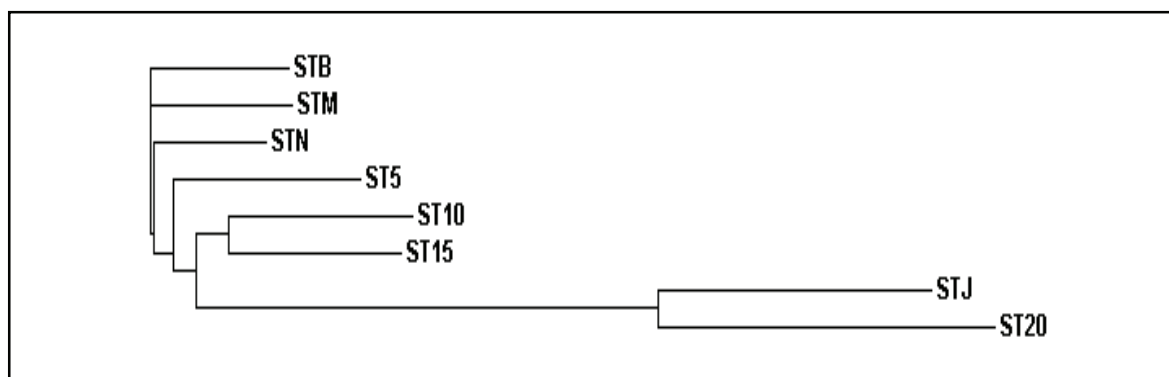


Figure 8 Phylogenetic tree of Seetong 8 treatments.

มะขามกลุ่มศรีชมภู (Figure 9)

พันธุ์ปลูกศรีชมภูทั้ง 2 พันธุ์ปลูก คือศรีชมภูปลิง (SCPP) กับศรีชมภูกลม (SCPK) พบว่า ศรีชมภูปลิงเกิดการแทนที่ของเบส 55 จุด คิดเป็น 15.85% ของ 347 คู่เบส ซึ่งถือว่าเป็นคนละพันธุ์ปลูกกัน เนื่องจากแตกต่างกันเกิน 5% ซึ่งสอดคล้องกับความเห็นของเกษตรกรที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง 2 พันธุ์ปลูกนี้ จากการสังเกตรูปร่างของฝักที่ต่างกันเพียงเล็กน้อย คือศรีชมภูปลิงจะมีลักษณะฝักแบนและสั้นกว่าศรีชมภูกลมเล็กน้อย ถ้าดูคนละครั้งและไม่ชำนาญ จะบอกความแตกต่างไม่ได้เลย มะขามทั้ง 2 พันธุ์ปลูกนี้ จะมีรสชาติหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย ไม่หวานสนิทเหมือนประกายทองและสีทอง มีกลิ่นเฉพาะตัว เมล็ดค่อนข้างกลมเล็กเมื่อเทียบกับเมล็ดพันธุ์ปลูกอื่นๆ พันธุ์ปลูกศรีชมภูกลมจะมีรสชาติเปรี้ยวมากกว่าศรีชมภูทองปลิง

รังสีทั้ง 4 ระดับ มีรังสีความเข้ม 150 Gy เพียงทรีทเมนต์เดียวที่ก่อให้เกิดการกลายในพันธุ์ปลูกศรีชมภูปลิง คือ เกิดการแทนที่ด้วยเบสถึง 180 จุด จาก 347 คู่เบส คิดเป็น 51.87%

สำหรับผลของเชื้อราที่มีต่อพันธุ์ปลูกศรีชมภู ไม่ได้ศึกษา เนื่องจากไม่พบฝักที่ขึ้นรา ซึ่งอาจเป็นเพราะเนื้อมะขามมีรสเปรี้ยวอมหวาน โดยมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภูมีกรดทาร์ทาริก 1.628 g/100g, มาลิก 1.888 g/100g และซิดิก 0.631 g/100g ในขณะที่พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ มีกรดทาร์ทาริก 18.102 g/100g, มาลิก 0.591 g/100g และซิดิก 0.217 g/100g (ปฎิภาณี, 2550) มะขามเปรี้ยวยักษ์เปรี้ยวมากจนเช็ดพื้นรับประทานสดไม่ได้ เพราะมีกรดทาร์ทาริกสูง แต่มีกรดมาลิกและกรดซิดิกน้อยกว่ามะขามศรีชมภู มะขามเปรี้ยวยักษ์ขึ้นราพบได้ทั่วไป ดังนั้นกรดที่ช่วยป้องกันการขึ้นราในเนื้อมะขามน่าจะเป็นกรดมาลิกกับกรดซิดิก ซึ่งทำให้ไม่พบมะขามศรีชมภูขึ้นรา แต่บางฝักที่พบขึ้นรานั้น่าจะเกิดจากฝนตก หรือน้ำค้างและหมอกลงจัดในช่วงฝักสุก ทำให้เชื้อราที่เจริญอยู่ในมะขามตั้งแต่ระยะเอ็มบริโอเจริญขึ้นมาเป็นฝ้าสีขาวจากเนื้อมะขาม ซึ่งเป็นสปอร์ของเชื้อราสีขาวคล้ายโรยน้ำตาลไอซิ่งบนเนื้อมะขาม เชื้อราชนิดนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pestalotiopsis sydowniana* (Bres.) (เบญจพร และ จินตนา, 2554) ตัวอย่างแสดงผลการ alignment และการสร้างแผนภูมิวงคว้านวิวัฒนาการของยีนที่ศึกษาแสดงใน Figure 10 และ Figure 11 ตามลำดับ

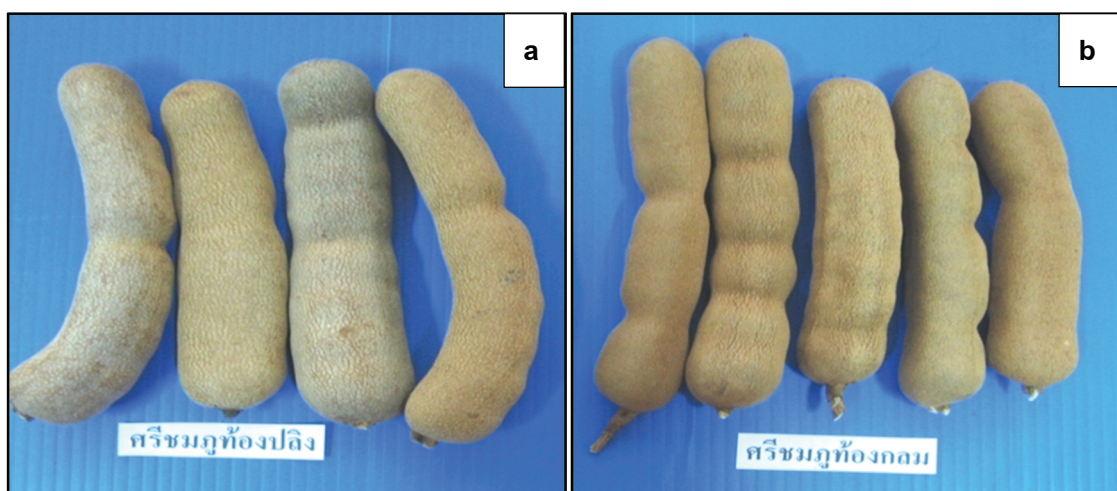


Figure 9 Sweet tamarind “Srichompoo cultivar” (a) Srichompoopling, (b) Srichompooklom.

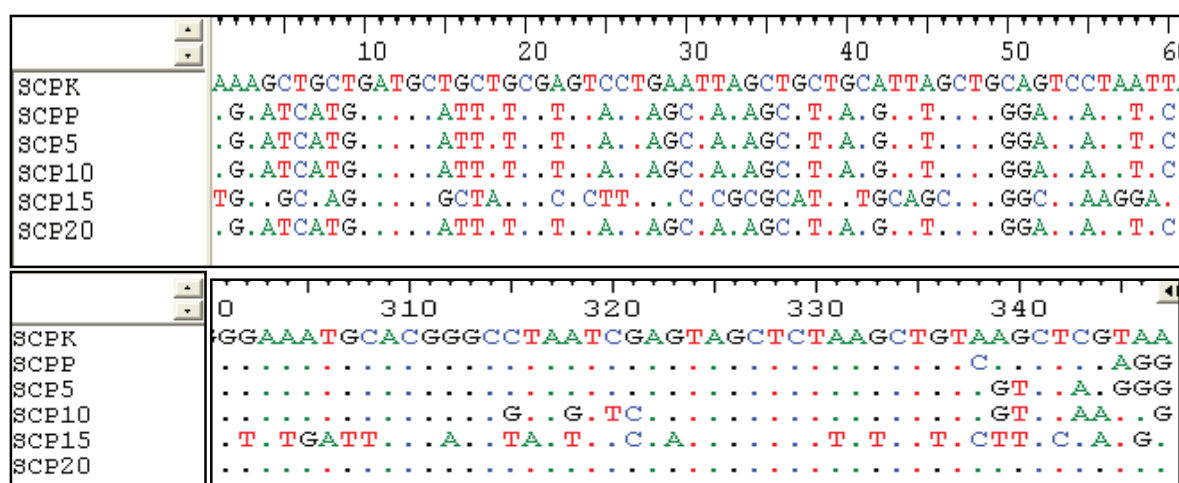


Figure 10 Features and similarities in alignment window of Srichompoo 6 treatments, present number of base 1–60 and 300–347 bp. While, SCPK = Normal Srichompooklom, SCPP = Normal Srichompoopling, SCP 5 = Treated with 50 Gy, SCP10 = Treated with 100 Gy, SCP15 = Treated with 150Gy, SCP 20 =Treated with 200 Gy, DOT(.) = view conservation by plotting identities to a standard as a dot.

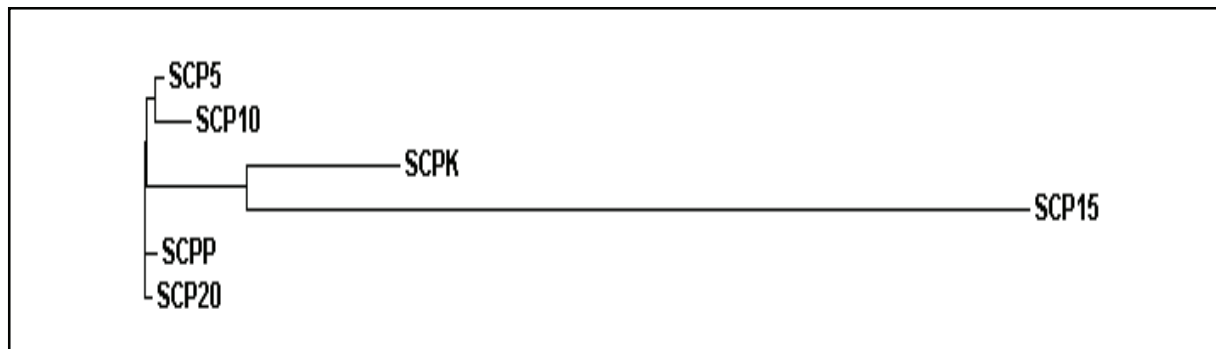


Figure 11 Phylogenetic tree of Srichompoo 6 treatments.

มะขามกลุ่มชั้นดี (Figure 12)

มะขามหวานพันธุ์ปลูกชั้นดีตามที่เกษตรกรพื้นบ้านชาวจังหวัดเพชรบูรณ์แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ ชั้นดีหยวก (KTY) และชั้นดีสร้อย (KTS) ซึ่งมีลักษณะของฝักเหมือนกัน สีส้ม และรสชาติของเนื้อฝักคล้ายกันจนแยกไม่ออก เพียงแต่ขนาด และความดกในการติดฝักต่างกัน ผลการตรวจ DNA ในยีน *rbcL* พบว่ามีความแตกต่างกันเป็นคนละพันธุ์ปลูก ซึ่งสอดคล้องกับความเห็นซึ่งเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ส่งสืบทอดกันมา และเมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นมะขาม พบว่า มีทรงพุ่มต่างกัน ลักษณะของฝักและการติดผลต่างกัน คือ ชั้นดีหยวกจะมีขนาดใหญ่กว่า และการติดฝักไม่ดกเท่าชั้นดีสร้อย ชั้นดีสร้อยจะติดฝักเป็นพวงตามลักษณะช่อดอกไม่เป็นฝักเดี่ยวๆ เหมือนชั้นดีหยวก

เชื้อราไม่มีผลต่อชั้นดีหยวก (KTY) แต่มีผลต่อชั้นดีสร้อย (KTS) คือ มีลำดับเบสเหมือนกับชั้นดีสร้อยที่ขึ้นรา (KTSM) 88.60% ต่างกัน 11.4% ถือว่าเชื้อรามีผลทำให้ชั้นดีสร้อยเกิดการกลาย และเมื่อเทียบลำดับเบสของยีน *rbcL* ในชั้นดีสร้อยที่ได้รับเชื้อรากับลำดับเบสของยีน *rbcL* ในชั้นดีหยวกปกติ พบว่าต่างกันเพียง 4 จุด คือ ตำแหน่งที่ 29, 30, 32 และ 36 โดยชั้นดีสร้อยจะถูกแทนที่ด้วยเบส G = Guanine, A = Adenine, G = Guanine และ T = Thymine ตามลำดับ ซึ่งการต่างกันเพียง 4 จุด คิดเป็น 0.82% ถือว่าเป็นพันธุ์ปลูกเดียวกัน แสดงว่าทั้ง 2 พันธุ์ปลูกนี้ คือ ชั้นดีหยวกกับชั้นดีสร้อยเดิมคือพันธุ์ปลูกเดียวกัน แต่มีบางสิ่งบางอย่างเช่นเชื้อรา หรืออาจเป็นรังสี ที่ก่อให้เกิดการกลายขึ้นจนเป็น 2 พันธุ์ปลูกดังกล่าว ซึ่งไม่ทราบว่าเป็นต้นตระกูลของใคร แต่ในปัจจุบันชั้นดีหยวกเป็นพันธุ์เศรษฐกิจที่น่าสนับสนุนให้เกษตรกรปลูก เนื่องจากมีฝักใหญ่ รสชาติหวานหอม และไม่เป็นเชื้อรา

รังสีทั้ง 4 ระดับ ไม่มีผลต่อการกลายของพันธุ์ปลูกชั้นดีหยวก แต่มีผลต่อพันธุ์ปลูกชั้นดีสร้อย (KTS) โดยจะก่อให้เกิดความแตกต่าง 9.80%, 9.80%, 10.41% และ 10.20% ตามลำดับ ถือว่ารังสีทุกระดับมีผลต่อการกลายในมะขามชั้นดีสร้อย โดยที่ความเข้มของรังสี 150 Gy ก่อให้เกิดความแตกต่างสูงสุด 10.41% นอกจากนี้ รังสีทั้ง 4 ระดับ ไม่มีผลต่อการกลายในมะขามชั้นดีหยวกที่ขึ้นรา และรังสีทุกระดับไม่มีผลต่อชั้นดีสร้อยที่ขึ้นรา (KTSM) เช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะชั้นดีสร้อยที่ขึ้นราได้เกิดการกลายเปลี่ยนเป็นชั้นดีหยวก ซึ่งมีลำดับต่างกันเพียง 4 จุด รังสีจึงไม่มีผลต่อชั้นดีสร้อยที่ขึ้นราเช่นเดียวกับการไม่มีผลต่อชั้นดีหยวกปกติและชั้นดีหยวกที่ขึ้นรา ตัวอย่างแสดงผลการ alignment และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของยีนที่ศึกษาแสดงใน Figure 13 และ Figure 14 ตามลำดับ

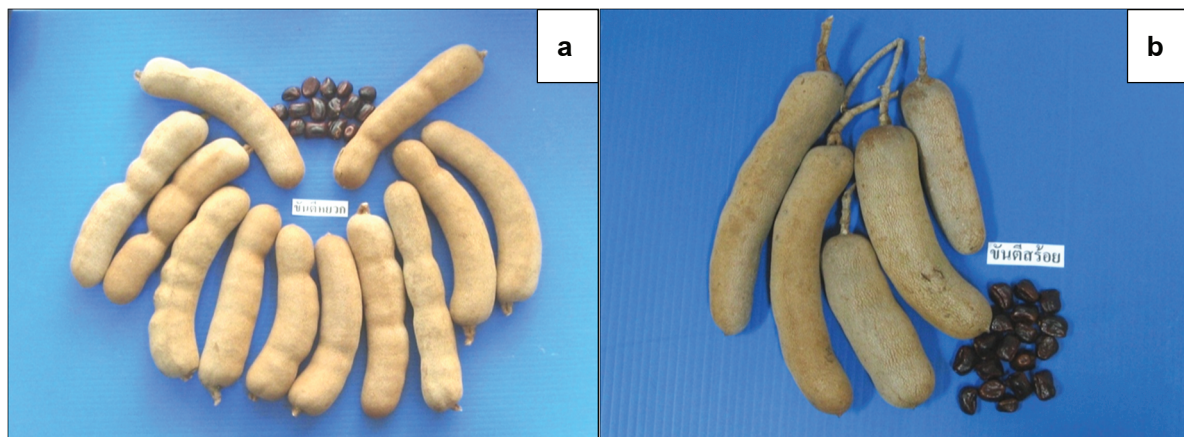


Figure 12 Sweet tamarind “Kunteeyouk cultivar” (a), and Kunteesoy cultivar (b).

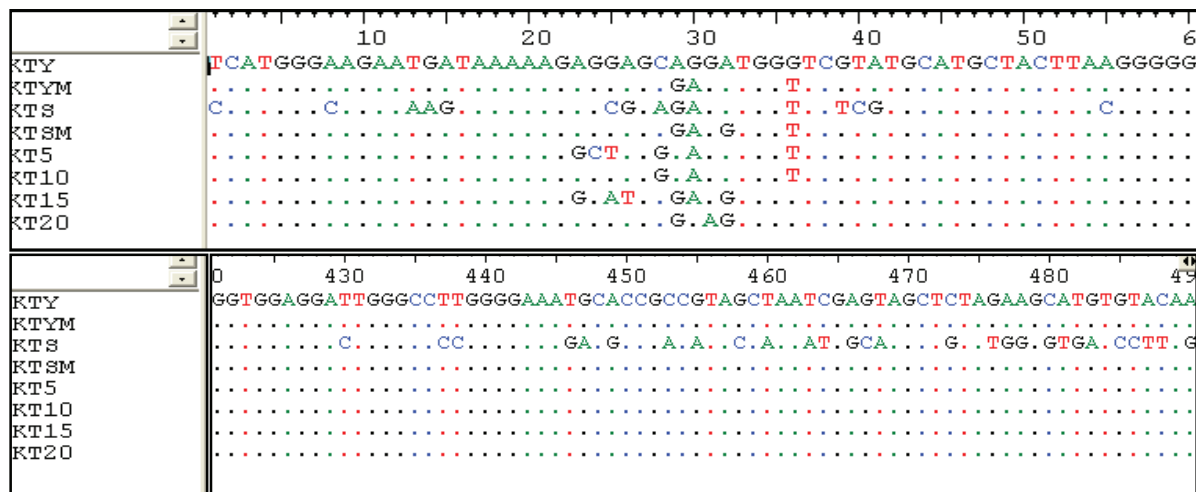


Figure 13 Features and similarities in alignment window of Kunttee Cultivar 8 treatments, present number of base 1–60 and 400–490 bp. While, KTY = Normal Kunteeyouk, KTYM = Fungal Kunteeyouk, KTS = Normal Kunteesoy, KTSM = Fungal Kunteesoy, KT5 =Treated with 50Gy, KT10 =Treatedwith100Gy, KT15 = Treated with150Gy, KT20 = Treated with 200 Gy, DOT(.) = view conservation by plotting identities to a standard as a dot.



Figure 14 Phylogenetic tree of Kunttee 8 treatments.

มะขามกลุ่มเปรี้ยวพื้นเมือง (Figure 15)

เชื่อว่าไม่มีผลก่อให้เกิดการกลายในมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง (PPM) และรังสีทั้ง 4 ระดับ ไม่มีผลต่อการกลายของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง ยกเว้นรังสีระดับ 150 Gy เพียงทรีทเมนต์เดียว ที่ก่อให้เกิดความแตกต่างสูงสุด 16.87% สำหรับผลของรังสีทั้ง 4 ระดับต่อพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองที่ขึ้นรา (PPMM) จะก่อให้เกิดการกลายทุกทรีทเมนต์โดยที่ความเข้มของรังสี 200 Gy ก่อให้เกิดความแตกต่างสูงสุด 12.40% ถือว่ารังสีทุกระดับมีผลต่อการกลายของมะขามทั้งพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง (PPM) และเปรี้ยวพื้นเมืองที่ขึ้นรา (PPMM) ตัวอย่างแสดงผลการ alignment และการสร้างแผนภูมิวงศาวินิจฉัยการของยีนที่ศึกษาแสดงใน Figure 16 และ Figure 17 ตามลำดับ



Figure 15 Sour tamarind "Preao-puen-muang cultivar".

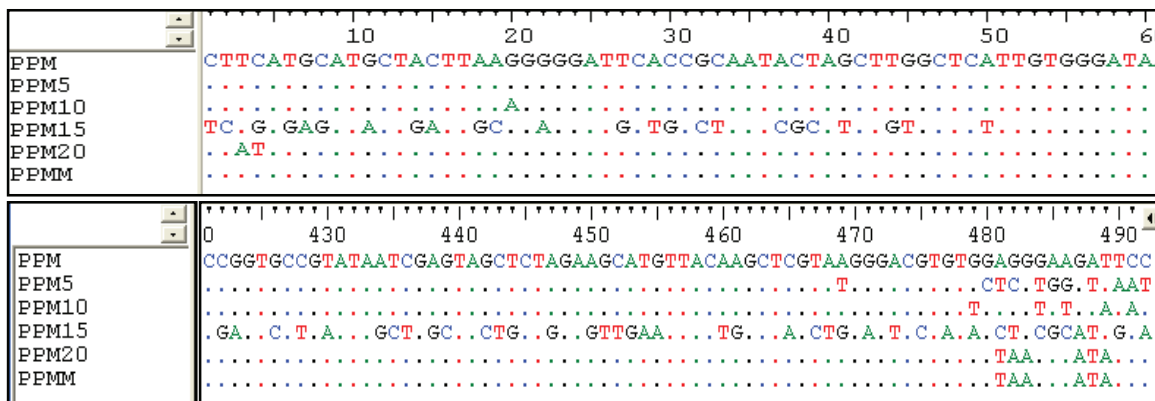


Figure 16 Features and similarities in alignment window of Preao-puen-muang cultivar 6 treatments, present number of base 1–60 and 420–492 bp. While, PPM = Normal Preao-puen-muang, PPMM = Fungal Preao-puen-muang, PPM5 =Treated with 50Gy, PPM10 =Treated with100Gy, PPM15 =Treated with150Gy, PPM20=Treated with 200 Gy, DOT(.) = view conservation by plotting identities to a standard as a dot.

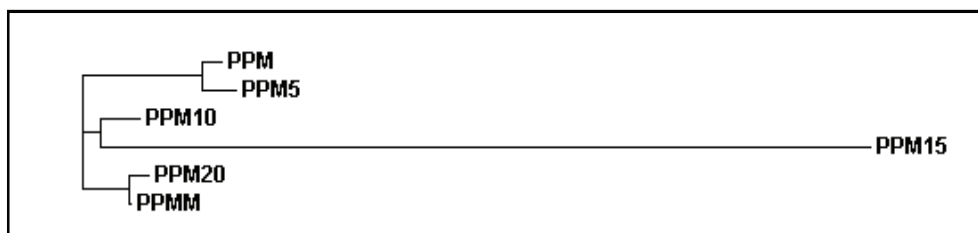


Figure 17 Phylogenetic tree of Preao-puen-muang cultivar 6 treatments.

มะขามกลุ่มเปรี้ยวยักษ์ (Figure 18)

เชื้อราทำให้เกิดการกลายในมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ (PRY) นอกจากนี้ ยังพบว่ารังสีทั้ง 4 ระดับ มีผลต่อการกลายของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ โดยที่ความเข้มของรังสี 200 Gy ก่อให้เกิดความแตกต่างสูงสุด 9.20 % สำหรับผลของรังสีทั้ง 4 ระดับต่อพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ที่ขึ้นรา (PRYM) พบว่ารังสีทุกระดับไม่มีผลต่อการกลายของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ที่ติดเชื้อรา ตัวอย่างแสดงผลการ alignment และการสร้างแผนภูมิวงศาคานวิวัฒนาการของยีนที่ศึกษาแสดงใน Figure 19 และ Figure 20 ตามลำดับ



Figure 18 Sour tamarind “Preao-yak cultivar”.

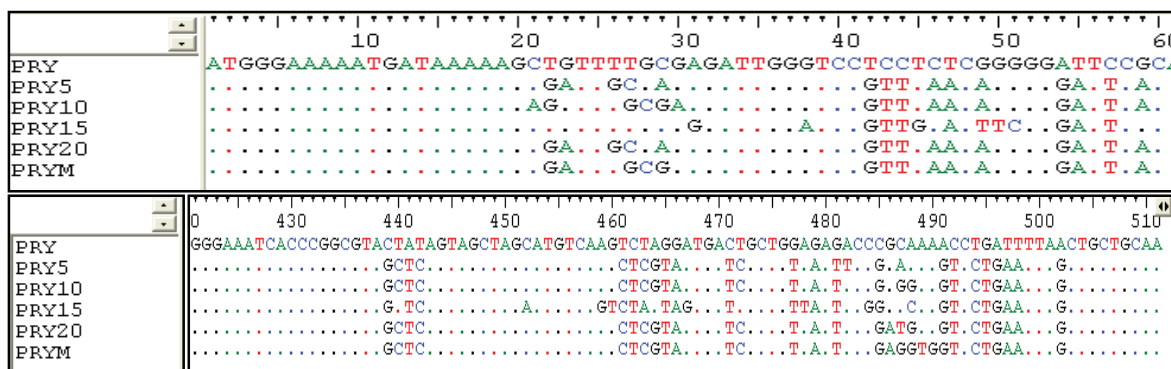


Figure 19 Features and similarities in alignment window of Preao-Yak Cultivar 6 treatments, present number of base 1–60 and 420–510 bp. While, PRY = Normal Preao-Yak, PRYM = Fungal Preao-Yak, PRY5 = Treated with 50Gy, PRY10 =Treatedwith100Gy, PRY15 =Treated with150Gy, PRY20=Treated with 200 Gy, DOT(.) = view conservation by plotting identities to a standard as a dot.

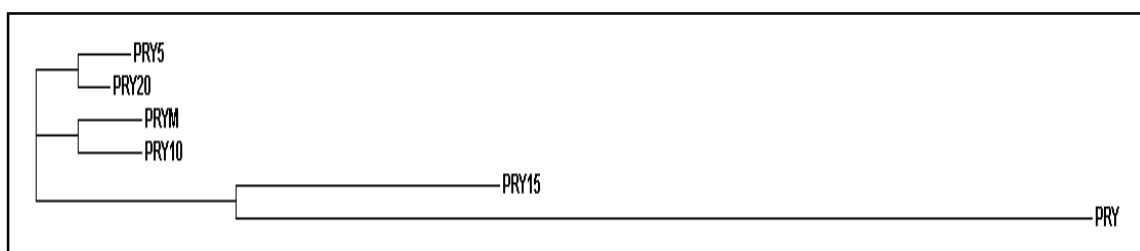


Figure 20 Phylogenetic Tree of Preao-Yak cultivar 6 treatments.

ส่วนผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบระหว่างต้นมะขามกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับการฉายรังสีที่มีอายุ 3 ปี ดังแสดงใน Figure 21 พบว่าทุกพันธุ์ปลูกของกลุ่มควบคุมยังมีลักษณะที่เป็นระยะกำลังเจริญเติบโต (Juvenile stage) คือมีลักษณะลำต้นเป็นทรงกระบอกมีความสูงเฉลี่ย 130.4 Cm/ต้น มีการแตกกิ่งก้านสาขาน้อยมาก หรือยังไม่แตกกิ่ง เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น 0.85 Cm/ต้น มีใบประกอบเฉลี่ย 72 ใบ/ต้น ใบย่อยกว้างเฉลี่ย 0.54 Cm/ใบ ใบย่อยยาวเฉลี่ย 1.25 Cm/ใบ ส่วนกลุ่มที่ได้รับการฉายรังสี 150 Gy ทุกพันธุ์ปลูก เจริญเติบโตเร็วกว่า มีลักษณะเป็นทรงพุ่ม มีการแตกกิ่งก้านสาขามาก แต่ต้นเตี้ยคือมีความสูงเฉลี่ย 62.5 Cm มีการแตกกิ่งก้านสาขามาก เป็นทรงพุ่ม มีใบประกอบเฉลี่ย 155 ใบ/ต้น ใบย่อยกว้างเฉลี่ย 1.22 Cm/ใบ ใบย่อยยาวเฉลี่ย 2.05 Cm/ใบ ซึ่งเป็นลักษณะของต้นที่เตรียมจะมีการออกดอกออกผล (Pre-reproductive stage) ลักษณะของต้นมะขามที่ได้รับการฉายรังสีแม้จะมีลักษณะแคระแต่ไม่แกรน มีใบมาก และมีใบย่อยกว้างยาวใหญ่กว่าปกติเช่นนี้ น่าจะให้ดอกผลเร็ว หรือมีระยะฝักสุกแตกต่างไปจากต้นปกติ อาจเร็วกว่าหรือช้ากว่าเดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ที่มีสภาวะอากาศเปลี่ยนแปลง เนื่องจากภาวะโลกร้อน ทำให้ไม่ติดเชืรา และการมีต้นเตี้ยทำให้เก็บผลผลิตได้ง่าย ดูแลรักษาง่าย ป้องกันมิให้ติดเชืราได้ง่าย ไม่ต้องระวังผลสุกตกลงมาแตก เป็นการลดการติดเชืรา

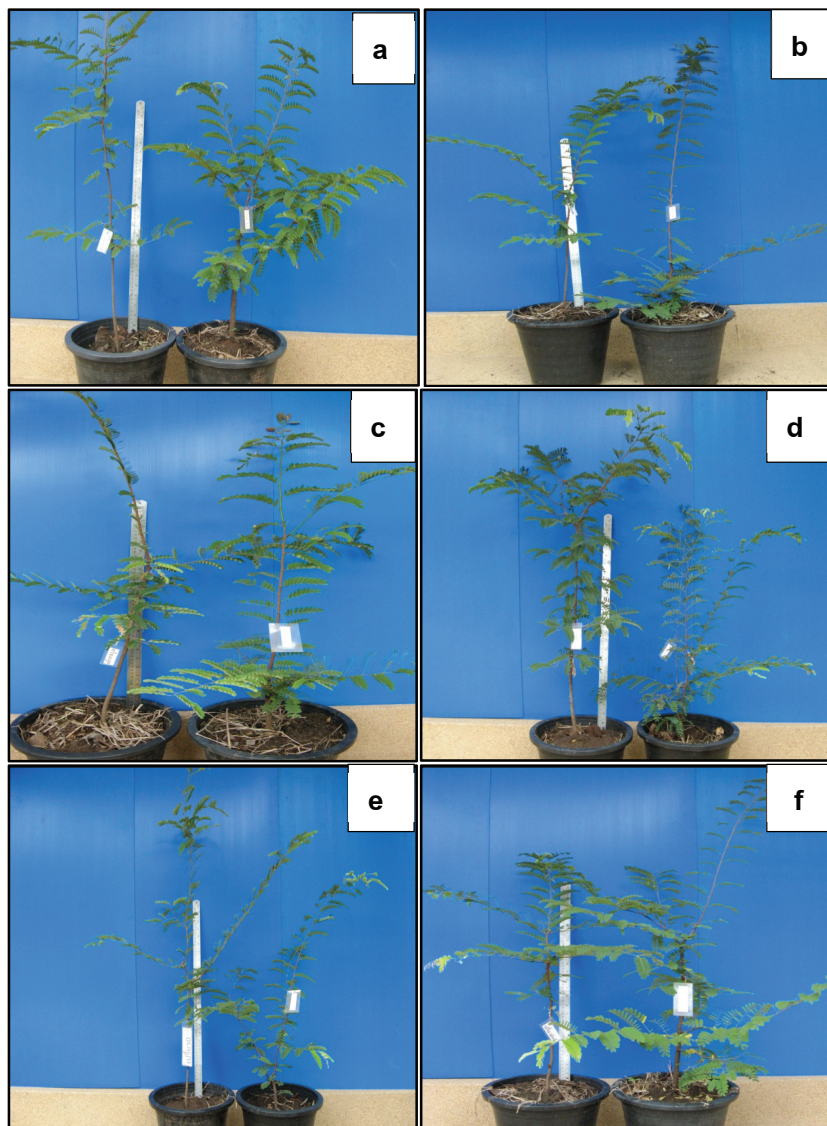


Figure 21 The comparisons of non-irradiated plants (left) and irradiated plants (right) of 6 cultivars; Prakitong (a), Seetong (b), Srichompoo (c), kuntee (d), Preao-puen-muang (e) and Preao-yak (f).

สรุปผลการทดลอง

การปรับปรุงพันธุ์มะขามซึ่งเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ เจริญเติบโตช้า และมีอายุยาวนานนับเป็นร้อยปี ซึ่งปัจจุบันมะขามหวานมีปัญหาติดเชื้อมากขึ้นเนื่องจากภูมิอากาศของโลกเปลี่ยนแปลง งานวิจัยนี้สามารถปรับปรุงพันธุ์ให้มีระยะการออกดอกและติดฝักเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย โดยการฉายรังสีแกมมา 150 Gy ทำให้ได้ต้นใหม่พันธุ์ปลูกเดิมที่มีต้นเตี้ย แข็งแรงเก็บผลผลิตง่าย ลดการติดเชื้อมากขึ้นหรือไม่ติดเชื้อมากขึ้น และสามารถใช้อยีน *rbcL* เป็นเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ในการตรวจสอบพันธุ์ปลูกและการกลายของมะขามได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของปฏิภาณ ชันธโคก, 2550 ซึ่งศึกษาโดยใช้อยีน *rbcL* เช่นเดียวกับสุนิดา และคณะ, 2551 แต่ศึกษาในยีน ITS

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประเภทผ่านความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2555

เอกสารอ้างอิง

- เบญจพร ศรีสุวรรณ มาศ จิตติยา กองเก็น ถนอม บุตโตโคตร (2544) การเติบโตและการเจริญของเนื้อเยื่อต้นอ่อนมะขามหวานพันธุ์ประกายทองด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์ จังหวัดเพชรบูรณ์
- เบญจพร ศรีสุวรรณ มาศ (2545) การเติบโตและการเจริญของเนื้อเยื่อต้นอ่อนมะขามหวาน 4 พันธุ์ปลูกในหลอดแก้ว ทน สันนิษฐานการทำวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์ ประจำปีการศึกษา 2544 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์
- เบญจพร ศรีสุวรรณ มาศ จินตนา สนามชัยสกุล (2552) ศึกษาช่วงเวลาของการติดเชื้อมะขามและผลการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา สมุนไพรหมัก สารสกัดสะเดา และน้ำส้มควันไม้ในการยับยั้งเชื้อราจากมะขามหวาน (พันธุ์ประกายทอง) ในห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทนงบประมาณแผ่นดินผ่าน วช. ประจำปี 2552
- เบญจพร ศรีสุวรรณ มาศ จินตนา สนามชัยสกุล (2554) การจัดการเชื้อราแบบผสมผสานในสวนมะขามหวานของเกษตรกรเครือข่ายวิสาหกิจชุมชนมะขามหวาน จังหวัดเพชรบูรณ์ ทนงบประมาณแผ่นดินผ่าน วช. ประจำปี 2554
- ปฏิภาณ ชันธโคก (2550) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ การประเมินทางเคมี ของมะขามบางสายพันธุ์ ที่มีฤทธิ์ เป็นยาระบาย ที่ดีวิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- สุนิดา อัญจิราเวโรจน์ อัจฉริยา รังษิรุจิ รัชช ดอนสกุล (2551) การโอโตไพบีและชีววิทยาระดับโมเลกุลของมะขามหวาน (พืชสกุลมะขาม) ในจังหวัดเพชรบูรณ์ วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 24: 183–198.
- Benchaporn S, Snamchaiskul C, Piamalang T, Srimuang V, Puttachaloin B, Juntaramungkorn N (2012) Phylogenetic tree reconstruction and single nucleotide analysis of *rbcL* gene in 10 varieties of Thailand *Tamarindus indica* L. The International Conference “The Excellence in Teacher Education and Research Innovation” On the Occasion of HM’s 85th Birthday Anniversary. 24–8 December, 2012. At the Royal Orchid Sheraton. Bangkok. Thailand.
- Dmitriev A, Shevchenko O, Poloschuk V, Guscha N (2009) Effects of low dose chronic radiation and heavy metals on plants and their fungal and virus infections Data. Science Journal 8: br49–br66.
- Melki M, Marouani A (2010) Effects of gamma rays irradiation on seed germination and growth of hard wheat. Environ Chem Lett 8: 307–310.