**เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกสายพันธุ์หอมแดงจากแหล่งปลูกต่างๆ**

นางสาวรัชนี ศิริยาน[๑/] นางสาวศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล[๒/] นางจิรภา ออสติน[๑/]
นางสาวจันทนา โชคพาชื่น[๑/] นางสาวเสาวนี เขตสกุล[๑/] ว่าที่ร้อยตรีอรรถพล รุกขพันธ์[๑/]

**บทคัดย่อ**

หอมแดงมีการปลูกมากในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยแหล่งปลูกหอมแดงที่มีชื่อเสียงมากที่สุดคือ จังหวัดศรีสะเกษ ซึ่งหอมแดงมีลักษณะเด่นคือ เปลือกนอกหนาสีม่วงแดง กลิ่นฉุน แต่ยังไม่มีการศึกษาความแตกต่างด้านพันธุกรรมของหอมแดงจากจังหวัดศรีสะเกษและหอมแดงจากแหล่งปลูกอื่นๆ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกสายพันธุ์หอมแดงศรีสะเกษออกจากหอมแดงสายพันธุ์อื่นๆ โดยเก็บตัวอย่างหอมแดงจากแหล่งปลูกในภาคเหนือได้แก่ เชียงใหม่ ลำพูน อุตรดิตถ์และสุโขทัย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ นครราชสีมาและศรีสะเกษ จำนวน ๑๒ ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นจากใบอ่อน และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Simple sequence repeat (SSR) จำนวน ๑๖ ไพรเมอร์ ผลการศึกษาพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ๑๒ ไพรเมอร์ และมี ๘ ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันของสายพันธุ์หอมแดง หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์และจัดกลุ่ม แล้วสร้างเดนโดรแกรมเพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอมแดง สามารถแบ่งหอมแดงได้ ๓ กลุ่ม กลุ่มที่ ๑ ประกอบด้วยหอมแดงจาก ลำพูน อุตรดิตถ์ และหอมแดงจากอินโดนีเซีย กลุ่มที่ ๒ มีความหลากหลายของสายพันธุ์มาก ประกอบด้วยหอมแดงจากศรีสะเกษ อุตรดิตถ์ ลำพูน สุโขทัย และเชียงใหม่ ส่วนกลุ่มที่ ๓ เป็นหอมแดงจากนครราชสีมา โดยพบว่าหอมแดงสายพันธุ์นี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากหอมแดงสายพันธุ์อื่นๆด้วย

---

[๑/]ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ ต.หนองไผ่ อ.เมือง จ.ศรีสะเกษ
[๒/]ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ต.ศิลา อ.เมือง จ.ขอนแก่น

## คำนำ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในหอมแดงโดยวิธี Random amplified polymorphism DNA (RAPD) เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลทางพันธุกรรมมาก่อน แต่มีปัญหาในการทำซ้ำ อาจให้ผลไม่เหมือนเดิม ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Microsatellites หรือ Simple sequence repeat (SSR) หรือ Short tandem repeat (STR) คือ ลำดับเบสซ้ำสั้นๆ กระจายทั่ว eukaryotic genome เป็นเครื่องหมายที่เป็นที่นิยมมาก เนื่องจากตำแหน่งของ SSR มีความแปรปรวนมากในจำนวนซ้ำระหว่างสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวในชนิดเดียวกัน microsatellite เป็น codominant marker พบปริมาณมากและมีความหลากหลายของ allele การประเมินความแปรปรวนใช้ขนาดที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้คู่ของไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสขนาบข้าง (flanking primer) ของตำแหน่ง SSR เนื่องจากสามารถทำซ้ำและให้ผลเหมือนกันในหลายๆห้องปฏิบัติการ ทำให้ข้อมูลที่ได้มีความแม่นยำ (Agarwal et al., ๒๐๐๘) การศึกษานี้เพื่อจำแนกสายพันธุ์หอมแดงศรีสะเกษจากหอมแดงสายพันธุ์อื่นๆ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Microsatellite

นอกจากเครื่องหมายโมเลกุล Microsatellite แล้วยังมีการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นๆ Mazuzaki et al. (๒๐๐๘) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของสกุล Allium โดยใช้เทคนิค RAPD ในหอมชนิดต่างๆ ๖ ชนิด ได้แก่ Japanese bunching onion (*A. fistulosum*) จำนวน ๒ สายพันธุ์ หอมแดง (shallot, *A. cepa* L. Common group Aggregatum) และหอมสายพันธุ์ป่าที่มีความใกล้ชิดกัน ๔ สายพันธุ์ และได้คัดเลือก RAPD marker จำนวน ๘ คู่ เปลี่ยนเป็น SCAR marker โดยการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้นออกแบบไพรเมอร์ขนาด ๒๔ นิวคลีโอไทด์ จำนวน ๘ คู่ ผลการศึกษาพบว่า ๕ SCAR markers สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับหอมแดง และไม่พบใน Japanese bunching onion

## วิธีการดำเนินการ

### อุปกรณ์

๑. หอมแดงจากแหล่งปลูกต่างๆที่สำคัญของประเทศไทย ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

๒. สารเคมีในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ dNTP, Taq DNA polymerase, agarose gel, primers, boric acid ฯลฯ

๓. เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ เครื่อง PCR, gel electrophoresis, water baht, เครื่องปั่นเหวี่ยง

### วิธีการ

**๑. การเตรียมต้นกล้า**

เพาะหอมแดงจากแหล่งปลูกต่างๆ (ตารางที่ ๑) ในกระถางพลาสติกขนาด ๑๒ นิ้วโดยปลูกพันธุ์ละ ๗ หัวต่อกระถาง รดน้ำ ๒ วัน ต่อ ๑ ครั้ง จนกระทั่งต้นกล้ามีอายุประมาณ ๒๐ วัน ตัดใบอ่อนของแต่ละสายพันธุ์ไปสกัดดีเอ็นเอ

ตารางที่ ๑ สายพันธุ์หอมแดงที่ใช้ในการศึกษา

| ลำดับที่ | พันธุ์ | แหล่งที่มา |
|---|---|---|
| ๑ | sh๕๔๐๐๖ | ลำพูน |
| ๒ | sh๕๕๐๐๙ | อุตรดิตถ์ |
| ๓ | sh๕๕๐๑๐ | ศรีสะเกษ |
| ๔ | sh๕๕๐๑๑ | นครราชสีมา |
| ๕ | sh๕๕๐๑๓ | ศรีสะเกษ |
| ๖ | sh๕๕๐๑๔ | ศรีสะเกษ |
| ๗ | sh๕๕๐๑๕ | ศรีสะเกษ |
| ๘ | sh๕๕๐๑๘ | ลำพูน |
| ๙ | sh๕๕๐๒๐ | อุตรดิตถ์ |
| ๑๐ | sh๕๕๐๒๓ | สุโขทัย |
| ๑๑ | sh๕๕๐๒๔ | เชียงใหม่ |
| ๑๒ | sh๕๕๐๒๕ | หอมแดงอินโดนีเซีย |

**๒. วิธีการสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)**

การสกัดดีเอ็นเออ้างอิงตามวิธีการของ Doyle & Doyle (๑๙๘๗) โดยชั่งตัวอย่างใบหอมแดงหนัก ๐.๒ กรัม บดในโกร่งปลอดเชื้อ โดยเติมไนโตรเจนเหลว บดจนละเอียด เติม extraction buffer ๑,๐๐๐ มิลลิลิตร และเติม ๒-mercaptoethanal ปริมาตร ๑ ไมโครลิตร แล้วเทลงใน microcentrifuge tube ขนาด ๑.๕ มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ ๖๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐-๖๐ นาที โดยพลิกหลอดไปมา จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (๒๔:๑) จนเต็มหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๓,๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๐ นาที จากนั้นดูดของเหลวด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol ที่เย็นจัด ๐.๗ เท่าของปริมาตรเดิม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -๒๐ องศาเซลเซียส ประมาณ ๓๐ นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๓,๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๐ นาที เทส่วนบนทิ้งไป แล้วเติมเอทานอล ๗๕% ที่มี ammonium acetate ๑๐ มิลลิโมลาร์ ปริมาตร ๔๐๐ ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาให้ตะกอนละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๓๐ นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๓,๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๐ นาที เทสารละลายทิ้งคว่ำหลอดทิ้งไว้ ๒-๓ ชั่วโมง หรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะแห้ง เติม TE buffer ปริมาตร ๔๐ไมโครลิตร และ RNase A (๑๐ mg/ml) ปริมาตร ๔ ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๓๐ นาที จากนั้นเก็บดีเอ็นเอไว้ในตู้เย็น -๒๐ องศาเซลเซียส

**๓. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของของดีเอ็นเอ**

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ โดยวิธีการเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (lambda DNA) ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟริซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า ๕๐ โวลต์ เป็นเวลา ๑ ชั่วโมง นำไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น ๐.๑ µg/ml เป็นเวลา ๓๐ นาที แล้วนำมาตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator) แล้วเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

**๔. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ**

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอหอมแดงด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน ๑๖ ไพรเมอร์ (ตารางที่ ๑) มีส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จำนวน ๒๐ ไมโครลิตร โดยดัดแปลงจาก Soegianto et al. (๒๐๑๑ )และ Araki et al. (๒๐๑๐) ดังนี้ ดีเอ็นเอ ๒๐ นาโนกรัม, ๑X PCR buffer, ๑.๕ mM $MgCl_2$, ๐.๒ mM dNTP, ๑ μM forward primer, ๑ μM reverse primer, ๐.๗๕ U *Taq* DNA polymerase นำส่วนประกอบต่างๆ ผสมให้เข้ากันแล้วใส่ในหลอดพีซีอาร์ขนาด ๐.๒ มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Biometra รุ่น T Gradient จากประเทศเยอรมัน) มีโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นที่ ๑ Predenaturation อุณหภูมิ ๙๕°C เป็นเวลา ๕ นาที จำนวน ๑ รอบ ขั้นที่ ๒ Denaturation อุณหภูมิ ๙๕°C เป็นเวลา ๓๐ วินาที ขั้นที่ ๓ Annealing อุณหภูมิตามความเหมาะสมของไพรเมอร์ในตารางที่ ๑ เป็นเวลา ๓๐ วินาที ขั้นที่ ๔ Extension อุณหภูมิ ๗๒°C เป็นเวลา ๑ นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ ๒-๔ จำนวน ๓๕ รอบ ขั้นที่ ๕ Final Extension อุณหภูมิ ๗๒°C เป็นเวลา ๗ นาที จำนวน ๑ รอบ เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด นำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นแป้าหมาย มาตรวจสอบผลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซีส ที่ความเข้มข้น ๔.๕% ย้อมเจลด้วยสีย้อมซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) แล้วนำไปวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นเจล เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน ทำการบันทึกตำแหน่งแถบดีเอ็นเอให้ครบทุกตำแหน่งในแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้ หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่า similarity coefficient โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc ๒.๑ วิเคราะห์การจัดกลุ่ม แล้วสร้างเดนโดรแกรมเพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์หอมแดงที่นำมาศึกษา

ตารางที่ ๒ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน ๑๖ ไพรเมอร์ที่ใช้กับตัวอย่างหอมแดง

| Loci | Primer sequence (๕'-๓') | $T_a$ (°C) |
|---|---|---|
| AFS๐๑๕ | F: ATCTCACTGTCCTTGTACCTGAAAG | ๖๐ |
| | R: CATCTTGACTTTGTGATATTTGTGC | |
| ACE๐๒๐ | F: AGTGGTCATGGTTGTCTTGCTT | ๕๕ |
| | R: TGCACAAGTACACAGCGACAAAC | |
| CF๔๔๕๙๙๖ | F: GCCAACAGTTTTCGTAAGTTGA | ๕๘ |
| | R: ATTCTCTTCGGCTTTCGTGA | |
| AFAT๑๓H๑๐ | F: CGGATTGTGTGTCTTGATTACTTGTG | ๖๐ |
| | R: GGCTGATTCAACCAGAAGGCTAAG | |
| CF๔๕๐๐๐๘ | F: TTCCCAACAAACGTTCATCA | ๕๕ |
| | R: GTGAAGGGAGAGCAGTGGAG | |
| AFRT๐๘C๐๒ | F: CATCCTTAACTTCAATTCTATGGGG | ๕๙ |
| | R: TTTATCCAAATTACGGCTTTGGGC | |
| AFA๐๖A๐๘ | F: CCTCAGGAGAGGGGTATTTTGGTT | ๖๒ |
| | R: CTTGGGAAAGGCTTCTCTTGAGGT | |
| AFA๑๑E๑๒ | F:GCTGGACGGACTTCTGTATGCTTT | ๖๐ |
| | R: CGACCTTAAGTCATAAACGTGGTAA | |

| | | |
|---|---|---|
| AMS๑๔ | F: CCCCTGAGTAAATTCAAAATCC | ๕๕ |
| | R: TCCTTAGTATAATTTCGGGGTAAC | |
| AFA๑๑H๑๐ | F: ATCTTTTGTGTGTTGTCACCGCAT | ๕๕ |
| | R: GCAAAGTGCAAAGCAACTCAACAT | |
| AFA๐๒H๐๘ | F: AGATCTTGGATAGTTATTAAAGTAGTTCCAGTAGA | ๖๐ |
| | R: GGGCTGAAATATTATGTGGGTTTG | |
| AFA๑๕E๐๘ | F: TGAGAAGTGTGTGTAAGGCAAGGC | ๕๕ |
| | R: GCCCCAAAGTCATACTGCTGGTAG | |
| AFS๐๙๖ | F: CCAAGTATTGGGTGGTCAAAGTACA | ๕๕ |
| | R: TCACAAGAGAGTGTGTGTGTGTGTG | |
| AFA๐๘G๑๐ | F: TGAGCATGCCAGAAAATCCACTAA | ๕๕ |
| | R: CGAGAATGAGGATATGAGATTCGAGTG | |
| CF๔๕๑๒๒๖ | F:ACTTTCCCCCTCCAACATTC | ๖๐ |
| | R:TAGCACAAGGAGGGTCGAGT | |
| CF๔๓๘๐๖๓ | F:TGGGTGAGTGTTCATTTCCA | ๕๕ |
| | R:CCAAGCCGTGACAAACTACA | |

**เวลาและสถานที่**

สถานที่ดำเนินงาน ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม ๒๕๕๔ สิ้นสุด กันยายน ๒๕๕๖

**ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง**

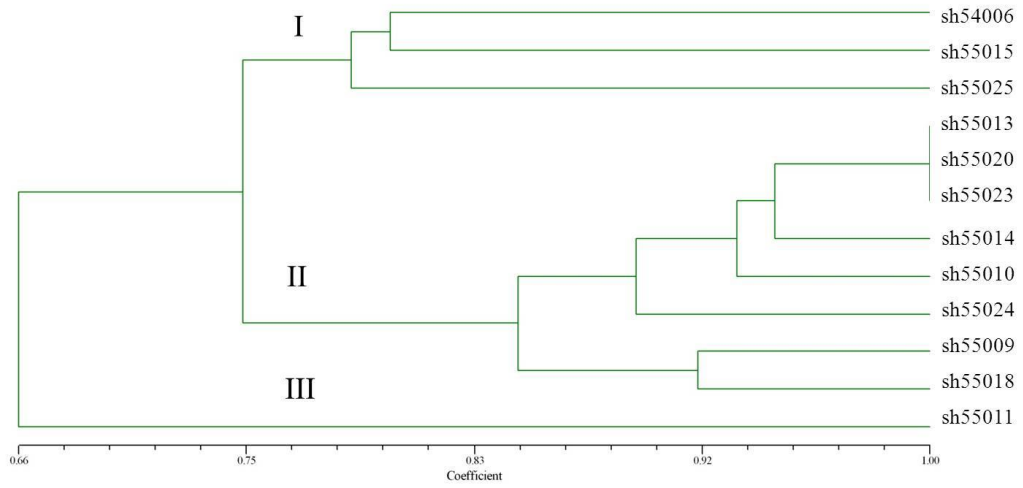
ในการทดลองได้นำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ ทั้งหมดจำนวน ๑๖ ไพรเมอร์ มาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและจำแนกสายพันธุ์หอมแดง พบว่า มี ๑๒ ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ AFS๐๑๕, ACE๐๒๐, CF๔๔๕๙๙๖, AFAT๑๓H๑๐, CF๔๕๐๐๐๘, AMS๑๔, AFA๑๑H๑๐, AFA๑๕E๐๘, AFS๐๙๖, AFA๐๘G๑๐, CF๔๕๑๒๒๖ และ CF๔๓๘๐๖๓ ที่สามารถสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ส่วนอีก ๔ ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ AFA๐๖A๐๘, AFRT๐๘C๐๒, AFA๑๑E๑๒ และ AFA๐๒H๐๘ ไม่สามารถสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ได้ และพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรม (polymorphic) ระหว่างสายพันธุ์หอมแดงที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ทั้งหมด ๘ ไพรเมอร์ และมี ๔ ไพรเมอร์ที่ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (monomorphic) ระหว่างหอมแดงที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ พบว่า สามารถจัดกลุ่มของหอมแดงได้เป็น ๓ กลุ่มใหญ่ๆ (ภาพที่ ๑) ดังนี้

กลุ่มที่ ๑ ประกอบด้วยหอมแดง ๓ สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ sh๕๔๐๐๖, sh๕๕๐๑๕ และ sh๕๕๐๒๕ โดยที่หอมแดงสายพันธุ์ sh๕๔๐๐๖ และ sh๕๕๐๑๕ มีแหล่งที่มาจากจังหวัดลำพูนและศรีสะเกษ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ sh๕๕๐๒๕ เป็นหอมแดงมีแหล่งที่มาจากประเทศอินโดนีเซีย จึงมีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่น้อยกับสายพันธุ์อื่นๆ ภายในกลุ่ม

กลุ่มที่ ๒ ประกอบด้วยหอมแดง ๘ สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ sh๐๐๙, sh๕๕๐๑๐, sh๕๕๐๑๓, sh๕๕๐๑๔, sh๕๕๐๑๘, sh๕๕๐๒๐, sh๕๕๐๒๓ และ sh๕๕๐๒๔ ซึ่งมีแหล่งที่มาจากจังหวัดลำพูน, เชียงใหม่,

สุโขทัย, อุตรดิตถ์ และศรีสะเกษ โดยในกลุ่มนี้จะเห็นได้ว่าเป็นสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งเพาะปลูกอยู่ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงหนือ ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก

กลุ่มที่ ๓ ประกอบด้วยหอมแดงเพียง ๑ สายพันธุ์ คือ sh๕๕๐๑๑ โดยเป็นสายพันธุ์จากจังหวัดนครราชสีมา




ภาพที่ ๑ เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างหอมแดง ๑๒ สายพันธุ์

ตารางที่ ๓ ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของลักษณะทางพันธุกรรมของหอมแดง ๑๒ สายพันธุ์

| | sh๕๔๐๐๖ | sh๕๕๐๑๑ | sh๕๕๐๑๓ | sh๕๕๐๑๔ | sh๕๕๐๑๕ | sh๕๕๐๐๙ | sh๕๕๐๑๐ | sh๕๕๐๑๘ | sh๕๕๐๒๐ | sh๕๕๐๒๓ | sh๕๕๐๒๔ | sh |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| sh๕๔๐๐๖ | ๑.๐๐ | | | | | | | | | | | |
| sh๕๕๐๑๑ | ๐.๕๔ | ๑.๐๐ | | | | | | | | | | |
| sh๕๕๐๑๓ | ๐.๗๗ | ๐.๖๖ | ๑.๐๐ | | | | | | | | | |
| sh๕๕๐๑๔ | ๐.๗๗ | ๐.๖๖ | ๐.๙๔ | ๑.๐๐ | | | | | | | | |
| sh๕๕๐๑๕ | ๐.๘๐ | ๐.๗๔ | ๐.๖๙ | ๐.๖๙ | ๑.๐๐ | | | | | | | |
| sh๕๕๐๐๙ | ๐.๗๑ | ๐.๗๗ | ๐.๘๓ | ๐.๗๗ | ๐.๘๖ | ๑.๐๐ | | | | | | |
| sh๕๕๐๑๐ | ๐.๗๗ | ๐.๖๐ | ๐.๙๔ | ๐.๘๙ | ๐.๖๓ | ๐.๗๗ | ๑.๐๐ | | | | | |
| sh๕๕๐๑๘ | ๐.๘๐ | ๐.๖๙ | ๐.๙๑ | ๐.๘๖ | ๐.๗๗ | ๐.๙๑ | ๐.๘๖ | ๑.๐๐ | | | | |
| sh๕๕๐๒๐ | ๐.๗๗ | ๐.๖๖ | ๑.๐๐ | ๐.๙๔ | ๐.๖๙ | ๐.๘๓ | ๐.๙๔ | ๐.๙๑ | ๑.๐๐ | | | |
| sh๕๕๐๒๓ | ๐.๗๗ | ๐.๖๖ | ๑.๐๐ | ๐.๙๔ | ๐.๖๙ | ๐.๘๓ | ๐.๙๔ | ๐.๙๑ | ๑.๐๐ | ๑.๐๐ | | |
| sh๕๕๐๒๔ | ๐.๘๐ | ๐.๖๓ | ๐.๙๑ | ๐.๘๖ | ๐.๗๑ | ๐.๘๐ | ๐.๘๖ | ๐.๘๙ | ๐.๙๑ | ๐.๙๑ | ๑.๐๐ | |
| sh๕๕๐๒๕ | ๐.๘๐ | ๐.๖๙ | ๐.๗๔ | ๐.๗๔ | ๐.๗๗ | ๐.๗๔ | ๐.๗๔ | ๐.๗๗ | ๐.๗๔ | ๐.๗๔ | ๐.๗๗ | |

จากการศึกษาด้วยเครื่องหมายชนิด microsatellite พบว่า หอมแดงสายพันธุ์ sh๕๕๐๑๓, sh๕๕๐๒๐ และ sh๕๕๐๒๓ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ ๑.๐๐ แสดงว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกัน โดยเป็นหอมแดงจากสุโขทัยอุตรดิตถ์และศรีสะเกษ หอมแดงที่มีความเหมือนกันน้อยที่สุด คือ sh๕๔๐๐๖ และ sh๕๕๐๑๑ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ ๐.๕๔ ป็นหอมแดงจากลำพูนและศรีสะเกษตามลำดับ (ตารางที่ ๓)

## สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกสายพันธุ์หอมแดงจากแหล่งปลูกต่างๆ โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล microsatellite สามารถจัดกลุ่มหอมแดงได้ ๓ กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่ ๑ ประกอบด้วยหอมแดง ๓ สายพันธุ์ ประกอบด้วยหอมแดงที่มาจากลำพูน ศรีสะเกษและหอมแดงอินโดนีเซีย โดยหอมแดงจากอินโดนีเซียมีความเหมือนน้อยที่สุดในกลุ่ม กลุ่มที่ ๒ ประกอบด้วยหอมแดงที่มาจากภาคเหนือคือ เชียงใหม่ ลำพูน อุตรดิตถ์ และสุโขทัย และหอมแดงที่มาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ ศรีสะเกษ กลุ่มที่ ๓ มีเพียงสายพันธุ์เดียว จัดกลุ่มแยกออกจากหอมแดงสายพันธุ์อื่นๆ เป็นหัวพันธุ์จากนครราชสีมา เมื่อพิจารณาจากลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่า มีลักษณะแตกต่างจากหอมแดงสายพันธุ์อื่นๆ โดยมีลักษณะใบและคอใหญ่ สีใบอ่อน และมีนวลที่ใบน้อย หัวทรงยาวรี ซึ่งเป็นหัวพันธุ์ที่เกษตรกรเก็บพันธุ์ไว้ใช้เอง

ผลจากการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อจำแนกพันธุ์หอมแดงในแต่ละแหล่งปลูก สามารถกระทำได้ แต่สายพันธุ์นั้นต้องมีการปลูกและเก็บหัวพันธุ์โดยเกษตรกรเอง ส่วนในแหล่งปลูกอื่นๆยังไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์หอมแดงในแต่ละแหล่งปลูกได้อย่างชัดเจน เนื่องจากเกษตรกรมีการซื้อหัวพันธุ์หอมแดงจากแหล่งปลูกอื่นเข้ามาปลูกในพื้นที่ ทำให้มีการเคลื่อนย้ายของหัวพันธุ์หอมแดงระหว่างหัวพันธุ์หอมแดงที่ปลูกในแต่ละพื้นที่ ทำให้การจำแนกสายพันธุ์ทำได้ยาก ดังนั้นควรมีการสำรวจและเก็บข้อมูลหอมแดงในแหล่งปลูกที่มีการเก็บหัวพันธุ์ไว้ปลูกเอง ซึ่งอาจจะได้ข้อมูลความแตกต่างของสายพันธุ์หอมแดงได้


## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ อ.ดร.จิรวัฒน์ สนิทชน สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอและคำปรึกษาด้านวิชาการ


## เอกสารอ้างอิง


Agarwal, M., N. Shrivastava and H. Padh. ๒๐๐๘. Advances in molecular marker techniques and their application in plant science. Plant Cell Rep. ๒๗:๖๑๗-๖๓๑.

Araki N., S.I. Masuzaki, H. Tsukazaki, S. Yaguchi, T.Wako, Y. Tashiro, N. Yamauchi, M. Shigyo. ๒๐๑๐. Development of microsatellite markers in cultivatedand wild species of sections Cepa and Phyllodolon in Allium. Euphytica. ๑๗๓:๓๒๑–๓๒๘.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. ๑๙๘๗. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin ๑๙: ๑๑ – ๑๕.

Mazuzaki, S., T. Miyazaki, J.A. McCallum, S. van Heusden, C. Kik, K. Yamachita, Y. Tashiro, N. Yamauchi and M. Shigyo. ๒๐๐๘. Conversion of chromosome-specific RAPD into SCAR-based anchor markers for onion linkage maps and its application to genetic analyses in other species. Scientia Hiticulturae ๑๑๕:๓๒๓-๓๒๘.

Soegianto A., A.N. Sugiharto and G. Windiastika. ๒๐๑๑. Molecular identification of shallot progenitors generated from true seeds by PCR based techniques. Journal of Agriculture and Food Technology. ๑(๘): ๑๔๕-๑๔๘.