วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2559 : 34 (3) : 33-38

การพัฒนาวิธีการระบุเพศมะละกอในระยะต้นกล้าต้นทุนต่ำ

Low-cost Technique Development for Sex-type Identification of Papaya Seedling

ภัทราภรณ์ ทรัพย์อุดมมาก[1] นงลักษณ์ คงศิริ[1] อลิษา ภู่ประเสริฐ[1] เกรียงศักดิ์ ไทยพงษ์[1] และ ราตรี บุญเรืองรอด[1]
Pattraporn Sab-udommak[1] Nongluck Kongsiri[1] Alisa Pooprasert[1] Kriengsak Thaipong[1] and Ratri Boonruangrod[1]

บทคัดย่อ

มะละกอเป็นพืชที่มีดอกแยกเพศ ต่างต้น 3 เพศ คือ ต้นเพศผู้ ต้นเพศเมีย และต้นสมบูรณ์เพศ ซึ่งเกษตรกรที่ปลูกมะละกอในเชิงการค้าต้องการเฉพาะต้นสมบูรณ์เพศ แต่ต้องใช้ระยะเวลานานประมาณ 3-4 เดือนมะละกอเริ่มออกดอก จึงสามารถระบุเพศของมะละกอได้ ในขณะที่การตรวจสอบเพศมะละกอในระดับโมเลกุลสามารถดำเนินการได้ในระยะต้นกล้าแต่มีต้นทุนที่สูงการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อลดต้นทุนและระยะเวลาในการระบุเพศมะละกอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCARs ที่จำเพาะเจาะจงต่อเพศมะละกอ แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยนำตัวอย่างสดใบมะละกอจากต้นเพศผู้ เพศเมีย และสมบูรณ์เพศ มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB แล้วตรวจสอบเพศด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ T1 และ W11 และการทดลองที่ 2 เปรียบเทียบต้นทุน ระยะเวลาที่ใช้ และผลการระบุเพศของมะละกอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ T1 และ W11 เมื่อใช้การสกัดดีเอ็นเอ 2 วิธี คือ CTAB และ NaOH โดยใช้ มะละกอ 3 พันธุ์ คือ พันธุ์แขกนวล พันธุ์แขกดำ และพันธุ์ปลักไม้ลาย จำนวนพันธุ์ละ 16 ต้น ในระยะต้นกล้า จากการทดลอง พบว่าไพรเมอร์ T1 และ W11 สามารถระบุความแตกต่างของเพศมะละกอได้โดยสามารถแยกมะละกอเพศผู้และสมบูรณ์เพศออกจากเพศเมียได้และการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้สารละลาย NaOH ใช้ต้นทุนที่ต่ำกว่า ใช้เวลาน้อยกว่า และผลการระบุเพศมะละกอจากทั้งสองวิธีให้ผลไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ : CTAB, NaOH, เครื่องหมายโมเลกุล, การสกัดดีเอ็นเอ

Abstract

Papaya is a dioecious plant. There are three sex types; male, female and hermaphrodite. The hermaphrodite plant is much more beneficial for commercial planting system. Identifying sex-types can be done based on floral morphology in their reproductive stage, about 3-4 months after transplanting. However, sex-type can also be distinguished in their vegetative or seedling stage using molecular markers. But the cost of this technique is still high. In this study, we aimed to reduce materials and time cost in DNA preparation for sex-type identification using PCR-based markers. Two experiments were performed. Experiment 1: Reliability test of sex-specific SCAR markers; DNA from fresh leaf tissue of male, female and hermaphrodite papaya were isolated using CTAB method. Selected SCAR markers, T1 and W11, were tested. Experiment 2: Comparisons of materials and time cost as well as the sex-type identification results, between two DNA preparation methods, i.e. CTAB and NaOH. Sixteen seedlings of each of three cultivars, 'Khaknuan', 'Khakdam' and 'Plak Mai Lai' were investigated. The results confirmed that T1 and W11 could be used for sex-type identification. Using NaOH method for DNA preparation had materials and time cost lower than CTAB method. Both DNA preparation methods revealed identical results in sex-type identification.

Keywords: CTAB, NaOH, molecular marker, DNA extraction

[1] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

มะละกอเป็นผลไม้ที่นิยมรับประทานทั้งในประเทศและต่างประเทศตลาดมะละกอในประเทศมีทั้งการบริโภคผลดิบ ผลสุก และแปรรูป สำหรับการส่งออกส่วนใหญ่คือ มะละกอผลสุกและมะละกอแปรรูปเป็นผลไม้กระป๋องและผลไม้อบแห้ง จากข้อมูลสถิติของ FAO (องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ) ผลผลิตมะละกอไทยอยู่ที่อันดับ 8 ของโลก มีปริมาณผลผลิต 211, 594 ตัน มูลค่า 1,921 ล้านบาท (2553) และ 212,000 ตัน มูลค่า 1,925 ล้านบาท (2554) ในปี 2553 มีปริมาณการส่งออกมะละกอสด 630 ตัน มูลค่า 27 ล้านบาท และในปี 2554 ปริมาณการส่งออกมะละกอสดเพิ่มเป็น 995 ตัน มูลค่า 50 ล้านบาท (สิริกุล, 2557) จากรายงานจะเห็นว่าการผลิตมะละกอภายในประเทศนั้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ แต่การผลิตมะละกอเพื่อการส่งออกนั้นยังมีปัญหาหลายอย่าง เช่น การพัฒนาพันธุ์ที่เหมาะสมกับความต้องการของตลาด วิธีการดูแลรักษาที่ดี การป้องกันกำจัดศัตรูพืช รวมถึงการคัดเลือกระบุเพศของมะละกอที่ต้องใช้ระยะเวลานานเนื่องจากเกษตรกรที่ทำการเพาะปลูกมะละกอในเชิงการค้านั้นต้องการมะละกอที่มีลักษณะเป็นต้นสมบูรณ์เพศ ต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศให้ผลที่มีรูปร่างยาว มีการให้ผลอย่างสม่ำเสมอ สวยงามตามความต้องการของตลาด โดยปกติแล้วเกษตรกรจะนิยมขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด ซึ่งนำเมล็ดมาจากผลที่ได้จากต้นสมบูรณ์เพศ โดยมีอัตราส่วนของต้นเพศผู้ ต้นสมบูรณ์เพศ และต้นเพศเมียขึ้นอยู่กับรูปแบบของการผสมเกสร แต่การเพาะเมล็ดนั้นต้องใช้ระยะเวลานานประมาณ 3-4 เดือนจึงจะสามารถระบุเพศของมะละกอได้ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองเวลาแรงงานและค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา ดังนั้นถ้าสามารถระบุเพศของมะละกอได้ตั้งแต่ในระยะต้นกล้าก็จะสามารถลดต้นทุนในการผลิตได้

ปัจจุบันสามารถตรวจสอบเพศของมะละกอในระยะต้นกล้าได้ โดยทำการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคทางเครื่องหมายโมเลกุล เช่น เทคนิคพีซีอาร์ หรือปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะส่วน เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาการตรวจสอบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอ จึงได้มีการประยุกต์ใช้นำเทคนิคนี้ไปตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต รวมถึงการแสดงความแตกต่างของเพศในพืชที่มีลักษณะแยกเพศและแยกต้น (dioecious plant) โดย Urasaki *et al*., (2002) ได้ออกแบบไพรเมอร์อย่างสุ่มทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับมะละกอพันธุ์ Sunrise และ Waimanalo พบว่าไพรเมอร์ IBRC-RP07 สามารถทำให้เกิดแถบเครื่องหมายขนาดประมาณ 450 คู่เบส ในต้นเพศผู้และต้นสมบูรณ์เพศเช่นเดียวกับผลการทดลองของ Dupety *et al*., (2002) ได้ทำการศึกษาไพรเมอร์ T1 และ W11 เพื่อใช้ระบุแยกความแตกต่างของเพศมะละกอ โดยทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1300 คู่เบส และ 800 คู่เบส ในต้นมะละกอเพศผู้และต้นสมบูรณ์เพศเท่านั้น ส่วนต้นเพศเมียจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส และไพรเมอร์ทั้งสองนี้สามารถใช้ตรวจสอบเพศมะละกอพันธุ์อื่นได้ แต่ในการตรวจสอบระบุเพศของมะละกอโดยใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลนั้นมีต้นทุนสูงและมีขั้นตอนในการดำเนินงานหลายขั้นตอน จึงอาจทำให้การตรวจสอบระบุเพศมะละกอด้วยวิธีนี้ไม่ค่อยเป็นที่นิยมของเกษตรกร ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้ไพรเมอร์ T1 และ W11 ในการระบุแยกความแตกต่างของเพศมะละกอและได้ทดสอบหาวิธีที่สามารถลดต้นทุนในการตรวจระบุเพศของมะละกอ เพื่อเป็นการสร้างทางเลือกให้แก่เกษตรกรที่ต้องการปลูกมะละกอในเชิงการค้ามากยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ T1 และ W11

การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอมะละกอ

เก็บใบอ่อนของมะละกอทั้ง 3 เพศ คือ เพศผู้ เพศเมีย และสมบูรณ์เพศที่ทราบเพศแล้วมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ใบอ่อนมะละกอ ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆใน extraction buffer [2% cethyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), 5 M NaCl, 0.5 M methylenediamine tetraacetic acid (EDTA) pH 8.0 และ 1 M Tris-HCl pH 8.0] โดยดัดแปลงวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของ Doyle & Doyle (1987) จากนั้นตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตรและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ T1 และ W11 ตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยาโดยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีส ใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างมะละกอทั้ง 3 เพศในการทดสอบไพรเมอร์ T12 และ W11 (แสดงลำดับเบสดังTable 1) ที่ได้จากงานทดลองของ Dupety *et al*., (2002) ในการระบุเพศมะละกอ โดยใช้สภาวะปฏิกิริยาพีซีอาร์ตาม Table 2 และตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยาทั้งหมดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีส

Table 1 List of primers used in this experiment. Dupety *et al*., (2002)

Type		PCR primers	PCR Product size
T1	Forward	TGCTCTTGATATGCTCTCTG	~1,300bp
	Reverse	TACCTTCGCTCACCTCTGCA	
W11	Forward	CTGATGCGTGTGTGGCTCTA	~800bp
	Reverse	CTGATGCGTGATCATCTACT	

Table 2 Components of PCR reaction mixture

Components	1 reaction (1x) µl
10x buffer (Invitrogen)	2.50
50mM $MgCl_2$ (Invitrogen)	0.75
1 mM dNTPs	3.75
T_1- Forward primer (4 µM)	1.10
T_1- Reverse primer (4 µM)	1.10
W_{11}- Forward primer (4 µM)	1.10
W_{11}-Reverse primer (4 µM)	1.10
Taq DNA polymerase(5 unit/µl) (Invitrogen)	0.20
DNA template (10 ng/µl)	2.00
Deionized sterile water	11.40
Total Volume	25 µl

การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบต้นทุนและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอมะละกอ

นำเมล็ดมะละกอ 3 พันธุ์คือ พันธุ์แขกนวล พันธุ์แขกดำ และพันธุ์ปลักไม้ลาย มาทำการเพาะ จำนวนพันธุ์ละ 16 ต้น เก็บใบอ่อนของมะละกอทั้ง 3 พันธุ์ในระยะต้นกล้าที่อายุประมาณ 15 วัน มาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีดัดแปลงของ Doyle & Doyle (1987) ดังการทดลองที่ 1 และสกัดดีเอ็นโดยใช้สารละลาย NaOH ด้วยวิธีดัดแปลงของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

He *et al* .,(2009) โดยนำตัวอย่างใบมะละกอ ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ใส่ใน tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วทำการบด ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายที่บดได้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายให้เข้ากันกันเพื่อนำไปใช้ต่อไป

หลังจากสกัดดีเอ็นเอทั้งสองวิธีแล้ว ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์และตรวจสอบผลที่ได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นในการทดลองที่ 1

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ T1 และ W11

เครื่องหมายดีเอ็นเอ T1และ W11 สามารถระบุแยกความแตกต่างของเพศมะละกอได้ โดยที่ต้นเพศผู้และต้นสมบูรณ์เพศนั้นจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1300 คู่เบส และขนาด 800 คู่เบส ส่วนต้นเพศเมียนั้นจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบสเพียงแถบเดียว (Figure 1) ซึ่งจากผลการทดลองให้ผลเป็นไปในทางเดียวกับรายงานของ Dupety *et al*.,(2002) คือ ไพรเมอร์ T1 และ W11 ไม่สามารถแยกความแตกต่างของมะละกอเพศผู้และสมบูรณ์เพศออกจากกันได้ โดยการศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้มาใช้ในการตรวจสอบระบุเพศ เนื่องมาจากในการเก็บเมล็ดพันธุ์มะละกอนั้นจะเก็บจากผลที่ได้จากการผสมตัวเองหรือการผสมข้ามต้นภายในพันธุ์ของต้นสมบูรณ์เพศ ซึ่งมีโอกาสการกระจายตัวของลูกเป็นต้นสมบูรณ์เพศ 2 ต้น ต่อต้นตัวเมีย 1 ต้น จึงทำให้ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้สามารถใช้แยกมะละกอสมบูรณ์เพศออกจากตัวเมียได้ แต่ทั้งนี้การตรวจสอบระบุเพศเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องจริง ๆ ควรมีการตรวจสอบแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ว่ามีวิธีการเก็บเมล็ดพันธุ์อย่างไร และมีความน่าเชื่อถือมากน้อยเพียงใดว่าเมล็ดที่จำหน่ายนั้นมาจากต้นสมบูรณ์เพศ เป็นต้น

Figure 1 PCR products using primers T1 and W11 in papaya (H = Hermaphrodite, F = Female)

การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบต้นทุนและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอด้วยการสารละลาย CTAB ถือเป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดีวิธีหนึ่งที่สามารถให้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง เก็บรักษาไว้ใช้ได้เป็นระยะเวลานานมากกว่า 2 ปี แต่อย่างไรก็ตามการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย CTAB นั้นเป็นวิธีที่มีหลายขั้นตอน และใช้ระยะเวลานาน ส่วนการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย NaOH นั้นเป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย ดีเอ็นเอที่ได้ไม่สามารถเก็บรักษาไว้ใช้ในระยะยาวได้ แต่มีความสะอาดเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากผลการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 2 วิธี ให้ผลการระบุเพศที่ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างกัน (Figure 2) แต่การสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย CTAB จะใช้ระยะเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง มีต้นทุนประมาณ 6 บาทต่อตัวอย่าง ส่วนการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย NaOH จะใช้ระยะเวลาประมาณ 10 นาที มีต้นทุนประมาณ 2.50 บาทต่อตัวอย่าง และเมื่อคำนวณราคาต้นทุนในการระบุเพศของมะละกอต่อหนึ่งตัวอย่างนั้น พบว่าการตรวจสอบระบุเพศ เมื่อใช้ดีเอ็นเอจากการสกัดด้วยวิธี CTAB จะใช้ระยะเวลาทั้งหมดประมาณ 8 ชั่วโมง มีต้นทุนเฉลี่ยประมาณ 26 บาทต่อหนึ่งตัวอย่าง ส่วนการตรวจสอบระบุเพศ ที่ใช้ดีเอ็นเอจากการบดเนื้อเยื่อใบในสารละลาย NaOH ใช้ระยะเวลาทั้งหมดประมาณ 3 ชั่วโมง มีต้นทุนเฉลี่ยประมาณ 20 บาทต่อหนึ่งตัวอย่าง เมื่อทำการตรวจสอบในจำนวนตัวอย่างที่เพิ่มขึ้นต้นทุนลดลง

Figure 2 PCR products of T1 and W11 using two different DNA template types A) DNA from CTAB DNA extraction method and B) DNA from ground leaf tissue in NaOH; H = Hermaphrodite , F = Female and N = negative control

ผลจากการตรวจสอบระบุเพศของมะละกอพันธุ์แขกนวล แขกดำ และปลักไม้ลาย จำนวนพันธุ์ละ 16 ต้น พบว่า พันธุ์แขกนวลปรากฏต้นสมบูรณ์เพศจำนวน 7 ต้น และต้นเพศเมียจำนวน 9 ต้น พันธุ์แขกดำปรากฏต้นสมบูรณ์เพศ 7 ต้น และต้นตัวเมีย 9 ต้น ส่วนพันธุ์ปลักไม้ลายปรากฏต้นสมบูรณ์เพศ 12 ต้น และต้นตัวเมีย 4 ต้น ซึ่งมีอัตราส่วนการกระจายตัวคือ 1:1, 1:1 และ 3:1 ตามลำดับ โดยอัตราส่วนการกระจายตัวของเพศมะละกอที่พบนั้นไม่เป็นไปตามทฤษฎีของการกระจายตัวของเพศมะละกอ คืออัตราส่วนต้นสมบูรณ์เพศ 2 ต้นต่อต้นตัวเมีย 1 ต้น เนื่องมาจากในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองน้อย จึงทำให้ไม่เพียงพอต่อการศึกษาการกระจายตัวของเพศมะละกอ ดังนั้นควรมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาให้มากขึ้น

ผลการทดลองของงานวิจัยในครั้งนี้สามารถตรวจสอบระบุเพศของมะละกอได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า เป็นการลดต้นทุนการผลิตมะละกอต้นสมบูรณ์เพศให้แก่เกษตรกร โดยที่ไม่ต้องเสียค่าแรงและต้นทุนการดูแลรักษาในระยะต้นกล้า และเกษตรกรสามารถจัดสรรพื้นที่ให้มีความเหมาะสมง่ายต่อการปลูกดูแลรักษา เช่น ระยะห่างระหว่างต้นต่อหลุม จำนวนต้นต่อหลุม เป็นต้น ซึ่งสามารถนำไปผลิตต้นกล้ามะละกอได้ ในราคาต้นทุนที่ต่ำลง ซึ่งอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรผู้ปลูกมะละกอ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนการผลิต เช่น ต้นทุนในการเลือกซื้อต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้า ปัจจัยการผลิตต่าง ๆ ปุ๋ย สารเคมีและค่าแรง ระหว่างการใช้ต้นกล้าแบบดั้งเดิมกับต้นกล้าต้นสมบูรณ์เพศจากการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาเลือกใช้ต้นกล้ามะละกอ

สรุปผลการทดลอง

เครื่องหมายดีเอ็นเอ T1 และ W11 สามารถระบุแยกความแตกต่างเพศของมะละกอได้ โดยสามารถแยกต้นเพศผู้และสมบูรณ์เพศออกจากต้นเพศเมียได้ เมื่อคำนวณเวลา และต้นทุนไม่รวมค่าแรง ของการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย CTAB และปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการระบุเพศจะใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 8 ชั่วโมง รวมต้นทุนในการตรวจสอบเพศ 26 บาท ต่อตัวอย่าง ในขณะที่การสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย NaOH และปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการระบุเพศใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 3 ชั่วโมง คิดเป็น 20 บาท ต่อตัวอย่าง วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย NaOH นั้นสามารถใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ เป็นการลดต้นทุนและระยะเวลาในการสกัดดีเอ็นเอ ทั้งนี้ ต้นทุนลดต่ำลงเมื่อวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สิริกุล วะสี. 2557. มะละกอ พืชความหวังใหม่ของเกษตรกร. ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น.5.

Deputy, J.C., R. Ming, H. Ma, Z. Liu, M.M. Fitch, M. Wang, R. Manshardt and J.I. Stiles. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). Theor. Appl. Genet. 106: 107-111.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19:11-15.

He, Y. H., G. Ning, Y. L. Sun, Y. C. QI and M. Z. BAO. 2009. Identification of a SCAR marker linked to a recessive male sterile gene (*Tems*) and its application in breeding of marigold (*Tagetes erecta*). Plant Breeding. 128: 92-96.

Urasaki, N., M. Tokumoto, K. Tarora, Y. Ban, T. Kayano. H. Tanaka. H. Oku, I. Chinen and R. Rerauchi. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Caricapapaya* L.). Theor. Appl. Genet. 104: 281-285.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้