

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์จำปาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี Study on Genetic Diversity of Magnoliaceae by Using High Annealing Temperature Random Amplified Polymorphic DNA Technique

วริศรา แทนสง่า¹, เปรมณัช ขุนปักษ์¹, ธีระชัย ธนานันต์¹ และ นฤมล ธนานันต์^{2*}

Warisara Tansa-nga¹, Premmanuch Khunpugsee¹, Theerachai Thanananta¹ and Narumol Thanananta^{2*}

¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120;

²คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปทุมธานี 13180

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Center, Pathum Thani 12120; ²Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage, Pathum Thani 13180

*Corresponding author: narumolpla@yahoo.com

บทคัดย่อ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์จำปา 4 สกุล 7 ชนิด ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 สาย พบว่าไพรเมอร์ 57 สาย สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 15 สาย ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกพืชวงศ์จำปาทั้ง 7 ตัวอย่าง ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงไพรเมอร์เดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าสามารถจำแนกพืชวงศ์จำปาทั้ง 7 ชนิด เป็น 4 กลุ่ม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.78

ABSTRACT

High annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to study the genetic relationship among 4 genus 7 species of Magnoliaceae. Seventy-two random primers were screened and 57 primers could be used for DNA amplification. Fifteen primers which gave clear amplified products were selected and used to analyze all varieties. The result showed significant differences among 7 species having specific fragments for each variety. Furthermore, there are six primers which are able to identify all species. A dendrogram constructed based on polymorphic bands showed genetic similarities among Magnoliaceae and separated to 4 clusters with similarity coefficients ranging from 0.38 to 0.78.

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม, แฮตอาร์เอพีดี, พืชวงศ์จำปา

Keywords: genetic diversity, HAT-RAPD, Magnoliaceae

บทนำ

พืชวงศ์จําปา (Magnoliaceae) เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ซึ่งดอกมีกลิ่นหอม ได้รับความนิยมปลูกเป็นไม้ประดับ (ปิยะ, 2540) นอกจากนี้พืชในวงศ์นี้ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการทำยาสมุนไพรอีกด้วย (สายสุนีย์ และคณะ, 2542)

จากความสำคัญดังกล่าวจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของพืชวงศ์จําปา โดยใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature random amplified polymorphic DNA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) (Williams *et al.*, 1990) ซึ่งสะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น (สุรินทร์, 2552)

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชวงศ์จําปา และตรวจหาเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD marker) ที่สามารถจำแนกชนิดของพืชวงศ์จําปา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการคุ้มครองพันธุกรรมและการอนุรักษ์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พืชวงศ์จําปา

พืชวงศ์จําปาที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 7 ชนิด ได้แก่ (1) จําปีป่า [*Paramichelia baillonii* (Pierre) Hu] (2) จําปา (*Michelia champaca* L.) (3) จําปีสิรินธร (*Magnolia sirindhorniae* Noot & Chalermglin) (4) จําปีแขก (*Michelia figo* Spreng) (5) จําปี (*Michelia longifolia*) (6) ยี่หุบ (*Magnolia coco*) และ (7) มณฑา (*Talauma candollei*)

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชวงศ์จําปาด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al.*, 1989)

3. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

3.1 การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยรวมดีเอ็นเอของพืชวงศ์จําปาทั้ง 7 ตัวอย่าง เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 72 สาย คือไพรเมอร์ชุด A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 จากบริษัท Wako Company (Japan) ซึ่งมีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์

3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชวงศ์จําปา โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของพืชในวงศ์จําปาแต่ละชนิด โดยได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (นฤมล และคณะ, 2012)

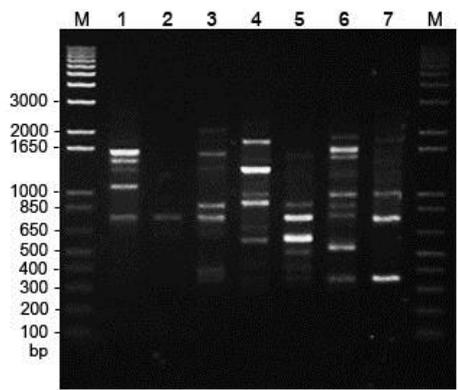
4. การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชวงศ์จําปาที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของพืชวงศ์จำปาด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 สาย พบว่าไพรเมอร์ 57 สาย (หรือคิดเป็น 79.17 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่ม 15 สาย ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชวงศ์จำปาแต่ละชนิด จำนวน 7 ชนิด ด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดี ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 161 แถบ ขนาดประมาณ 300-3,000 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกชนิด (monomorphic band) 7 แถบ (4.35 เปอร์เซ็นต์) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบต่างกันในแต่ละชนิด (polymorphic band) 154 แถบ (95.65 เปอร์เซ็นต์) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีดีนี้มีรูปแบบจำเพาะต่อพืชวงศ์จำปาแต่ละชนิด (รูปที่ 1) และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจัดจำแนกตัวอย่างของพืชวงศ์จำปาได้ นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ซึ่งให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างของพืชในวงศ์จำปาแต่ละชนิดออกจากกันได้ด้วย ไพรเมอร์เดี่ยว จำนวน 6 สาย ได้แก่ A25 (5'-CTCAGCGATACG-3'), A27 (5'-ATCGCGGAATAT-3'), D22 (5'-TGCCCACTACGG-3'), D27 (5'-AGAATGTCCGTA-3'), F21 (5'-AAC CTTTAGGGC-3') และ F25 (5'-CCAGATCCGAAT-3')

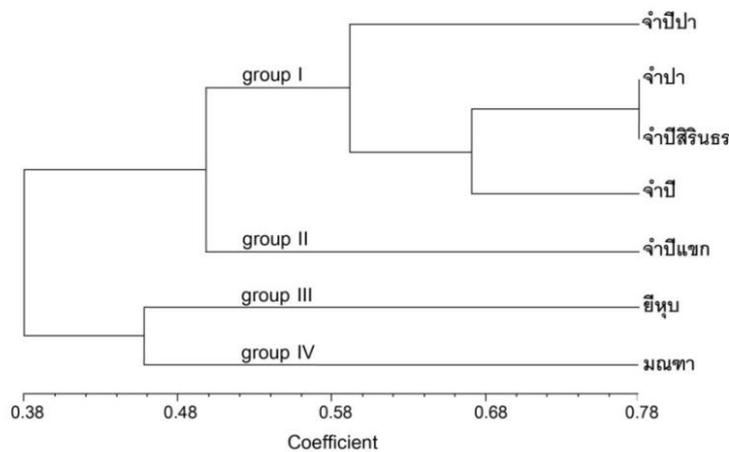
เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่าพืชวงศ์จำปาทั้ง 7 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.78 เฉลี่ย 0.58 (รูปที่ 2) ถ้าพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.52 พบว่าแบ่งพืชวงศ์จำปาทั้ง 7 ชนิด เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ จำปีป่า จำปา จำปีสิรินธร และจำปี กลุ่ม 2 ได้แก่ จำปีแขก กลุ่ม 3 ได้แก่ ยี่หุบ และกลุ่ม 4 ได้แก่ มณฑา (รูปที่ 3) ผลการวิจัยนี้แสดงว่าพืชวงศ์จำปามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสามารถใช้เป็นเครื่องหมายแอสตอร์เอพีดีสำหรับการจำแนกพืชวงศ์จำปา และแถบดีเอ็นเอบางแถบที่จำเพาะต่อตัวอย่างสามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของพืชวงศ์จำปาได้ นอกจากนี้ผลการวิจัยนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาวิจัยและการวางแผนอนุรักษ์ในอนาคต โดยผลงานวิจัยนี้ยังสนับสนุนศักยภาพของเทคนิคแอสตอร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์พืชต่าง ๆ ในประเทศไทย



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ D22 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-7 คือ จำปีป่า, จำปา, จำปีสิรินธร, จำปีแขก, จำปี, ยี่หุบ และ มณฑา ตามลำดับ]

จำปีป่า	1.00						
จำปา	0.61	1.00					
จำปีสิรินธร	0.59	0.78	1.00				
จำปีแขก	0.46	0.51	0.52	1.00			
จำปี	0.59	0.69	0.66	0.51	1.00		
ยี่หุบ	0.31	0.38	0.44	0.35	0.45	1.00	
มณฑา	0.39	0.34	0.40	0.37	0.36	0.46	1.00
	จำปีป่า	จำปา	จำปีสิรินธร	จำปีแขก	จำปี	ยี่หุบ	มณฑา

รูปที่ 2 ค่าดัชนีความเหมือนของพืชวงศ์จำปาที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ 15 สาย



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของพืชวงศ์จำปาที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ 15 สาย

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบพืชวงศ์จำปาทั้ง 4 สกุล 7 ชนิด ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบคู่ 15 สาย พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับชนิด และตรวจพบไพรเมอร์ 6 สาย ที่สามารถจำแนกพืชวงศ์จำปาได้ด้วยไพรเมอร์เดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีความสัมพันธ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.78 และแผนภูมิความสัมพันธ์ของพืชวงศ์จำปาที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.52 สามารถแยกพืชวงศ์จำปาได้เป็น 4 กลุ่ม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณจันทรีจิรา สุรัสวดี คุณฤทธิชัย เจริญทรัพย์ยานันต์ และคุณวริศรา อรรถ-เวทยาวรวัณณี ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- นฤมล ธานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธานันต์, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี. Thai J. Sci. Technol. 2012. 1: 169 – 179.
- ปิยะ เฉลิมกลิ่น, ไม้ดอกหอม. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์บ้านและสวน. 2540.
- สายสุนีย์ เหลี้ยวเรืองรัตน์, บุญสม เหลี้ยวเรืองรัตน์ และอัมพวัน อภิสริยะกุล, การสกัดแยกวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชสมุนไพรรอบวงศ์ Magnoliaceae. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2542.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2552.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 1987. 19: 11-15.
- Rohlf, F.J., NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Applied Biostatistics, Inc. 2002.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 1990. 18: 653