การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแพรเซี่ยงไฮ้ (*Portulaca grandiflora*) ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

Assessment of Genetic Relationships among *Portulaca grandiflora* Using HAT-RAPD Markers

เกียรติชัย แซ่ไต่[1], **เปรมณัช ขุนปักษี**[1], **ธีระชัย ธนานันต์**[1] **และนฤมล ธนานันต์**[2]*

Kiattichai Saetai[1], Premmanuch Khunpagsee, Theerachai Thananta[1] and Narumol Thananta[2]*

[1]*ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120;* [2]*คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปทุมธานี 13180*

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

**Corresponding authors: narumolpla@yahoo.com*

บทคัดย่อ

แพรเซี่ยงไฮ้ (*Portulaca grandiflora*) เป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีได้รับความนิยมมาก เนื่องจากแพรเซี่ยงไฮ้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม เจริญเติบโตเร็ว และมีดอกหลายสี การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแพรเซี่ยงไฮ้ 8 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 15 ชนิด สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.80 ถึง 0.93

ABSTRACT

Portulaca Rose has been very popular because it is resistant to the environment. Grow faster and it has many colors. High annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to amplify the total DNA from 8 cultivars of *Portulaca grandiflora*. Seventy-two random primers were screened and 15 primers could be used for DNA fingerprinting and used to analyze all cultivars. The result showed that a dendrogram constructed based on polymorphic bands showed genetic similarities among 8 clusters with similarity coefficients ranging from 0.80 to 0.93.

คำสำคัญ: แพรเซี่ยงไฮ้, การจำแนก, แฮตอาร์เอพีดี

Keywords: Portulaca Rose, *Portulaca grandiflora*, identification, HAT-RAPD

บทนำ

แพรเซี่ยงไฮ้ (*Portulaca grandiflora*) เป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีสีสวยงาม อยู่ในวงศ์ผักเบี้ย (Portulacaceae) มีถิ่นกำเนิดในประเทศอาร์เจนตินา อุรุกวัย และทางใต้ของบราซิล ปัจจุบันได้แพร่หลายไปทั่วโลก เพราะแข็งแรง ปรับตัวได้ดี ออกดอกตลอดปี มีดอกหลายสี ส่วนใหญ่เป็นดอกซ้อน กลีบบางย่อยคล้ายแพรบาง ๆ มักออกตามยอดหรือปลายกิ่ง ออกดอกเป็นช่อ ช่อละ 3-6 ดอก มักจะทยอยบานครั้งละ 1-3 ดอก เมื่อบานเต็มที่เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 เซนติเมตร ใบมีรูปร่างกลม ปลายใบแหลม อวบน้ำ ยาวประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร ลำต้นสีน้ำตาลอ่อน แตกกิ่งก้านแผ่ไปตามพื้นดินได้ในรัศมี 1-4 เซนติเมตร โดยแพรเซี่ยงไฮ้มีข้อดีคือทนทานต่อสภาพแห้งแล้ง และฝนหนักได้ดี จึงเหมาะสำหรับใช้ปลูกประดับแปลง แต่เดิมแพรเซี่ยงไฮ้ในประเทศไทยมีเพียงดอกสีแดงเข้มและสีชมพูเท่านั้น ซึ่งต่อมามีผู้นำแพรเซี่ยงไฮ้สีใหม่เข้ามาปลูกมากมาย (เดชา, 2554)

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพรเซี่ยงไฮ้ที่มีอยู่ในประเทศไทยในปัจจุบันด้วยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาจากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี HAT-RAPD (high annealing temperature random amplified polymorphic DNA) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้มาจากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) (Williams *et al*., 1990) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอและประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น (สุรินทร์, 2552)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แพรเซี่ยงไฮ้

แพรเซี่ยงไฮ้ที่ใช้ในการวิจัยนี้มี 8 สายพันธุ์ แยกตามสีดอก คือ ชมพู โอรส บานเย็น แดง ชมพูขาว ขาว เหลือง และส้ม

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดแยกดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของแพรเซี่ยงไฮ้ทั้ง 8 สายพันธุ์ ด้วยวิธีประยุกต์ของ Doyle และ Doyle (1987) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยมวลต่อปริมาตร (Sambrook *et al.,* 1989)

3. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

3.1 การคัดเลือกชนิดไพรเมอร์

ใช้ดีเอ็นเอผสมของแพรเซี่ยงไฮ้ทั้ง 8 สายพันธุ์ ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ ไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 72 ชนิด แบ่งเป็นไพรเมอร์ชุด A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 จากบริษัท Wako Company (ประเทศญี่ปุ่น) และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยมวลต่อปริมาตร (นฤมล และคณะ, 2555)

3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

โดยใช้ไพรเมอร์ที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นตอน 3.1. มาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแพรเซี่ยงไฮ้แต่ละสายพันธุ์ และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจล อะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยมวลต่อปริมาตร

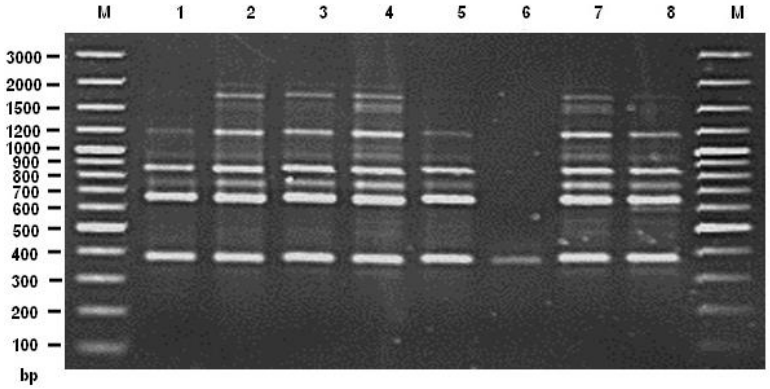
4. การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีของแพรเซี่ยงไฮ้ทั้ง 8 สายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

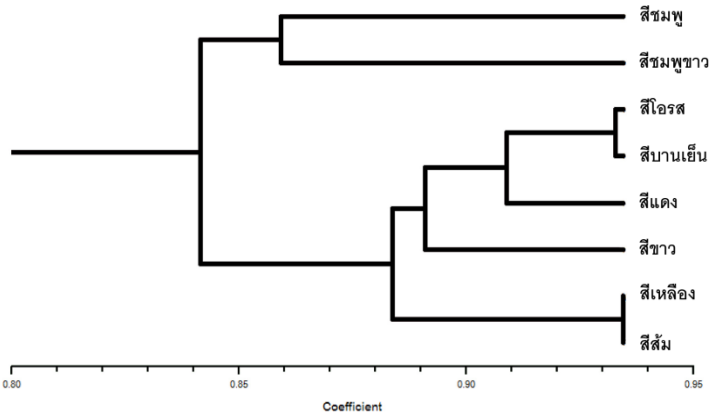
ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มทั้งหมด 72 ชนิด โดยใช้ดีเอ็นเอผสมเป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่ามีไพรเมอร์ทั้งหมด 15 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และใช้ไพรเมอร์ 15 ชนิดนี้มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแพรเซี่ยงไฮ้ทั้ง 8 สายพันธุ์ ผลที่ได้คือปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 196 แถบ โดยมีขนาดตั้งแต่ 150-3,000 คู่เบส เช่น ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากการใช้ไพรเมอร์ E32 ดังรูปที่ 1 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 16 แถบ โดยมีขนาดตั้งแต่ 300-2,000 คู่เบส แต่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีของไพรเมอร์ทั้ง 15 ชนิด ไม่พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อแพรเซี่ยงไฮ้แต่ละสายพันธุ์

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีของไพรเมอร์ทั้ง 15 ชนิดด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าสามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 2 และมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่างสายพันธุ์ดังรูปที่ 3 เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้พบว่าแพรเซี่ยงไฮ้สายพันธุ์สีเหลืองและสีส้มมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด โดยมีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.93 ในขณะที่ค่าสายพันธุ์สีชมพูแตกต่างจากสายพันธุ์สีเหลืองมากที่สุด (มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.80) และเมื่อหาค่าเฉลี่ยของค่าดัชนีความเหมือน (รูปที่ 4) พบว่าสายพันธุ์ที่มีค่าเฉลี่ยมากที่สุด (0.89) คือสายพันธุ์สีบานเย็น แสดงว่าสายพันธุ์สีบานเย็นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์อื่นๆ มากที่สุด คือมีวิวัฒนาการอยู่ระดับกลางเมื่อเปรียบเทียบกันในทั้ง 8 สายพันธุ์ ส่วยสายพันธุ์สีชมพูมีค่าเฉลี่ยดัชนีความเหมือนน้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่าเมื่อเทียบกันในทั้ง 8 สายพันธุ์แล้ว สายพันธุ์สีชมพูนี้แตกต่างจากพันธุ์อื่น ๆ มากที่สุด



รูปที่ 1 ตัวอย่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ E32 โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA) และ 1-8 คือ แพรเซี่ยงไฮ้สายพันธุ์สีชมพู โอรส บานเย็น แดง ขาว ชมพูขาว เหลือง และส้ม ตามลำดับ



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของแพรเซี่ยงไฮ้ 8 สายพันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA

	สีชมพู	สีโอรส	สีบานเย็น	สีแดง	สีชมพูขาว	สีขาว	สีเหลือง	สีส้ม
สีชมพู	1.00							
สีโอรส	0.88	1.00						
สีบานเย็น	0.87	0.93	1.00					
สีแดง	0.80	0.90	0.92	1.00				
สีชมพูขาว	0.86	0.86	0.87	0.84	1.00			
สีขาว	0.82	0.90	0.89	0.87	0.86	1.00		
สีเหลือง	0.80	0.87	0.88	0.91	0.84	0.90	1.00	
สีส้ม	0.81	0.87	0.86	0.90	0.84	0.88	0.93	1.00

รูปที่ 3 ค่าดัชนีความเหมือนของแพรเซียงไฮ้ 8 สายพันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA

สีชมพู	สีโอรส	สีบานเย็น	สีแดง	สีชมพูขาว	สีขาว	สีเหลือง	สีส้ม
0.856	0.901	0.904	0.895	0.871	0.891	0.891	0.887

รูปที่ 4 ค่าเฉลี่ยของค่าดัชนีความเหมือนของแพรเซียงไฮ้ 8 สายพันธุ์

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าแพรเซียงไฮ้ต่างสีมีความแตกต่างกันในเชิงพันธุกรรมเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี แต่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อแพรเซียงไฮ้แต่ละสายพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ คุณนัฐธิญา กาลพงษ์นุกูล คุณเฉลิมพล รัตนลาโภ และคุณรติพร รวยรื่น ที่มีส่วนช่วยงานวิจัยนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

เดชา ศิริภัทร.แพรเซี่ยงไฮ้ความงดงามที่เรียบง่ายและติดดิน. แหล่งที่มา : http://www.doctor.or.th/ node/1504. 13 กันยายน 2554.

นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์ การจำแนกข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสายพันธุ์ปรับปรุงจากสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Tech. 2555; 1: 169-179.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 2552.

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

Rohlf, FJ NTSYpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistics, Inc., New York. 2002.

Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1989.

Williams, JG, Kubelik, AR, Livak, KJ, Rafalski, JA., Tingey, SV DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 1990; 18: 6531-6535.