

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัสโดยใช้ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

DNA fingerprinting of eucalyptus clones using microsatellite markers

ธนรัตน์ ก.จันทราภานนท์ สมศักดิ์ อภิลิทธิวานิช และ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล*

Tanarat K.Jantapanon, Somsak Apisitwanich and Surin Peyachoknagul*

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding authors: fscisrp@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การตรวจสอบโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัส โดยใช้
เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ พบว่าไพรเมอร์ที่
คัดเลือกมาทั้งหมด 39 คู่มีเพียง 28 คู่ที่สามารถเพิ่ม
ปริมาณดีเอ็นเอได้ และมี 18 คู่ ที่แสดงความหลากหลาย
ทางพันธุกรรมของแต่ละโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัสได้
จากการตรวจสอบดีเอ็นเอ 25 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์
18 คู่ มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทั้งหมด
152 แถบ เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุ
กรรมโดยคำนวณค่าดัชนีความคล้ายคลึงด้วยวิธี simple
matching และจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี unweighed pair
group method using arithmetic average (UPGMA)
พบว่าสามารถจัดโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัสออกเป็น 4 กลุ่ม
เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบduplex
PCR พบว่า มีไพรเมอร์ 4 คู่ ที่สามารถนำมาใช้เพิ่ม
ปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกัน คือ EMBRA 2 กับ EMBRA
22, EMBRA 2 กับ EMBRA 63, EMBRA 22 กับ
EMBRA 69 และ EMBRA 63 กับ EMBRA 69 ทำให้
สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสได้รวดเร็ว
และประหยัดค่าใช้จ่ายได้

ABSTRACT

Microsatellite marker was used to verify
eucalyptus clones. Thirty nine primer pairs were
selected. Twenty eight primer pairs could amplify
DNA in which 18 of them showed polymorphic band
pattern among 25 eucalyptus clones. One hundred
and fifty-two distinct DNA bands were scored and
calculated for the genetic similarity and cluster
analysis using simple matching and unweighed pair
group method using arithmetic average (UPGMA).
From the phylogenetic tree, these eucalyptus clones
were divided into four clusters. Two sets of primer
pairs, namely EMBRA 2 and EMBRA 22, EMBRA
2 and EMBRA 63, EMBRA 22 and EMBRA 69 or
EMBRA 63 and EMBRA 69 were combined and
able to simultaneously amplify DNA in a duplex
PCR reaction which made fingerprinting of eucalyptus
clones easier and less expensive.

คำสำคัญ: ยูคาลิปตัส, เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์,
พีซีอาร์แบบดูเพล็กซ์

Keywords: eucalyptus, microsatellite markers, duplex
PCR

บทนำ

จากข้อมูลดาวเทียมปี 2536 ประเทศไทยมีพื้นที่ป่าไม้เหลือเพียง 83.45 ล้านไร่ คิดเป็น 26.02 % ของพื้นที่ประเทศ แต่ความต้องการใช้ไม้พื้นในครัวเรือนและอุตสาหกรรมต่างๆ มีความต้องการไม้จำนวนมากทำให้ขาดแคลนแหล่งทรัพยากร ดังนั้นการแก้ปัญหาจึงต้องเร่งส่งเสริมการปลูกไม้ใช้สอยในครัวเรือนและเพื่ออุตสาหกรรมที่จะมีเพิ่มมากขึ้น ซึ่งไม้ที่จะปลูกควรเจริญเติบโตเร็ว ปลูกง่าย ทนต่อสภาพแห้งแล้ง และสามารถขึ้นได้ในพื้นที่ดินเสื่อมโทรมที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ไม้ยูคาลิปตัสเป็นไม้โตเร็วชนิดหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมดังที่กล่าวมา มีรูปทรงลำต้นตรง สามารถเจริญเติบโตและตัดฟันเพื่อใช้ประโยชน์ได้ตั้งแต่อายุ 3-5 ปี และยังสามารถแตกหน่อได้ดีโดยไม่ต้องปลูกใหม่ (กรมป่าไม้, 2542)

ประเทศไทยได้นำยูคาลิปตัสเข้ามาทดลองปลูกครั้งแรกในปี พ.ศ. 2492 (เกษมสุข, 2533) ต่อมาได้มีการปลูกยูคาลิปตัส 13 สปีชีส์ ที่ศูนย์อนุรักษ์ไม้ป่าอินทิล อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่า *Eucalyptus camaldulensis* มีอัตราการรอดตายสูงกว่าสปีชีส์อื่นๆ และยังสามารถปลูกได้ในพื้นที่ดินเค็มด้วย ปัจจุบันพบว่า *E. camaldulensis* มีฐานพันธุกรรมค่อนข้างคงที่ เนื่องจากการส่งเสริมการปลูกกันอย่างแพร่หลาย และมีการขยายพันธุ์จากโคลนเดิมที่มีคุณภาพดี ดังนั้นจึงได้มีแนวความคิดในการปรับปรุงพันธุ์ยูคาลิปตัส เพื่อให้มีฐานพันธุกรรมที่กว้างขึ้นด้วยการผสมพันธุ์ระหว่าง *E. camaldulensis* และยูคาลิปตัสสปีชีส์อื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าได้มีการนำพันธุ์ใหม่ๆ เข้ามาปลูกเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีการรวบรวมหรือตรวจสอบจำนวนพันธุ์ที่แน่นอน จึงอาจมีความสับสน หรือซ้ำซ้อนในเรื่องของพันธุ์อยู่มาก การคัดเลือกยูคาลิปตัสลูกผสมที่มีลักษณะตามที่ต้องการนั้น จะต้องใช้เวลาเพื่อรอให้ต้นไม้โตเต็มที่ ซึ่งต้องใช้เวลานาน

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายวิธี แต่วิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบเพื่อ

การรับรองพันธุ์ คือ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่มีความแม่นยำ น่าเชื่อถือ จึงมีการใช้อย่างแพร่หลายในพืชหลายชนิด เช่น พืชตระกูลถั่ว (Yu et al., 1999) *Silene vulgaris* (Juillet et al., 2003) อะราบิดอปซิส (Clauss et al., 2002) กล้ายไม้สกุล *Ophyrus* (Soliva et al., 2000) เป็นต้น ในยูคาลิปตัสมีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อใช้ในการศึกษาองค์ประกอบทางพันธุกรรม ระบุพันธุ์ที่แน่นอน ตรวจสอบหาพันธุ์พ่อแม่ และการทำแผนที่ยีนใน *E. grandis* และ *E. urophylla* (Brondani et al., 1998; Brondani et al., 2002; Grattapaglia et al., 2004; Kirst et al., 2005) การตรวจสอบระบุพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน *E. globulus* (Steane et al., 2001) และ *E. leucoxylon* (Ottewell et al., 2005) เป็นต้น โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากยูคาลิปตัสบางชนิดสามารถนำมาใช้กับยูคาลิปตัสชนิดอื่นได้ด้วย การศึกษาครั้งนี้ได้นำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากยูคาลิปตัสที่มีรายงาน มาใช้จำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคลนพันธุ์ ที่ได้จากการผสมพันธุ์ขึ้นใหม่

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างยูคาลิปตัสและการสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างยูคาลิปตัสที่นำมาศึกษา เป็นลูกผสมไม้ยูคาลิปตัส *E. camaldulensis* รุ่นที่ 2 จากแปลงทดสอบพันธุ์ สถานีฝึกนิสิต คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งมีทั้งหมด 120 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์มี 24 ต้น เกิดจากการนำเมล็ดจากรุ่นที่ 1 มาปลูก โดยได้เลือกมาใช้ศึกษาเพียง 19 สายพันธุ์ 21 ตัวอย่าง และพันธุ์ที่มีการปลูกเป็นการค้า 4 พันธุ์ รวมทั้งหมด 25 ตัวอย่าง (Table 1) นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีดัดแปลงจาก Agrawal et al. (1992)

Table 1 Accession number of 25 eucalyptus clones.

No	Accession	Provenance	Region
1	29/18	Flat Rock Pool	Walsh-Mitchell River Queensland
2	88/23	Montalbion	Petford Region Queensland
3	D1 ¹	-	-
4	11/11	Eccles Creek/tributaries	Petford Region Queensland
5	22/13	Eccles Creek/tributaries	Petford Region Queensland
6	108/12	Katherine	Northern Territory
7	229/9	Morehead River	Other Queensland
8	26/23	Morehead River	Other Queensland
9	K51 ²	-	-
10	88/17	Healeys Yard	Walsh-Mitchell River Queensland
11	44/23	Mishap Creek	Petford Region Queensland
12	K61 ³	-	-
13	19/10	Walsh River-W.Emu Creek Junction	Petford Region Queensland
14	109/14	Headwaters-Emureka Creek	Petford Region Queensland
15	196/18	Healeys Yard	Walsh-Mitchell River Queensland
16	227/7	Morehead River	Other Queensland
17	178/23	Palmerlyville	Walsh-Mitchell River Queensland
18	163/24	Walsh River Rockwood	Walsh-Mitchell River Queensland
19	112/21	Eureka Creek/tributaries	Petford Region Queensland
20	72/8	Petford Bridge	Walsh-Mitchell River Queensland
21	88/12	Montalbion	Petford Region Queensland
22	K69 ⁴	-	-
23	228/17	Morehead River	Other Queensland
24	236/23	Thailand	Thai selection
25	188/18	Healeys Yard	Walsh-Mitchell River Queensland

¹D1 : *E. camaldulensis*, ²K51 : *E. camaldulensis*, ³K61 : hybrid between *E. brassiana* and *E. grandis*, and ⁴K69 : hybrid between *E. camaldulensis* and *E. pellita* (commercial varieties)

การตรวจสอบข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ของยูคาลิปตัสจากฐานข้อมูลและสังเคราะห์ไพรเมอร์

ตรวจสอบข้อมูลงานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอกับยูคาลิปตัส โดยเฉพาะเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จากฐานข้อมูล GenBank โดยเลือกเครื่องหมายที่มีรายงานการตรวจสอบใน *E. camaldulensis* หรือ *Eucalyptus* ชนิดอื่นที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเลือกสังเคราะห์ไพรเมอร์ โดยเลือกไพรเมอร์ที่ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีจำนวนแอลลีลมาก ซึ่งสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ได้ 39 คู่ โดย

ลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละคู่แสดงใน Table 2

การทดสอบเพื่อเลือกยูไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำไพรเมอร์ที่พัฒนาจาก *E. grandis* และ *E. urophylla* (Brondani *et al.*, 1998) จำนวน 39 คู่ มาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยูคาลิปตัส 3 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ T5, K51 และลูกผสมระหว่าง *E. tereticornis* กับ *E. camaldulensis* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดและรี

Table 2 Names and sequences of each primer.

No	Primer	Sequence of Forward primer	Sequence of Reverse primer
1	EMBRA2	CGTGACACCAGGACATTAC	ACAAATGCAAATTCAAATGA
2	EMBRA5	ATGCTGGTCCAACTAAGATT	TGAGCCTAAAAGCCCAAC
3	EMBRA6	AGAGAATTGCTCTTCATGGA	GAAAAGTCTGCAAAGTCTGC
4	EMBRA7	CACACCGTGTCAGTTAGC	AATAAGGAGGATTCCATGG
5	EMBRA8	CACAACTAAAAATCAAAACCC	AAAGAGCAGATTATTACAGAAGC
6	EMBRA10	GTAAAGACATAGTGAAGACATTCC	AGACAGTACGTTCTCTAGCTC
7	EMBRA11	GCTTAGAATTTGCCTAAACC	GTAAATCCATGGGCAAG
8	EMBRA16	CAACGTTCCCTTTCTTC	ATGTTAGGCCAAACCCAG
9	EMBRA18	CAGCTAGGATGTTAGACTTGG	GCACACCTAGAATTTTCAAACCTA
10	EMBRA22	GCACATGCACACACGGTTG	AAGGCCAGTGGTCGTGAGTC
11	EMBRA26	CCCACAACAAAAGGAAAAG	AGAGGTGTTTCGATTCAATTC
12	EMBRA33	CAATTTGCATGTCCAGTTTG	GCAGAAAGTTGATTGAAAGCA
13	EMBRA63	CATCTGGAGATCGAGGAA	GAGAGAAGGATCATGCCA
14	EMBRA69	ACCTTGTGATGGATGAAGC	CCCGACAAGGATGAGAAA
15	EMBRA108	CGCTAGTTGCTTCCATCTC	TTTCGTTGGAAGAGAGGC
16	EMBRA127	CAAGCTGTAGGGTTCCTTT	GTATAAGACCCAAAGACCCA
17	EMBRA148	GATTACAAGCCACACCGT	AGCCAAGTTGTATCAGAACC
18	EMBRA179	GTCGGCTCACAGCATGAA	GCCTCCAGTAGTTAACAGACG

เวิร์ส (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร) อย่างละ 1 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM) 0.8 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยารอบแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที รอบที่ 2-30 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 56 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และรอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 6% polyacrylamide gel แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย silver nitrate (Benbouza *et al.*, 2006) เพื่อเลือกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 3 ตัวอย่างได้ จากนั้นปรับสภาวะการทำพีซีอาร์ โดยปรับอุณหภูมิช่วง annealing ให้มีค่าแตกต่างจากอุณหภูมิเดิมโดยเริ่มจากอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส ถึงอุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส โดยการเพิ่มอุณหภูมิครั้งละ 1 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละคู่

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยูคาลิปตัส

เมื่อเลือกได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์แต่ละคู่แล้ว นำมาใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสทั้งหมด วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างยูคาลิปตัส โดยแปลผลข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอให้เป็นแบบไบนารี (binary) พันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ให้ค่าเป็น “1” ส่วนพันธุ์ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น ให้ค่าเป็น “0” แล้วนำมาหาค่าดัชนีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (similarity index) ด้วยวิธี simple matching (Sneath and Sokal, 1973) จัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี unweighed pair group method using arithmetic average (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.2 และแสดงผลในรูปของ dendrogram

การตรวจสอบยูคาลิปตัสโดย duplex PCR

เลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความ

ยาวแตกต่างกันมาจับคู่ แล้วทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกันแบบ duplex โดยในปฏิกิริยาใส่ไพรเมอร์ 2 คู่ ใช้ความเข้มข้นและโปรแกรมเดียวกับการทดสอบเพื่อเลือกคู่ไพรเมอร์

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ของยูคาลิปตัสจากฐานข้อมูล

จากการตรวจสอบข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ของยูคาลิปตัสพันธุ์นั้น จะเน้นข้อมูลงานวิจัยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ของ *E. camaldulensis* เนื่องจาก *E. camaldulensis* มีอัตราการรอดตายสูงกว่าสปีชีส์อื่นๆ และยังสามารถปลูกได้ในพื้นที่ดินเค็มด้วย (สมคิด, 2543) และยังไม่มีการวิจัยใด ที่ศึกษาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ของยูคาลิปตัสชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม พันธุกรรมของ *E. camaldulensis* มีความคล้ายคลึงกับพันธุกรรมของ *E. grandis* มากกว่ายูคาลิปตัสชนิดอื่น (Ottewell *et al.*, 2005) ดังนั้นจึงมุ่งไปที่ข้อมูลงานวิจัยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ของ *E. grandis* ซึ่งพบว่า Brondani *et al.* (1998) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เพื่อใช้ในการทำแผนที่และแยกความแตกต่างของยูคาลิปตัส 2 สปีชีส์คือ *E. urophylla* และ *E. grandis* ไพรเมอร์ที่ได้พัฒนาขึ้นมานั้นมีชื่อว่า EMBRA (*Eucalyptus* microsatellites from Brazil) ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 230 คู่ จากการตรวจสอบข้อมูลของไพรเมอร์ EMBRA ทั้งหมดนี้ พบว่ามีไพรเมอร์ 39 คู่ ที่มีผู้นำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในยูคาลิปตัสชนิดอื่นแล้วประสบผลสำเร็จ (นฤมล, 2547; จูติพร, 2551; Zucchi *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2007) จึงเลือกสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งหมด 39 คู่ เมื่อนำมาตรวจสอบกับยูคาลิปตัสในงานวิจัยครั้งนี้ มีเพียง 18 คู่ ที่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ (Table 2)

การตรวจสอบยูคาลิปตัสเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์และสถานะที่เหมาะสม

ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในครั้งนี้ พัฒนามาเพื่อแยกความแตกต่างของยูคาลิปตัส 2 สปีชีส์คือ *E. urophylla* และ *E. grandis* เมื่อนำมาใช้กับ *E. camaldulensis* ไพรเมอร์เหล่านี้อาจไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ จึงได้นำมาทดสอบกับยูคาลิปตัส 3 ตัวอย่าง คือพันธุ์ T5, K51 และลูกผสมระหว่าง *E. tereticornis* กับ *E. camaldulensis* พบว่า จากไพรเมอร์ 39 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 28 คู่ แต่เมื่อนำมาตรวจสอบกับตัวอย่างทั้งหมดสามารถแสดงให้เห็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของยูคาลิปตัสได้เพียง 18 คู่

จากการตรวจสอบเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ แม้ว่าไพรเมอร์ที่เลือกไว้จะแสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ แต่ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีลักษณะแบบส้อมแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีจำนวนมาก จึงจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนสถานะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใหม่ โดยการปรับอุณหภูมิในการทำพีซีอาร์ช่วง annealing ให้มีค่าแตกต่างจากอุณหภูมิเดิมโดยเริ่มจากอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส ถึงอุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิครั้งละ 1 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ได้ลองปรับเปลี่ยนวิธีในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยไม่ต้องทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ และแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน non-denaturing polyacrylamide gel ซึ่งพบว่าทำให้แถบดีเอ็นเอที่ได้น้อยลง และเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้จนครบทุกตัวอย่าง

การตรวจสอบดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมด

จากการทดลองปรับสถานะที่เหมาะสม พบว่าอุณหภูมิที่ดีที่สุดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 25 ตัวอย่างของไพรเมอร์ส่วนใหญ่ คือ ใช้อุณหภูมิช่วง annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส และจากการนำไพรเมอร์ที่ได้คัดเลือกไว้มาตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่ามีเพียง 18 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครบทั้ง 25 ตัวอย่าง ได้แก่ EMBRA

2, EMBRA 5, EMBRA 6, EMBRA 7, EMBRA 8, EMBRA 10, EMBRA 11, EMBRA 16, EMBRA 18, EMBRA 22, EMBRA 26, EMBRA 33, EMBRA 63, EMBRA 69, EMBRA 108, EMBRA 127, EMBRA 148 และ EMBRA 179 ดังตัวอย่างใน Figure 1 ส่วนบางไพรเมอร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียงบางตัวอย่าง จึงไม่ได้นำมาใช้ ทั้งนี้เนื่องจากจากไพรเมอร์ไม่ได้พัฒนามาจาก *E. camaldulensis* โดยตรง สอดคล้องกับงานวิจัยของ จูติพร (2551) ที่ได้ใช้ไพรเมอร์ EMBRA ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน *E. camaldulensis* ซึ่งพบว่าไพรเมอร์ที่นำมาใช้นั้น ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบว่าแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีจำนวนมากเช่นเดียวกับงานวิจัยของ นฤมล (2547) ที่ได้ใช้ไพรเมอร์ EMBRA ในการตรวจสอบยูคาลิปต์สลูกผสมระหว่าง *E. camaldulensis* กับ *E. tereticornis* ซึ่งพบว่ามีแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และงานวิจัยของ Rocha *et al.* (2002) ที่ได้ใช้ไพรเมอร์ EMBRA ในการศึกษาความหลากหลายของยูคาลิปต์ส 15 ชนิด พบว่าใช้จำแนกแต่ละชนิดได้ แต่บางไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ครบทุกตัวอย่าง อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ที่นำมาใช้เหล่านี้ สามารถแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมได้สูง

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่าง

จากการตรวจสอบดีเอ็นเอตัวอย่างทั้งหมด พบว่า ไพรเมอร์ที่ใช้ทั้ง 18 คู่ มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทั้งหมด 152 แถบ และเมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.2 โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนด้วยวิธี simple matching จากนั้นนำค่าที่ได้มาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบของ phylogenetic tree ที่คำนวณค่าดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index) 0.63 สามารถแบ่งตัวอย่างยูคาลิปต์สที่นำมาศึกษาออกเป็น 4 กลุ่ม (Figure 2) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยยูคาลิปต์สลูกผสม 129/18, 88/23, 208/12, 11/11 ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่าง 0.605-0.684 ซึ่งตัวอย่างที่มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงมากที่สุดในกลุ่มนี้ คือ 88/23 กับ 208/12 (0.684) ส่วนตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด คือ 11/11 กับ 129/18 (0.605)

กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วยกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม 2-1 ประกอบไปด้วยยูคาลิปต์สพันธุ์ D1, K69, K51 และลูกผสม 178/23, 44/23, 109/14, 226/23, 236/23, 196/18, 112/21 ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่าง 0.592-0.730 ซึ่งตัวอย่างที่มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงมากที่สุดในกลุ่มนี้ คือ 226/23 กับ K51 (0.730) ส่วนตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด คือ

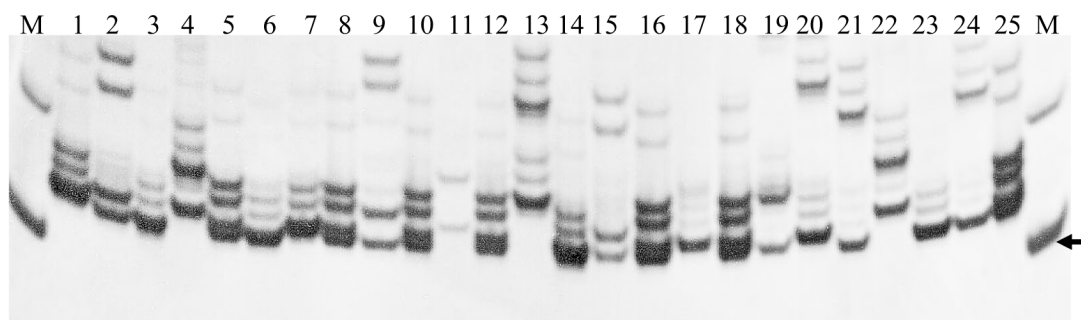


Figure 1 DNA fingerprints of 25 eucalyptus clones amplified using EMBRA 179 primer. M : molecular weight marker, 1-25 : numbers of 25 eucalyptus clones as shown in Table 1, the right arrow represents 125 bp DNA marker.

K69 กับ 226/23 (0.592) กลุ่ม 2-2 ประกอบไปด้วยยูคาลิปต์สายพันธุ์ K61 และลูกผสม 22/13, 88/12, 208/12, 188/17, 188/18, 163/24, 72/8, 228/17 ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่าง 0.579-0.730 ซึ่งตัวอย่างที่มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงมากที่สุดในกลุ่มนี้คือ 22/13 กับ 88/12 (0.730) ส่วนตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด คือ K61 กับ 208/12 (0.579)

กลุ่มที่ 3 และ กลุ่มที่ 4 ประกอบไปด้วยยูคาลิปต์ลูกผสมเพียงตัวอย่างเดียว คือ 119/11 และ 227/7 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่ 3 และ 4 มีความสัมพันธ์กับยูคาลิปต์ตัวอย่างอื่นน้อยมาก จึงถูกแยกออกมาเป็นกลุ่มใหม่

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโคลนพันธุ์ยูคาลิปต์ด้วย phylogenetic tree พบว่าพันธุ์ D1 และ K51 ที่เป็น *E. camaldulensis* กับ K69 ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง *E. camaldulensis* กับ *E. pellita* ถูก

จัดอยู่ในกลุ่ม 2-1 แสดงให้เห็นว่ามีความใกล้ชิดกัน แต่ในตัวอย่างพันธุ์ K61 ที่เกิดจากการผสมระหว่าง *E. brassiana* กับ *E. grandis* ถูกจัดไปอยู่ในกลุ่ม 2-2 ซึ่งมีความสัมพันธ์น้อยกว่าในบรรดาลูกผสมจากสายพันธุ์ต่างๆ สายพันธุ์ 226/23 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์ K51 มากที่สุด น่าจะเกิดจากการคัดเลือกสายพันธุ์ ซึ่งเลือกจากลักษณะที่ดีหลายๆ ประการ จึงมีแนวโน้มเหมือนกับพันธุ์ทางการค้าที่ผ่านการปรับปรุงและคัดเลือกมาก่อน และในสายพันธุ์ลูกผสมด้วยกันเองพบว่าลูกผสมสายพันธุ์ที่ 188 ต้นที่ 17 มีความใกล้ชิดกับสายพันธุ์ที่ 208 ต้นที่ 12 มากกว่าลูกผสมสายพันธุ์ที่ 188 ต้นที่ 18 ซึ่งเป็นลูกผสมที่มาจากสายพันธุ์เดียวกัน และในลูกผสมสายพันธุ์ที่ 88 ต้นที่ 12 ก็มีความใกล้ชิดกับลูกผสมสายพันธุ์ที่ 22 ต้นที่ 13 มากกว่าลูกผสมสายพันธุ์ที่ 88 ต้นที่ 23 ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาใช้ทั้งหมด ได้มาจากการเพาะพันธุ์

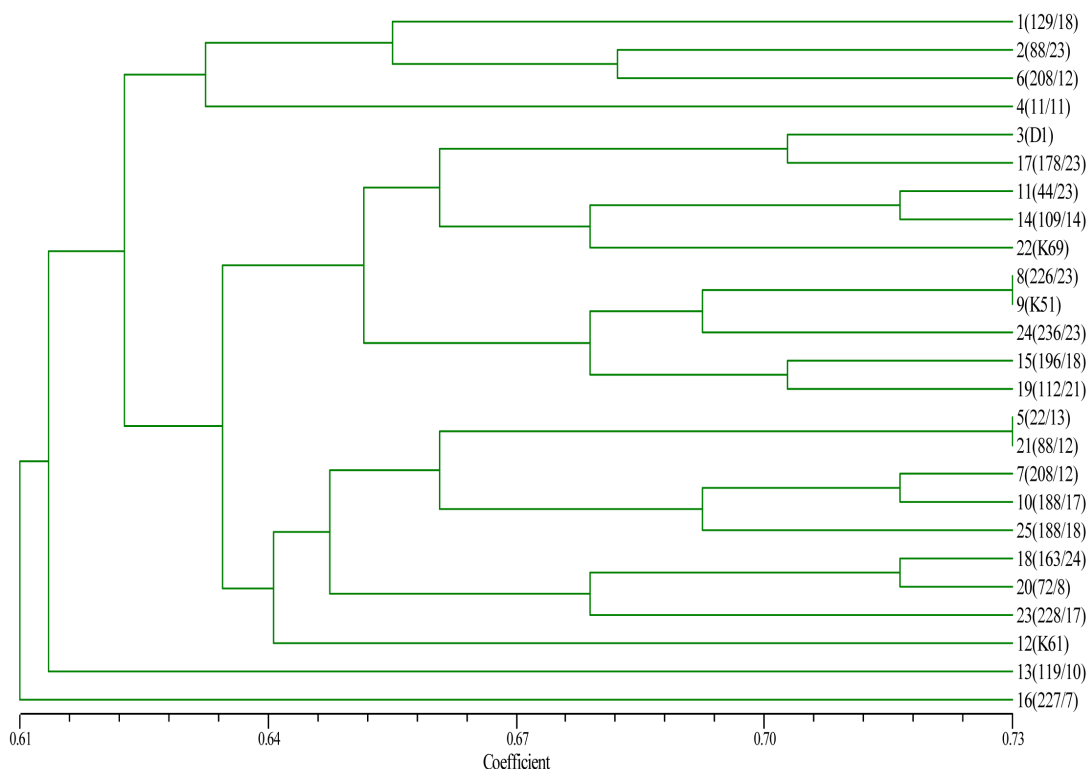


Figure 2 Phylogenetic tree of 25 eucalyptus clones based on 18 microsatellite markers using UPGMA method of NTSYS-pc 2.2 program.

ด้วยเมล็ดจึงทำให้พันธุกรรมมีความหลากหลายอยู่มาก แต่ละสายพันธุ์ที่ศึกษายังมีพันธุกรรมไม่คงตัว จึงมีการกระจายของลักษณะในรุ่นลูก เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย phylogenetic tree จึงมีความใกล้ชิดกันน้อยและการจัดกลุ่มที่ได้ยังไม่ขึ้นกับแหล่งกำเนิดของต้นพ่อแม่พันธุ์ด้วย

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ duplex PCR

Duplex PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน เพื่อลดค่าใช้จ่ายและประหยัดเวลาในการตรวจสอบ แต่ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้แต่ละคู่จะต้องมีขนาดแตกต่างกันโดยได้เลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความยาวแตกต่างกันมาจับคู่ แล้วทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกัน พบว่าเลือกคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 4 คู่ คือไพรเมอร์ EMBRA 2 กับ

EMBRA 22, EMBRA 2 กับ EMBRA 63, EMBRA 22 กับ EMBRA 69 และ EMBRA 63 กับ EMBRA 69 เมื่อนำแต่ละคู่มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกัน แล้วนำมาแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 6% polyacrylamide gel ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า คู่ไพรเมอร์ ทุกคู่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ duplex ได้ และแสดงให้เห็นความหลากหลายทางพันธุกรรมได้อย่างชัดเจน ดังตัวอย่างใน Figure 3 จึงทำให้ประหยัดทั้งเวลาและสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบเพื่อคัดพันธุ์ยูคาลิปตัสที่ต้องการได้อย่างรวดเร็วด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการตี

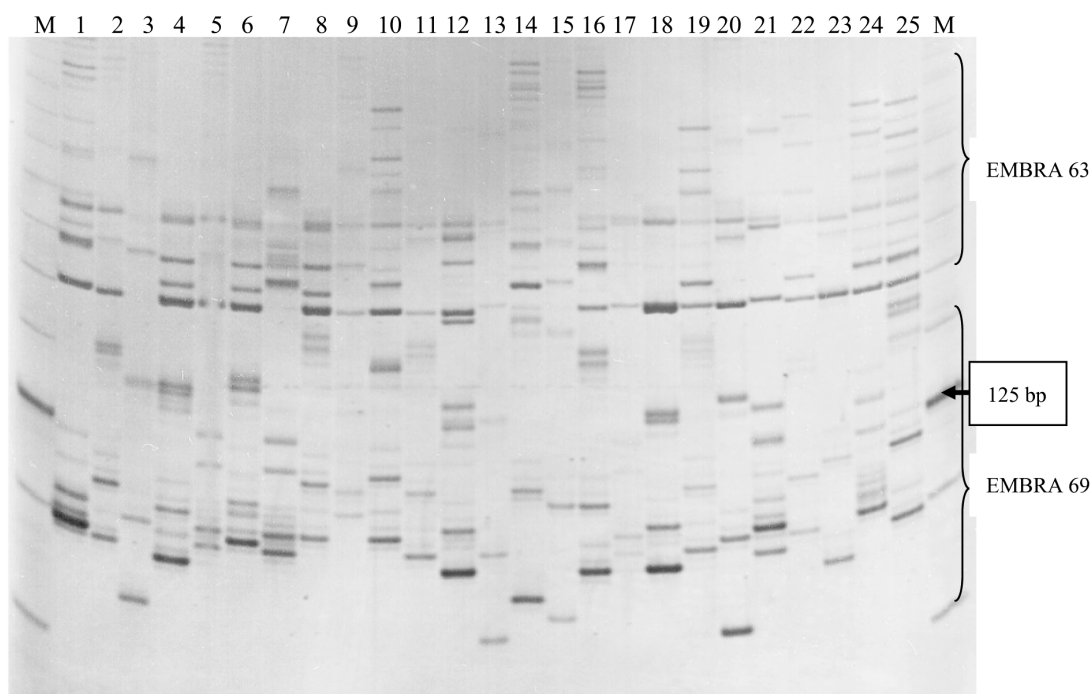


Figure 3 DNA fingerprints of 25 eucalyptus clones amplified as duplex PCR using EMBRA 63 and EMBRA 69 primers. M: molecular weight marker, 1-25: numbers of 25 eucalyptus clones as shown in Table 1, the right arrow represents 125 bp DNA marker.

พิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ และขอขอบพระคุณ ดร.สาพิศ ดิลกสัมพันธ์ ภาควิชาวนวัฒนวิทยา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ตัวอย่างยูคาลิปตัส

เอกสารอ้างอิง

- กรมป่าไม้. 2542. *ยูคาลิปตัส กามาลดูเลนซิส*. พิมพ์ครั้งที่ 3. ส่วนปลูกป่าภาคเอกชน สำนักส่งเสริมการปลูกป่า กรมป่าไม้.
- เกษมสุข เกษสกุล. 2533. *ยูคาลิปตัสพันธุ์ไม้เศรษฐกิจที่มีค่าทั้งปัจจุบันและอนาคต*. กองอนุรักษ์ต้นน้ำ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- จิตติพร สายมณี. 2551. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Eucalyptus camaldulensis* โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- นฤมล ชนนันต์. 2547. การตรวจสอบยูคาลิปตัสด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอและการถ่ายยีน HAL2 เข้าสู่ยูคาลิปตัสลูกผสม *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus tereticornis*. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมคิด สิริพัฒน์ดิลก และ สุธีร์ ดวงใจ. 2543. การปรับปรุงผลผลิตเนื้อไม้ยูคาลิปตัสโดยการสร้างลูกผสม. ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Agrawal, G.R., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P.A. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris*. *Biotech Biodiv Lett* 2: 19-24.
- Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P. and Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR marker in polyacrylamide gels. *Biotechnol Agron Soc Environ* 10: 77-81.
- Brondani, R.P.V., Brondani, C., Tarchini, R. and Grattapaglia, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophilla*. *Theor Appl Genet* 97: 816-827.
- Brondani, R.P.V., Brondani, C., Tarchini, R. and Grattapaglia, D. 2002. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. *Mol Genet Genomics* 267: 338-347.
- Clauss, M.J., Cobban, H. and Mitchell-Olds, T. 2002. Cross-species microsatellite markers for elucidating population structure in *Arabidopsis* and *Arabis* (Brassicaceae). *Mol Ecol* 11: 591-601.
- Grattapaglia, D., Ribeiro, V.J. and Rezende, G.D.S.P. 2004. Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for *Eucalyptus*. *Theor Appl Genet* 109: 192-199.
- Juillet, N., Freymond, H., Degen, L. and Goudet, J. 2003. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite loci in the bladder campion, *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae). *Mol Ecol Notes* 3: 358-359.
- Kirst, M., Cordiero, C.M., Rezende, G.D.S.P. and Grattapaglia, D. 2005. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. *J Hered* 96: 161-166.
- Ottewell, K.M., Donnellan, S.C., Moran, G.F. and Paton, D.C. 2005. Multiplexed microsatellite markers for the genetic analysis of *Eucalyptus leucoxylon* (Myrtaceae) and their utility for ecological and breeding studies in other *Eucalyptus* species. *J Hered* 96: 445-451.
- Rocha, R.B., Abad, J.I.M., Pires, I.E. and Araujo,

- E.F. 2002. Fingerprint and genetic diversity analysis of *Eucalyptus* spp. genotypes using RAPD and SSR markers. *Scientia Forestalis* 62: 24-31.
- Santos, K.L., Welter, L.J., Dantas, A.C., Guerra, M.P., Ducroquet, J.P. and Nodari, R.O. 2007. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. *Genet Mol Biol* 30: 73-79.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Soliva, M., Gautshi, B., Salzmänn, C., Tenzer, I. and Widmer, A. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the orchid *Ophrys araneola* (Orchidaceae) and a test cross-species amplification. *Mol Ecol* 9: 2178-2179.
- Steane, D.A., Vaillancourt, R.E., Russell, J., Powell, W., Marshall, D. and Potts, B.M. 2001. Development and characterisation of microsatellite loci in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Silvae Genetica* 50: 89-91.
- Yu, K., Park, S.J. and Poysa, V. 1999. Abundance and variation of microsatellite DNA sequence in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome* 42: 27-34.
- Zucchi, M.I., Brondani, R.P.V., Pinheiro, J.B., Brondani, C. and Vencovsky, R. 2002. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Mol Ecol Notes* 2: 512-513.