

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ต่างกันใบประดับ ของบัวชั้นโดยเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์

Detection of Differential Gene Expression in Bracts of *Curcuma petiolata* Roxb. by DDRT-PCR Technique

ทิพย์วรรณ ใจภา^{1/} ไสระยา ร่วมรังษี^{1/} และ วิณัน บัณฑิตย^{1/, 2/}
Thippawan Chaipar^{1/}, Soraya Ruamrungsri^{1/} and Weenun Bundithya^{1/, 2/}

Abstract: *Curcuma petiolata* Roxb. has been assigned into subgenera of Eucurcuma. Morphological characteristics of *Curcuma* sp. such as flower color, inflorescence length, as well as the proportion of bract color between upper coma bracts and lower bracts are not easily differentiated. In this study, DDRT-PCR was used to determine the differential gene expression in 2 groups of *C. petiolata* Roxb. with different inflorescence characters. Young leaves, bracts and coma bracts at the pre-blooming, flowering and first floret blooming stage were used for RNA extraction, and later reversed into cDNA. Fifty eight primers were screened for analysis of differential gene expression. It was found that 2 primers, OPD 08 and OPD 20, with oligo dT₁₂ VA were able to amplify DNA specific to *C. petiolata* Roxb. with different color proportions.

Keywords: DDRT-PCR, gene expression, *Curcuma petiolata* Roxb.

^{1/} ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

^{2/} ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานับพันศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) จ.นครปฐม 73140

^{1/} Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^{2/} Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office, Commission on Higher Education, Ministry of Education. (AG-BIO/PERDO-CHE), Nakhon Pathom 73140, Thailand

บทคัดย่อ: บัวขึ้น (*Curcuma petiolata* Roxb.) เป็นพืชที่อยู่ในกลุ่มกระเจียว (*Eucurcuma*) ลักษณะทางสัณฐานของพืชในกลุ่มนี้ใกล้เคียงกัน เช่น สีของช่อดอก ความยาวช่อดอก รวมทั้งสัดส่วนสีของใบประดับส่วนล่าง (bract) และใบประดับส่วนบน (coma bract) การจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวทำได้ยาก ในงานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ มาศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในบัวขึ้นสองกลุ่ม ที่มีลักษณะช่อดอกแตกต่างกัน โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อน ใบประดับส่วนล่าง และใบประดับส่วนบน ในระยะช่อดอกตูม ช่อดอกบาน และดอกจริงดอกแรกบาน จากนั้นนำมาทำ reverse transcription ให้เป็น cDNA วิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของยีนโดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 58 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 2 คู่ คือ OPD 08 และ OPD 20 ร่วมกับ oligo dT₁₂VA เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อบัวขึ้นที่มีสัดส่วนสีในช่อดอกต่างกันได้

คำสำคัญ: ดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ การแสดงออกของยีน *Curcuma petiolata* Roxb.

คำนำ

บัวขึ้น (*Curcuma petiolata* Roxb.) เป็นพืชในกลุ่มกระเจียว (*Eucurcuma*) ถิ่นกำเนิดอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย (สุรวิชัย, 2539) ลักษณะลำต้นใต้ดินเป็นแบบไรโซม ระบบรากเป็นรากฝอยและมีตุ่มสะสมอาหาร ใบของบัวขึ้นเป็นใบเดี่ยว ลำต้นที่ขึ้นมาเหนือดินเป็นลำต้นเทียมเกิดจากกาบใบรวมตัวกัน ลำต้นใต้ดินเป็นส่วนที่สร้างช่อดอก ซึ่งช่อดอกจะแทงออกมาจากบริเวณปลายยอดของลำต้นเทียม ลักษณะของช่อดอกประกอบด้วย ใบประดับรูปไข่เรียงสลับกันในแต่ละชั้น ใบประดับแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือใบประดับส่วนบนมีสีขาวปลายสีชมพูอมม่วงมี 5-6 ชั้น ในส่วนนี้ไม่มีดอก และใบประดับส่วนล่างมีสีเขียวอ่อนที่ปลายมีอยู่ 10-15 ชั้น เป็นส่วนที่มีดอก (อดิศร, 2541) บัวขึ้นส่วนใหญ่นำไปใช้ประโยชน์โดยการปลูกเป็นไม้กระถางและไม้ตัดดอก (ยุทธศักดิ์, 2542) ประเทศไทยส่งออกบัวขึ้นในรูปของหัวพันธุ์ไปยังประเทศในเขตนานา แถบยุโรป ญี่ปุ่น อเมริกา (พิชัย, 2547) และจากความต้องการของตลาดทำให้มีการผสมพันธุ์พืชในกลุ่มปทุมมาและกระเจียวได้พันธุ์ใหม่มากขึ้น อย่างไรก็ตามเนื่องจากสภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะที่ปรากฏ การใช้ลักษณะทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอสำหรับการจัดจำแนกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีพืชที่มีฟีโนไทป์ใกล้เคียงกัน ดังจะเห็นได้จากการจัดแบ่งพืชสกุลขมิ้นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน สามารถจัดแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่ม แต่เมื่อทำการศึกษารูปแบบไอโซไซม์สามารถแยกพืชสกุล

ขมิ้นออกเป็น 3 กลุ่ม (หทัยรัตน์, 2545) เพื่อช่วยในการจัดจำแนกและคัดเลือกพันธุ์ให้มีความแม่นยำมากขึ้น จึงมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม (สุรินทร์, 2545) เช่น การใช้ microsatellite markers ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานในการจัดจำแนกสายพันธุ์ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ที่ได้จากบริเวณต่างๆ ของประเทศไทย สามารถจำแนกได้ 3 กลุ่ม (นันทวรรณ, 2549)

วิธีการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ซึ่งเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ (differential display reverse transcription-PCR) เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งมีศักยภาพสูงในการค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันในระดับอาร์เอ็นเอ เพื่อใช้จัดจำแนกและแยกยีนที่แสดงออกภายใต้สภาพที่หลากหลายไม่ว่าจะเป็นในเนื้อเยื่อที่ต่างกัน หรือภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลง (Liang and Pardee, 1992) ด้วยวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่มีการแสดงออกในแต่ละส่วนของพืช ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ จากนั้นทำ reverse transcription จาก mRNA ให้เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase และ anchored primer นำ cDNA ที่ได้ไปคัดกรองแถบ cDNA ด้วย random arbitrary primer และตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันโดยใช้โพลีอะคริลามายด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Stein and Liang, 2002) เมื่อได้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกันจากดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ จึงนำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปหาลำดับเบส (Krutmuang, 2003) ซึ่งจะทำให้ทราบข้อมูลทาง

พันธุ์กรรม โดยลำดับเบสที่ได้สามารถนำไปออกแบบ
ไพรเมอร์ (primer) หรือโพรบ (probe) เพื่อใช้ในการ
จำแนกพันธุ์ ตรวจสอบสายพันธุ์ผสม และยังสามารถ
ใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดนั้นๆ

สำหรับกลุ่มตัวอย่างบัวชั้นที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้
มีลักษณะต่างๆ ของช่อดอกใกล้เคียงกัน เช่น ความยาว
ช่อดอก สีดอก รวมทั้งสัดส่วนสีของใบประดับส่วนบนและ
ใบประดับส่วนล่าง ซึ่งลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมโดยยีนที่
มีความจำเพาะเจาะจง วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้
เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในบัวชั้นที่มีลักษณะ
ใบประดับต่างกัน โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลคือเทคนิค
ดีอาร์ที-พีซีอาร์

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพันธุ์พืช

พันธุ์พืชที่ใช้คือบัวชั้นที่มีความแตกต่างกันสอง
กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ต้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3
ของช่อดอก และกลุ่มที่ 2 ต้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า
1 ใน 3 ของช่อดอก (ภาพที่ 1) ปลูกหัวของบัวชั้นลงในถุง
ดำขนาด 6×12 นิ้ว ณ เรือนเพาะชำคณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สุ่มเก็บตัวอย่างพืช ในระยะการ
เจริญเติบโต 4 ระยะ ได้แก่ ระยะใบอ่อน ระยะช่อดอกตูม
ระยะช่อดอกบาน และระยะดอกจริงดอกแรกบาน กลุ่มละ
12 ต้น ต้นละ 1 ตัวอย่าง

การสกัด RNA

เก็บตัวอย่างใบ ใบประดับส่วนล่าง และใบประดับ
ส่วนบนของบัวชั้นจากแปลงในระยะต่างๆ ที่กล่าวข้างต้น
แช่ในน้ำแข็งทันที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เพื่อนำไป
สกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดน้ำยา Trizol™ reagent
(Invitrogen, U.S.A.) ตามวิธีที่แนบมากับชุดสารเคมี
(http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf) จากนั้นจึงนำ อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ทำ
DNase digestion เพื่อกำจัด genomic DNA ในปฏิกิริยา
ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอ, 1X DNase buffer, 1 mM
MgCl₂, 10 mM DTT, diH₂O และ 5U DNaseI บ่มที่
อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 2.5 mM

EDTA หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็น
เวลา 10 นาที ตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอ ที่ได้ด้วย
วิธี อกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การสังเคราะห์ cDNA

ใช้ชุดน้ำยา SuperScript III first-strand
synthesis system for RT-PCR (Invitrogen, U.S.A.) ใน
การสังเคราะห์ cDNA ตามวิธีที่แนบมากับชุดสารเคมี
(http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscriptIIIfirststrand_pps.pdf) นำ cDNA ที่ได้มา
ตรวจสอบคุณภาพด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์
ndhB up (5'-ATG GTT TCT CTT GGC TAT ATG G-3')
และ ndhB down (5'-GCA TAC GTT TCA TGC TTG
TTT GAG-3')

การทดสอบไพรเมอร์

ใช้ cDNA จากตัวอย่างพืชทั้งสองกลุ่ม ใน 4 ระยะ
ได้แก่ ระยะใบอ่อน ระยะช่อดอกตูม ระยะช่อดอกบาน
และระยะดอกจริงดอกแรกบาน (ในช่อดอกแต่ละระยะ
แยกส่วนของใบประดับส่วนล่างและใบประดับส่วนบน)
รวมกัน เพื่อนำมาคัดกรองคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำดีอาร์
ที-พีซีอาร์ ประกอบด้วย forward primer 58 ชนิด ซึ่งมี
ขนาด 10 bp (OPD01-OPD20, OPF01-OPF20,
OPAB11-OPAB19 และ AP-A01- AP-A10 บริษัท 1st
Base ประเทศมาเลเซีย) และ reverse primer 2 ชนิด
ขนาด 14 bp คือ oligo dT₁₂VA และ oligo dT₁₂VG ทำ
ปฏิกิริยาด้วยเงื่อนไขพีซีอาร์ อ้างอิงจาก จิรพิพรรธ
(2549) เจือจางผลผลิตพีซีอาร์ ด้วย diH₂O ในอัตราส่วน
1:20 เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา PCR รอบที่สอง
โดยใช้เงื่อนไขสำหรับทำปฏิกิริยาเหมือนกับครั้งแรก
ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยโพลีอะคริลามายด์เจลอิเล็กโตรโฟรี-
ซิส ย้อมแผ่นเจลที่ได้ด้วย silver nitrate

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน
โดยเทคนิคดีอาร์ที-พีซีอาร์ คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้
ลักษณะของแถบหลากหลายและมีความคมชัด ใช้
ไพรเมอร์ที่คัดเลือก 6 ไพรเมอร์คือ OPD 03, OPD 07,

OPD 08, OPD 20, OPF 10 และ OPAB 11 คู่กับ reverse primer oligo dT₁₂VA ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ ขั้นตอนการทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่อ้างอิงจากจิรพิพรร (2549) วิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การสกัด RNA

บัวชั้นที่ใช้ในการทดลองสองกลุ่มมีลักษณะที่แตกต่างกันคือ ในกลุ่มที่ 1 มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก ส่วนกลุ่มที่ 2 มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก (ภาพที่ 1) อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ในเบื้องต้น (ภาพที่ 2A) พบว่ามีการปนเปื้อนของ genomic DNA ซึ่งอาจส่งผลต่อการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน เนื่องจาก genomic DNA ทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่ถูกต้อง (Dunican *et al.*, 1997) จึงต้องกำจัดการปนเปื้อนที่เกิดขึ้น โดยใช้เอนไซม์ DNaseI (ภาพที่ 2B) ก่อนการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ oligo dT การตรวจสอบคุณภาพของ cDNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ ไพรเมอร์ที่ใช้คือ ndhB up และ ndhB down ผลที่ได้คือพบแถบของ cDNA ที่เกิดขึ้นมีขนาดประมาณ 500 bp (ภาพที่ 2C) เพียงแถบเดียวตรงตามขนาดที่คาดหวัง แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ cDNA

ประสบความสำเร็จและไม่มีการปนเปื้อนของ genomic DNA ซึ่งถ้าหากมีการปนเปื้อนของ genomic DNA จะพบแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าแถบของ cDNA ที่เกิดขึ้น (Maier *et al.*, 1992)

การคัดกรองคู่ไพรเมอร์

การคัดกรองคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมคือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และผลผลิตที่ได้มีปริมาณมาก ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งแรก พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณได้ แต่มีลักษณะเป็นรอยยาวต่อเนื่อง และไม่ปรากฏแถบของ ดีเอ็นเอ (ภาพที่ 3A) เนื่องจากขนาดของแถบดีเอ็นเอมีขนาดใกล้เคียงกันและแถบที่เกิดขึ้นมีจำนวนมาก (สุรินทร์, 2552) อาจเกิดจากไพรเมอร์ที่ใช้เป็นแบบสุ่มและมีขนาดสั้นเพียง 10 นิวคลีโอไทด์ เกิดการจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายตำแหน่ง ทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบจำนวนมาก อย่างไรก็ตามเมื่อนำผลผลิตของ PCR ที่ได้ในครั้งแรกมาเจือจางเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 2 โดยใช้คู่ไพรเมอร์เดิม พบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นชัดเจน (ภาพที่ 3B) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์สามารถเข้าไปจับกับตำแหน่งที่จำเพาะมากขึ้นจากการเพิ่มปริมาณของผลผลิตจากพีซีอาร์ในครั้งแรก สอดคล้องกับ Roux *et al.* (1998) ที่ศึกษาการหายีนที่ตอบสนองต่อออกซินใน

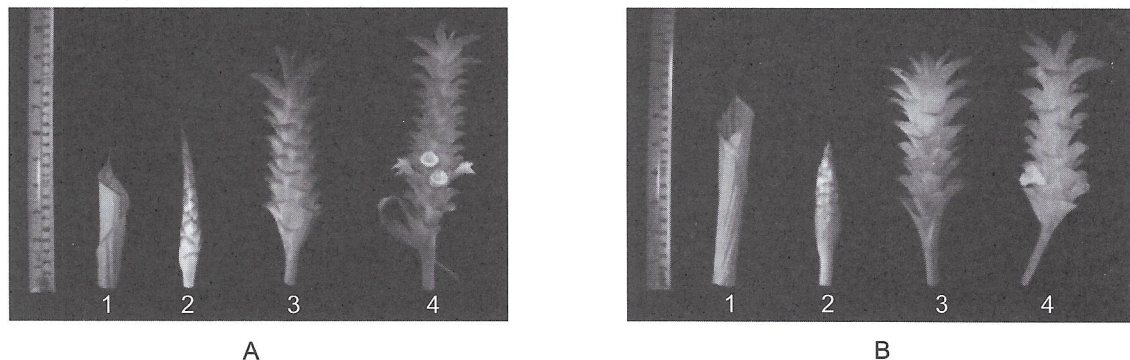


Figure 1 Sampling stages of *Curcuma petiolata* Roxb.

A: pink coma bract more than 1/3 of inflorescence; B: pink coma bract less than 1/3 of inflorescence; 1: young leaf stage; 2: pre-blooming stage; 3: flowering stage; 4: first floret blooming stage

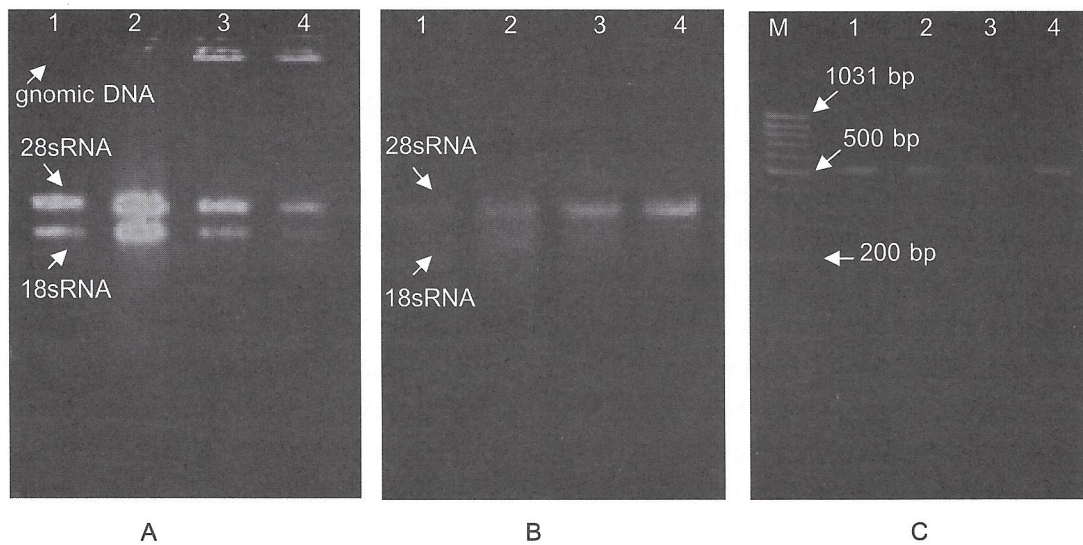


Figure 2 Total RNA and cDNA from each stage of *Curcuma petiolata* Roxb.

A: total RNA without DNase digestion; B: DNase-digested RNA; C: PCR product amplified by ndhB up/down primer

Lane M is GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; lanes 1-4 are young leaf stage, pre-blooming stage, flowering stage and first floret blooming stage, respectively.

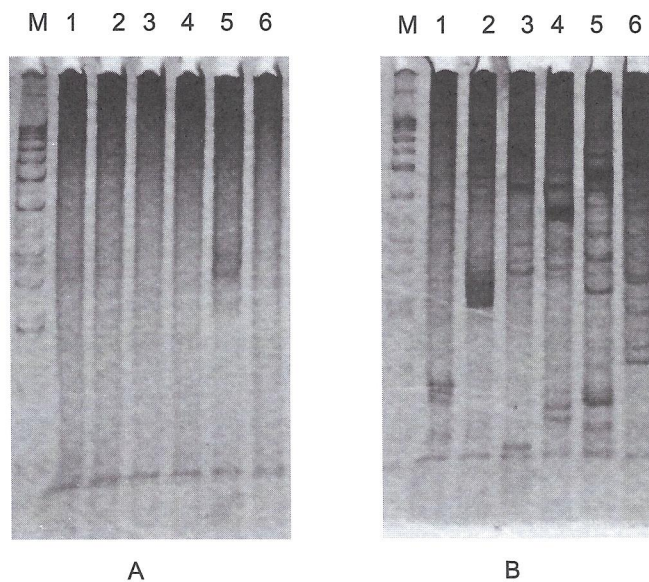


Figure 3 Amplification of *Curcuma petiolata* Roxb. cDNA by selected primers of DDRT-PCR

A: PCR cycle 1; B: PCR cycle 2

Lane M is GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; 1: OPD 03; 2: OPD 07; 3: OPD 08; 4: OPD 20; 5: OPF 10; 6: OPAB 11.

ต้นยาสูบวิธี mRNA differential display โดยทำพีซีอาร์ สองครั้งเช่นกัน ซึ่งในรอบแรกทำพีซีอาร์ 40 รอบ ลักษณะ แถบที่เกิดขึ้นเป็นรอยยาวหนา แถบของดีเอ็นเอไม่ชัดเจน ทำให้ยากต่อการวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อให้ได้ผลดีจึงใช้ พีซีอาร์ ในรอบแรกมาเจือจางในอัตราส่วนหนึ่งต่อสิบ แล้ว นำไปทำพีซีอาร์ อีก 25 รอบ พบว่าแถบของดีเอ็นเอมีความชัดเจนมากขึ้น ซึ่งการทำปฏิกิริยา พีซีอาร์ครั้งที่ 2 ทำให้ลดรอยยาวของแถบที่เกิดขึ้น และง่ายต่อการ วิเคราะห์แถบของดีเอ็นเอที่ได้ เมื่อทำการคัดเลือกคู่ โพรเมอร์ จาก forward primer 58 ชนิด คัดเลือกได้ 6 โพรเมอร์คือ OPD 03, OPD 07, OPD 08, OPD.20, OPF 10 และ OPAB 11 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป้าหมายได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต และทุกส่วนของ บัวขึ้น สำหรับ reverse primer 2 ชนิด คือ oligo dT₁₂VA และ oligo dT₁₂VG พบว่า oligo dT₁₂VG ที่คู่กับ forward primer ทั้ง 6 ชนิด ให้ลักษณะแถบที่ไม่ค่อยมีความ แตกต่างกันระหว่างบัวขึ้นทั้งสองกลุ่ม (ไม่แสดงข้อมูล) แถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น monomorphic band คือทุกตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันในตำแหน่ง เดียวกัน แสดงว่าคู่โพรเมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณของ ดีเอ็นเอในบริเวณที่ไม่มีความแตกต่าง ทางพันธุกรรม ส่วน oligo dT₁₂VA ให้ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่มีความ แตกต่างกัน (polymorphic band) คือมีแถบดีเอ็นเอที่ ปรากฏในตำแหน่งเดียวกันแตกต่างกัน (กฤษณา, 2548) จึงสามารถนำไปใช้แยกความแตกต่างระหว่างบัวขึ้นทั้งสองกลุ่มได้

การแสดงออกของยีนในบัวขึ้น

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ต่างกัน ระหว่างบัวขึ้นสองกลุ่ม ที่มีสีของใบประดับต่างกัน โดยใช้ โพรเมอร์ 6 ชนิด คู่กับ oligo dT₁₂VA พบว่า OPD 08 และ OPD 20 ให้แถบที่มีลักษณะเฉพาะ เมื่อใช้โพรเมอร์ OPD 08 พบว่าให้แถบที่แตกต่างกัน 2 ขนาดคือ 835 bp และ 591 bp พบเฉพาะในบัวขึ้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก โดยแถบขนาด 835 bp แสดงออก เฉพาะในใบประดับส่วนบน ส่วนแถบขนาด 591 bp แสดงออกในใบประดับส่วนล่าง และ ใบประดับส่วนบน (ภาพที่ 4A) เนื่องจากใบประดับส่วนล่าง และใบประดับ

ส่วนบน มีลักษณะที่แตกต่างกันคือ ในส่วนของ ใบประดับ ส่วนล่างเป็นที่อยู่ของช่อดอกย่อย โคนของใบประดับ ส่วนล่างจะเชื่อมติดกันเกิดเป็นลักษณะคล้ายถ้วย แต่ใบประดับส่วนบนไม่มีช่อดอกย่อย มี 2-3 ชั้น และโคนของใบประดับส่วนบนไม่เชื่อมติดกัน (สุรวิช, 2539; อติศร, 2541) จากลักษณะที่มีความแตกต่างดังกล่าว การปรากฏแถบ เฉพาะในใบประดับส่วนบน ซึ่งอาจสัมพันธ์กับยีนที่ ควบคุมลักษณะของใบประดับส่วนบน ในขณะที่แถบพบ ทั้งใบประดับส่วนล่าง และใบประดับส่วนบน สัมพันธ์กับ ยีนที่ควบคุมลักษณะร่วมของทั้งสองส่วน การใช้โพรเมอร์ OPD 08 ร่วมกับ oligo dT₁₂VA ไม่สามารถตรวจสอบการ แสดงออกของยีนในใบประดับส่วนบนที่ระยะช่อดอกบาน และระยะดอกจริงดอกแรกบาน เมื่อเทียบกับระยะช่อดอก ตุม แสดงว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นยีนที่แสดงออก เฉพาะในระยะช่อดอกตูม สำหรับโพรเมอร์ OPD 20 ให้ แถบขนาด 939 bp ในบัวขึ้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก ซึ่งมีการแสดงออกเฉพาะในใบประดับ ส่วนบนที่ระยะช่อดอกบาน และระยะดอกจริงดอกแรก บาน (ภาพที่ 4B) เป็นผลของยีนที่แสดงออกในระดับที่ ตรวจสอบได้ในระยะตั้งแต่ช่อดอกบาน ส่วนในกลุ่มบัวขึ้น ที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก พบแถบ ของดีเอ็นเอที่ไม่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง แสดงให้ เห็นว่ายีนนี้มีการแสดงออกในทุกระยะการเจริญเติบโต การปรากฏแถบที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มบัวขึ้นนี้ หากได้มีการ วิเคราะห์เพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่างที่มากขึ้นหรือ ออกแบบโพรเมอร์ให้มีความจำเพาะมากขึ้น สามารถ นำไปใช้ประโยชน์ในการแบ่งกลุ่มของบัวขึ้นที่มีลักษณะ ของใบประดับแตกต่างกัน ซึ่งช่วยให้การจำแนกหรือ คัดเลือกพันธุ์ได้ถูกต้องและรวดเร็ว โดยพิจารณาจากแถบ ของดีเอ็นเอที่ปรากฏในแต่ละระยะของการพัฒนาของช่อดอก มีรายงานการใช้เทคนิคดีอาร์ที-พีซีอาร์ สามารถ คัดเลือกต้นเพศผู้และต้นเพศเมียใน *Piper longum* ใน ระยะต้นอ่อน พบว่าเกิดแถบของดีเอ็นเอ ที่แตกต่างกัน 48 แถบ อยู่ในกลุ่มของเพศเมีย 32 แถบ ส่วนในกลุ่มเพศผู้พบ 16 แถบ (Manoj et al., 2008) และยังมีการใช้เทคนิคนี้ วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการพัฒนาของ ดอกใน *Calanthe discolor* และ *C. sieboldii* มียีนที่ แสดงออกต่างกันทั้งหมด 66 ยีน พบใน *C. discolor*

26 ยีน และใน *C. sieboldii* อีก 40 ยีน ซึ่งการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการและการส่งสัญญาณของฮอร์โมน ที่แตกต่างกันของทั้งสองชนิด (Park *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามจะต้องดำเนินการเพิ่มเติมคือ นำแถบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไปหาลำดับเบสที่เกิดขึ้น เพื่อตรวจสอบและยืนยันการแสดงออกของยีนสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

สรุป

การใช้ไพรเมอร์ OPD 08 และ OPD 20 ร่วมกับ oligo dT₁₂VA ด้วยเทคนิคดีอาร์ที-พีซีอาร์ สามารถเพิ่มปริมาณ cDNA ที่แสดงถึงความแตกต่างของการแสดงออกของยีนในบัวชั้นที่มีสีของใบประดับต่างกันได้ โดยไพรเมอร์ OPD 08 มีความจำเพาะต่อกลุ่มบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก ให้แถบขนาด 835 bp ซึ่งแสดงออกในส่วนของใบประดับส่วนบน ในทุก

ระยะการเจริญเติบโต และ 591 bp แสดงออกทั้งส่วนของใบประดับส่วนล่าง และใบประดับส่วนบน ในทุกระยะการเจริญเติบโตเช่นกัน ส่วนไพรเมอร์ OPD 20 ให้แถบที่มีขนาด 939 bp ที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก ในส่วนของใบประดับส่วนบน ที่ระยะช่อดอกบานและระยะดอกจริงดอกแรกบาน

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์วัสดุพันธุ์พืชจากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ และทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

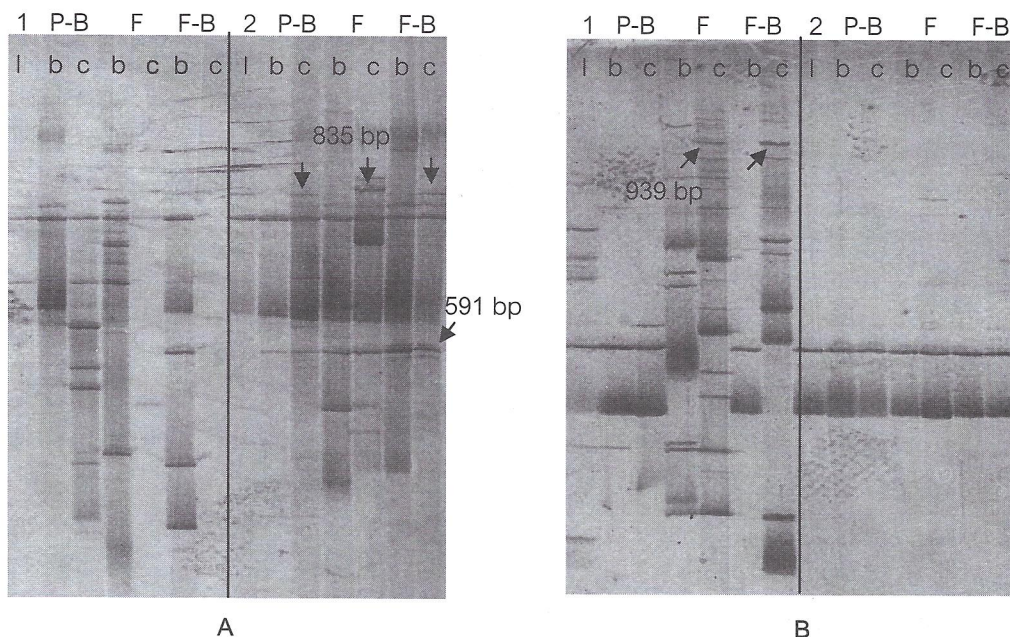


Figure 4 cDNA pattern representing gene expression in *Curcuma petiolata* Roxb.

A: OPD08; B: OPD20; 1: with pink coma bract more than 1/3 of inflorescence; 2: with pink coma bract less than 1/3 of inflorescence; l: young leaf; b: bract; c: coma bract; P-B: at pre-blooming stage; F: at flowering stage; F-B: at first floret blooming stage

เอกสารอ้างอิง

- กฤษณา วงศ์ปัญญา. 2548. การจำแนกสายพันธุ์ข้าวโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 72 หน้า.
- จิรพิพรรธ แพรไพศาล. 2549. การจำแนกยีนที่ต้านทานต่อเชื้อ *Escherichia coli* สาเหตุของโรคท้องร่วงในสุกรก่อนหย่านม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 57 หน้า.
- นันทวรรณ ฉิมพลี. 2549. การจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้ Microsatellite markers. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 143 หน้า.
- พิชัย มณีโชติ. 2547. ปทุมมาและกระเจียว. ข่าวสารสมาคมพืชสวน. 19(3): 14-15.
- ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี. 2542. โรครากปมของปทุมมาและกระเจียว. กสิกร 72(2): 121-124.
- สุวิธ วรรณไกรโรจน์. 2539. ปทุมมาและกระเจียว (curcuma). ไม้ดอกไม้ประดับ. อมรินทร์ พรินตติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด(มหาชน), กรุงเทพฯ. 128 หน้า.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 115 หน้า.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 269 หน้า.
- หทัยรัตน์ โชคทวีพานิชย์. 2545. การจัดกลุ่มขมิ้น (วงศ์ขิง) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและรูปแบบไอโซไซม์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 95 หน้า.
- อดิศร กระแสชัย. 2541. การรวบรวมพืชพื้นถิ่นเพื่อพัฒนาเป็นไม้ดอกไม้ประดับ. รายงานผลการวิจัย. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 44 หน้า.
- Duncan, D., A. Parle-McDermott and D. T. Croke. 1997. Gene expression profiling of cells and tissues. Current Diagnostic Pathology 4: 170-175.
- Krutmuang, P. 2003. Detection of Genes Differentially Expressed in Porcine Leucocytes due to Transport Stress by cDNA-AFLP and Differential Display. Ph.D. Thesis. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität. 124 p.
- Liang, P. and A. B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257: 967-971.
- Maier, R. M., K. Neckermann, B. Hoch, N. B. Akhmerdov and H. Kossel. 1992. Identification of editing positions in the *ndhB* transcript from maize chloroplasts reveals sequence similarities between editing sites of chloroplasts and plant mitochondria. Nucleic Acids Res. 20: 6189-6194.
- Manoj, P., N. S. Banerjee and P. Ravichandran. 2008. Development of sex specific molecular markers in dioecious *Piper longum* L. plants by differential display. JATIT. 4: 459-465.
- Park, J. M., S. S. Whang, S. So, P. O. Lim, H. Y. Lee and J. C. Koo. 2010. Identification of differentially expressed genes in flower buds of *Calanthe discolor* and *C. sieboldii*. Plant Biol. 53: 24-31.
- Roux, C., J. Bilang, B. H. Theunissen and C. Perrot-Rechenmann. 1998. Identification of new early auxin markers in tobacco by mRNA differential display. Plant Molecular Biology 37: 385-389.

Stein, J. and P. Liang. 2002. Differential display
technology: a general guide. Cell Mol. Life
Sci. 59: 1235-1240.
