Thai J. For. 24 : 13-25 (2005) วารสารวนศาสตร์ 24 : 13-25 (2548)

การพิสูจน์ลูกผสมระหว่างยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส และยูคาลิปตัสยูโรฟิลลา โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

VERIFICATION OF INTERSPECIFIC HYBRIDS BETWEEN *Eucalyptus camaldulensis* AND *Eucalyptus urophylla* USING DNA FINGERPRINTING

สุธีร์ ดวงใจ[1] **Sutee Duangjai**[1]
สมคิด สิริพัฒนดิลก[1] **Somkid Siripatanadilok**[1]

บทคัดย่อ

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้ามชนิดพันธุ์ระหว่างยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส (*Eucalyptus camaldulensis*) และยูคาลิปตัสยูโรฟิลลา (*E. urophylla*) จำนวน 50 สายต้น พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 15 ชนิดที่สามารถใช้ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส และยูคาลิปตัสยูโรฟิลลา ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอยืนยันลูกผสมที่ทำการตรวจสอบเป็นลูกผสมข้ามชนิดที่แท้จริงของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส สายต้น T5 และยูคาลิปตัสยูโรฟิลลา สายต้น Uro-M ซึ่งสอดคล้องกับรูปร่างของใบ สีของยอดอ่อนและทรงพุ่ม

ABSTRACT

DNA fingerprinting was applied to identify 50 interspecific hybrids between *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus urophylla.* The results showed that 15 primers could be used to identify these interspecific hybrids and also confirmed the true hybrids between *E. comaldulensis* (T5 clone) and *E. urophylla* (Uro-M clone). Result of both morphology, leaf shape, young shoot colour and crown shape, and DNA fingerprints were concordant.

Key words : *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus urophylla*, interspecific hybrids, RAPD

[1] ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

คำนำ

โครงการการวิเคราะห์ลูกผสมของยูคาลิปตัส เป็นโครงการติดตามลูกผสมที่ได้จากโครงการ "การปรับปรุงผลผลิตเนื้อไม้ยูคาลิปโดยการสร้างลูกผสม" (โครงการวิจัยรหัส วน 6.41) โดยทั้งสองโครงการวิจัยมีเป้าหมายเพื่อผลิตสายพันธุ์ยูคาลิปตัสที่มีคุณภาพดีที่เกิดจากการควบคุมการผสมเกสรทั้งในลักษณะของลูกผสมต่างชนิดและลูกผสมในชนิดเดียวกัน แม้ว่าผู้วิจัยจะประสบผลสำเร็จในการสร้างเมล็ดพันธุ์ลูกผสม (สมคิดและสุธีร์, 2545) แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของลูกผสมโดยเฉพาะลูกผสมข้ามชนิด (interspecific hybrid) จากสัณฐานวิทยา (morphology) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) รวมถึงจะต้องศึกษาการแสดงออกลักษณะ (performance) ต่างๆ ทั้งด้านการเจริญเติบโต รูปทรงของลำต้น ลักษณะทรงพุ่ม ลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ และลักษณะการปรับตัวเข้ากับพื้นที่ปลูกที่มีสภาพไม่เหมาะสมบางประการ

สาเหตุที่ต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของลูกผสมเพราะอาจจะมีการปนเปื้อนของเรณูแปลกปลอมขณะทำการควบคุมการผสมเกสรหรือประเด็นด้านกลไกของการป้องกันการผสมข้ามชนิดอาจทำให้ไม่ได้ลูกผสมข้ามชนิดพันธุ์ที่แท้จริง การปนเปื้อนจากละอองเกสรที่แปลกปลอมอาจเกิดขึ้นได้ทั้งนี้เนื่องจากมีปัจจัยทางลักษณะการออกดอกและการพัฒนาของดอกที่เกื้อหนุนให้ละอองเรณูแปลกปลอมเข้าไปผสมแทนละอองเรณูที่ต้องการ โดยเฉพาะยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซีสที่ผู้วิจัยใช้เป็นต้นแม่ที่มีลักษณะการออกดอกที่มีดอกจำนวนมาก การมีจำนวนเกสรเพศผู้มากถึง 300 อัน การมีระยะเวลาพร้อมรับการผสมของเกสรเพศเมียที่ยาวนาน และการที่เมล็ดสามารถเกิดจากการผสมตัวเองได้ (self pollination) (สมคิดและสุธีร์, 2545) ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมส่วนใหญ่มักใช้สัณฐานวิทยา โดยลูกผสมมักมีลักษณะก่ำกึ่งระหว่างต้นพ่อต้นแม่ ตัวอย่างของลูกผสมต่างชนิดพันธุ์ของลูกผสมยูคาลิปตัสที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสมข้ามชนิดพันธุ์ก่ำกึ่งระหว่างชนิดพันธุ์ที่เป็นพ่อและแม่ เช่น ลูกผสมข้ามชนิดพันธุ์ของ *E. amygdalia x E. risdonii* จะมีลักษณะรูปทรงและขนาดของใบ ขนาดของผลอยู่ระหว่าง *E. amygdalia* และ *E. risdonii* เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามในบางคู่ผสมไม่สามารถใช้สัณฐานวิทยาภายนอกพิสูจน์ความเป็นลูกผสมได้เช่นในกรณีที่สัณฐานวิทยาของชนิดพันธุ์หรือสายพันธุ์ของต้นพ่อต้นแม่มีความใกล้เคียงกัน ไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน เช่นกรณีของยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิสและยูคาลิปตัส เทเรติคอนิส เป็นต้น หรือกรณีที่ลูกผสมมีลักษณะค่อนข้างเหมือนกับต้นแม่ ในกรณีดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบความเป็นพ่อแม่และลูก นอกจากนั้นข้อดีอีกหลายประการของการตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคือสามารถตรวจสอบในขณะที่ยังมีอายุน้อย ไม่จำเป็นต้องใช้พื้นที่ในการปลูกทดสอบและมีความถูกต้องสูง

ตัวอย่างของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมในยูคาลิปตัส ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP) และเครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSR) เป็นต้น มีรายงานผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านั้นสามารถตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดของยูคาลิปตัส เช่น ลูกผสมของ *E. tereticornis x E. globulus* และ *E. grandis x E. urophylla* (Grattapaglia and Sederoff, 1994; Grattapaglia *et al.*, 1995; Verhaegen *et al.*, 1997; Brondani *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 1998, 1999) เครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิดมีข้อดีข้อด้อยแตกต่างกัน เครื่องหมายอาร์เอพีดีเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีค่าใช้จ่ายไม่สูงเมื่อเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ

ลักษณะต่างๆ ของลูกผสมของไม้ป่ามีทั้งในลักษณะเชิงลบและเชิงบวก ในกรณีเชิงลบหมายถึงลูกผสมที่ได้มีลักษณะไม่พึ่งประสงค์หรือได้ลูกผสมไม่มีลักษณะที่ดีเด่นไปกว่าต้นพ่อต้นแม่ ส่วนลักษณะเชิงบวกคือการได้ลูกผสมที่มีลักษณะดีกว่าต้นพ่อแม่หรือที่เรียกว่า hybrid vigor เช่น ลูกผสมข้ามชนิดพันธุ์

ของ *E. grandis x E. urophulla* จะให้ผลผลิตเนื้อไม้ที่สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นพ่อและต้นแม่ถึง 112 เปอร์เซ็นต์ (Brandao *et al.*, 1984) หรือกรณี ลูกผสมข้ามชนิดของยูคาลิปตัสสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่ต้นพ่อ-แม่ไม่สามารถขึ้นได้ เช่น ลูกผสมระหว่าง *E. nitens* x *E. globulus* สามารถปลูกได้ในพื้นที่ที่มีอุณหภูมิต่ำซึ่ง *E. globulus* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Dungey *et al.*, 2000) หรือลูกผสมระหว่าง *E. grandis x E. camaldulensis* สามารถขึ้นในพื้นที่ที่แห้งแล้งได้ ขณะที่ *E. grandis* ไม่สามารถขึ้นได้ นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าลูกผสมข้ามชนิดของยูคาลิปตัสมักจะรวมเอาข้อดีของแต่ละชนิดพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อแม่เข้าไว้ด้วยกัน ยกตัวอย่างเช่น ลูกผสมของ *E. urophylla x E. grandis* มีอัตราการเจริญเติบโตสูงเหมือน *E. urophylla* และมีลักษณะทนทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อราเหมือนกับ *E. grandis* (Eldridge *et al.*, 1997) ทั้งนี้การจะได้ลูกผสมที่มีลักษณะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับโอกาสและความเหมาะสมในการเลือกคู่พ่อแม่ ในเบื้องต้นคณะผู้วิจัยต้องการสร้างลูกผสมระหว่างสายต้นต่างๆ ของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสที่มีลักษณะดีแตกต่างกันซึ่งผ่านการปลูกทดสอบ ได้แก่ ยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส ยูคาลิปตัสยูโรฟิลลา ยูคาลิปตัสเทเรติคอร์นิส และยูคาลิปตัสซิตริโอโดรา โดยคาดหวังว่าลูกผสมที่เกิดขึ้นจะรวมเอาลักษณะดีต่างๆ ของพ่อแม่เข้าไว้ด้วยกัน

แต่อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นต้องตรวจพิสูจน์ว่าลูกผสมที่ได้เป็นลูกผสมที่แท้จริง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงพิจารณาใช้เครื่องหมาย อาร์เอพีดี (RAPD) ในการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมที่ได้จากการควบคุมการผสมเกสร

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างยูคาลิปตัสลูกผสมที่ใช้ในการศึกษา

เลือกลูกผสมข้ามชนิดระหว่างยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส (*E. camadulensis*) และ ยูคาลิปตัสยูโรฟิลลา (*E. urophylla*) เป็นตัวอย่างในการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดพันธุ์โดยอาศัยการวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลจากเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 50 สายต้น ได้แก่ กลุ่ม 6A จำนวน 6 สายต้น กลุ่ม 9A จำนวน 12 สายต้น กลุ่ม 18A จำนวน19 สายต้น กลุ่ม 27A จำนวน 6 สายต้น กลุ่ม 43 A จำนวน 7 สายต้น และกลุ่ม 49A จำนวน 1 สายต้น นอกจากนั้นยังมีตัวอย่างยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสสายต้น T5 ซึ่งเป็นต้นแม่และยูคาลิปตัสยูโรฟิลลาสายต้น Uro-M และ Uro ที่เป็นต้นพ่อและเมล็ดจากต้นพ่อ

การตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

1. สกัดดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสลูกผสมข้ามชนิด และยูคาลิปตัสที่ใช้เป็นพ่อแม่โดยวิธีการดัดแปลงจาก Agrawal *et al.* (1992)

2. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอยูคาลิปตัสที่สกัดได้ โดยใช้เครื่อง UV-spectrophotometer ร่วมกับวิธีการวัดการเรืองแสงของเอธิเดียมโบรไมด์

3. ทำการพัฒนาเครื่องหมายอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA, RAPD)

3.1 คัดเลือกชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ จำนวนทั้งหมด 50 ชนิด ซึ่งได้แก่ ไพรเมอร์ OPAA-1 ถึง OPAA-20 ไพรเมอร์ OPAB-1 ถึง OPAB-20 และไพรเมอร์ PEU-1 ถึง PEU-10 ซึ่งมีขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณมากและชัดเจน และมีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส สายต้น T5 และ ยูคาลิปตัสยูโรฟิลลา ซึ่งเป็นต้นพ่อและต้นแม่ เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมต่อไป

3.2 ทำพีซีอาร์ โดยเติมสารละลายต่างๆ ซึ่งประกอบไปด้วย บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกริยาสารละลาย dNTP ไพรเมอร์ ดีเอ็นเอยูคาลิปตัสตัวอย่าง สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ เอนไซม์ Taq polymerase และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ โดยมีรายละเอียดด้านความเข้มข้นและปริมาตรที่ใช้ใน Table 1

Table 1. Concentration of chemicals used in RAPD reaction

Chemicals	Volume µl	Concentration used in reaction
1. DNA (100 ng/µl)	1.0	100 ng/15 µl
2. 10X PCR buffer	1.5	1×
3. $MgCl_2$ (25 mM)	1.5	2.5 mM
4. dNTP (2 mM)	1.5	0.2 mM
5. Primers (5 pmole/µl)	1.0	5 pmole/15 µl
6. Taq polymerase (5 unit/µl)	0.1	0.5 unit/15 µl
7. Purified distilled water	8.4	
Total	**15**	

3.3 นำส่วนผสมของสารละลายใน Table 1 ใส่ในเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณ ดัง Table 2

3.4 นำผลจากการทำอาร์เอพีดีไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำมาทำอิเล็กโตรโฟริซิสบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และทำการบันทึกภาพ

Table 2. Steps in increasing the quantity of DNA by RAPD technique

	Temperature (C)	Time (min.)	Number of cycles
1. Denaturation	94	3	1
2. Denaturation	94	1	
Annealing	35	1	40
Extension	72	2	
3. Final extension	72	5	1

ผลและวิจารณ์

การสกัดดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส ยูคาลิปตัสยูโรฟิลลาและลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสองชนิด ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Agrawal และคณะ (1992) ปรากฏว่าเป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและได้ผลดีเช่นเดียวกับวิธีการอื่นๆ ที่เคยใช้สกัดดีเอ็นเอของไม้ในสกุลยูคาลิปตัส (Keil and Griffin, 1994; Grattapaglia *et al*., 1996)

ในการคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสและยูคาลิปตัสยูโรฟิลลาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีพบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 15 ชนิดจากทั้งหมด 50 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณหรือสร้างแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนได้แก่ ไพรเมอร์ OPAA 4 ไพรเมอร์ OPAA 6 ไพรเมอร์ OPAA 11 ไพรเมอร์ OPAA 12 ไพรเมอร์ OPAA 14 ไพรเมอร์ OPAA 16 ไพรเมอร์ OPAA 17 ไพรเมอร์ OPAA 19 ไพรเมอร์ OPAB 3 ไพรเมอร์ OPAB 9 ไพรเมอร์ PEU 3 ไพรเมอร์ PEU 6 ไพรเมอร์ PEU 8 ไพรเมอร์ PEU 9 และไพรเมอร์ PEU 10 โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 6 ถึง 15 แถบ รายละเอียดลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสสายต้น T5 (รหัส P51) ยูคาลิปตัสยูโรฟิลลาสายต้น Uro-M (รหัส P53) สายต้น Uro (รหัส P52 เกิดจากเมล็ดของ Uro-M จากการผสมตามธรรมชาติ) และยูคาลิปตัสลูกผสม (รหัส P1-P 50) แสดงใน Table 3 และ Table 4 ไพรเมอร์ทั้ง 15 ชนิดดังกล่าวสามารถ

ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสสายต้น T5 ซึ่งเป็นต้นแม่ ยูคาลิปตัสยูโรฟิลลาสายต้น Uro-M และ สายต้น Uro ซึ่งเป็นต้นพ่อและลูกของต้นพ่อหรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือสามารถใช้ในการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสและยูคาลิปตัสยูโรฟิลลา นอกจากนั้นยังก่อให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกันของ Uro-M และ Uro ซึ่งเป็นต้นที่เพาะจากเมล็ดของ Uro-M ซึ่งแสดงว่าไพรเมอร์ดังกล่าว สามารถใช้พิสูจน์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยูคาลิปตัสยูโรฟิลลา (*E. urophylla*) ด้วยเช่นกัน จากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถแบ่งไพรเมอร์เหล่านั้นออกเป็น 3 กลุ่มหลักๆ คือ กลุ่มไพรเมอร์ที่ก่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อต้นพ่อ (P53) ไพรเมอร์ OPAA 4 ไพรเมอร์ OPAA 16 ไพรเมอร์ PEU 3 และ ไพรเมอร์ PEU 9 กลุ่มไพรเมอร์ที่ก่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อต้นแม่ (P 51) ไพรเมอร์ OPAA 12 และ ไพรเมอร์ OPAB 9 และกลุ่มไพรเมอร์ก่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อต้นพ่อและแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อต้นแม่ คือไพรเมอร์ OPAA 6 ไพรเมอร์ OPAA 11 ไพรเมอร์ OPAA 14 ไพรเมอร์ OPAA 17 ไพรเมอร์ OPAA 19 ไพรเมอร์ OPAB 3 ไพรเมอร์ PEU 6 ไพรเมอร์ PEU 8 และ ไพรเมอร์ PEU 10 รายละเอียดแสดงใน Table 3

Table 3. Number and size of DNA bands which were specific to the eucalypt clones used as parent (s). These bands were from 15 primers and able to verify hybrids between T5 and Uro-M and progenies of Uro-M (Uro)

Primers	Number of DNA bands	Size of specific DNA band (kb)		
		T5 (P51)	Uro-M (P53)	Uro (P52)
OPAA4	15	-	0.89	0.89
		-	0.60	-
OPAA6	7	2.00	-	-
		-	1.43	-
		-	0.63	0.63
OPAA11	9	-	1.84	-
		-	1.55	-
		1.27	-	-
		-	0.91	-
OPAA12	8	0.55	-	-
OPAA14	9	-	1.17	-
		0.45	-	-
OPAA16	11	-	1.75	1.75
		-	1.35	1.35
		-	0.74	0.74
OPAA17	11	-	1.83	1.83
		1.52	-	-
		-	0.73	0.73
OPAA19	7	-	1.29	-
		-	0.82	-
		0.44	-	-
OPAB3	7	1.26	-	-
		-	0.96	0.96
OPAB9	9	1.42	-	-
PEU3	7	-	2.26	2.26
		-	1.15	1.15
PEU6	8	0.69	-	-
		-	0.54	0.54
		0.42	-	-
PEU8	10	2.19	-	-
		-	1.16	-
		-	1.09	-
		-	0.79	0.79
PEU9	6	-	1.45	-
		-	0.52	0.52
PEU10	6	0.52	-	-
		-	0.24	0.24

Table 4. DNA bands which were generated from 18 selected primers and found in T5 and Uro-M parents. (✓ present of DNA band, - : absent of DNA band

Hybrid clone	Size in kb of DNA bands of different clones from different primers								
	OPAA 6			OPAA II				OPAA 14	
	T5	Uro -M		T5	Uro-M			T5	Uro-M
	2.00	1.43	0.63	1.27	1.84	1.55	0. 91	0.45	1.17
P1	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	-
P2	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	-	✓
P3	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	-
P4	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	-	-
P5	-	✓	✓	-	-	✓	-	-	-
P6	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	-	-
P7	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	-	✓
P8	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	-	✓
P9	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	-
P10	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	-	-
P11	-	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-
P12	-	✓	-	✓	-	✓	✓	-	-
P13	-	✓	-	✓	-	✓	-	-	-
P14	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	-	-
P15	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	-	-
P16	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	-	-
P17	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	-
P18	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	-	-
P19	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	-	✓
P20	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	-	-
P21	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	-	✓
P22	✓	-	✓	-	-	✓	-	-	-
P23	✓	-	✓	-	-	✓	✓	-	-
P24	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	-	✓
P25	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	-	-

Table 4. (Cont.)

Hybrid clone	Size in kb of DNA bands of different clones from different primers								
	OPAA 6			OPAA II				OPAA 14	
	T5	Uro -M		T5	Uro-M			T5	Uro-M
	2.00	1.43	0.63	1.27	1.84	1.55	0. 91	0.45	1.17
P26	✓	-	-	-	-	✓	✓	-	-
P27	-	-	✓	✓	-	✓	✓	-	-
P28	-	✓	-	✓	-	✓	-	-	-
P29	-	-	✓	-	✓	✓	-	-	✓
P30	-	✓	✓	✓	-	✓	-	-	✓
P31	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	-	✓
P32	-	✓	-	-	-	✓	✓	-	✓
P33	-	✓	✓	✓	-	✓	-	-	-
P34	-	-	-	-	-	✓	-	-	-
P35	-	✓	✓	✓	-	✓	-	-	-
P36	✓	✓	-	-	-	✓	-	-	-
P37	-	✓	✓	-	-	✓	✓	-	-
P38	-	✓	✓	-	-	-	✓	-	-
P39	-	-	✓	-	-	✓	-	-	-
P40	-	-	-	-	✓	-	-	-	✓
P41	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
P42	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	✓
P43	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	✓
P44	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
P45	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	-
P46	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
P47	-	✓	✓	✓	-	-	✓	-	-
P48	-	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	-
P49	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-
P50	-	-	-	✓	✓	-	✓	✓	✓

Table 4. (Cont.)

Hybrid clone	Size in kb of DNA bands of different clones from different primers										
	OPAA 17			OPAA 19			OPAB 3		PEU 6		
	T5	Uro-M		T5	Uro-M		T5	Uro-M	T5		Uro-M
	1.52	1.83	0.73	0.44	1.29	0.82	1.26	0.96	0.69	0.42	0.54
P1	✓	-	✓	-	-	✓	✓	-	✓	✓	✓
P2	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	-	✓	-	✓
P3	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	-	✓	-	✓
P4	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓
P5	✓	✓	✓	-	-	-	✓	-	✓	-	✓
P6	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓
P7	✓	-	-	-	-	-	✓	-	✓	-	✓
P8	✓	-	✓	✓	-	-	✓	-	✓	✓	✓
P9	✓	-	✓	✓	-	-	✓	-	✓	✓	✓
P10	✓	-	✓	✓	-	-	✓	-	✓	✓	✓
P11	✓	-	✓	-	-	-	✓	-	-	✓	-
P12	✓	-	✓	-	-	✓	✓	-	✓	-	✓
P13	✓	-	✓	-	-	✓	✓	-	✓	-	✓
P14	✓	-	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	-	✓
P15	✓	-	✓	-	-	✓	✓	-	✓	-	✓
P16	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓
P17	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
P18	✓	-	-	✓	-	✓	✓	-	✓	-	✓
P19	✓	-	-	-	-	✓	✓	-	-	-	✓
P20	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
P21	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓
P22	✓	-	-	-	-	-	✓	-	-	-	✓
P23	✓	-	-	-	-	-	✓	-	-	✓	✓
P24	✓	-	-	-	-	-	✓	-	✓	✓	✓
P25	✓	-	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓

Table 4. (Cont.)

Hybrid clone	Size in kb of DNA bands of different clones from different primers										
	OPAA 17			OPAA 19			OPAB 3		PEU 6		
	T5	Uro-M		T5	Uro-M		T5	Uro-M	T5		Uro-M
	1.52	1.83	0.73	0.44	1.29	0.82	1.26	0.96	0.69	0.42	0.54
P26	✓	-	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	✓	✓
P27	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-	-
P28	✓	-	-	-	✓	✓	✓	-	✓	-	✓
P29	✓	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	-	✓
P30	✓	-	-	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	-
P31	✓	-	✓	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓
P32	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓
P33	✓	-	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	✓	✓
P34	✓	-	-	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	✓
P35	✓	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓
P36	✓	-	✓	-	-	✓	✓	-	✓	✓	-
P37	✓	-	-	-	✓	-	✓	-	✓	✓	-
P38	✓	-	-	-	-	-	✓	-	✓	-	✓
P39	✓	✓	✓	-	-	✓	-	-	-	-	✓
P40	-	-	-	-	-	-	✓	-	✓	✓	✓
P41	✓	-	-	-	-	-	✓	-	✓	-	-
P42	✓	-	-	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	✓
P43	✓	-	-	-	-	-	✓	-	-	✓	-
P44	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
P45	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓
P46	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓
P47	✓	-	✓	✓	-	-	✓	-	✓	-	✓
P48	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓
P49	✓	-	✓	-	-	✓	✓	-	✓	✓	✓
P50	✓	-	-	-	-	✓	✓	-	✓	-	-

Table 4. (Cont.)

Hybrid clone	Size in kb of DNA bands of different clones from different primers					
	PEU 8				PEU 10	
	T5	Uro -M			T5	Uro-M
	2.19	1.16	1.09	0.79	0.52	0.24
P1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
P2	✓	-	-	✓	✓	✓
P3	✓	-	✓	✓	✓	✓
P4	✓	-	-	✓	✓	✓
P5	-	-	✓	✓	-	-
P6	✓	-	-	✓	-	-
P7	✓	-	✓	✓	-	✓
P8	✓	✓	-	✓	-	✓
P9	✓	✓	-	✓	✓	✓
P10	✓	✓	-	✓	✓	✓
P11	-	-	-	✓	✓	✓
P12	✓	-	-	✓	✓	✓
P13	✓	-	✓	✓	✓	✓
P14	-	-	-	-	✓	✓
P15	✓	✓	✓	-	✓	✓
P16	✓	-	-	-	✓	✓
P17	✓	✓	-	-	✓	✓
P18	-	✓	✓	-	✓	✓
P19	-	-	-	-	✓	-
P20	-	✓	-	-	-	✓
P21	-	✓	✓	-	✓	✓
P22	-	✓	-	✓	✓	-
P23	✓	-	-	-	✓	-
P24	-	-	-	-	✓	-
P25	✓	✓	-	-	✓	✓

Table 4. (Cont.)

Hybrid clone	Size in kb of DNA bands of different clones from different primers					
	PEU 8				PEU 10	
	T5	Uro -M			T5	Uro-M
	2.19	1.16	1.09	0.79	0.52	0.24
P26	-	-	-	-	✓	✓
P27	-	-	-	✓	✓	✓
P28	-	-	✓	✓	✓	✓
P29	✓	✓	✓	-	✓	✓
P30	✓	✓	-	✓	✓	✓
P31	✓	✓	-	✓	✓	✓
P32	-	-	✓	✓	-	✓
P33	-	-	-	✓	✓	✓
P34	-	-	-	✓	-	-
P35	-	✓	✓	✓	✓	✓
P36	-	-	-	✓	✓	-
P37	✓	-	✓	✓	✓	✓
P38	-	-	-	✓	-	-
P39	-	✓	✓	✓	✓	✓
P40	-	-	-	-	-	✓
P41	-	-	-	-	✓	-
P42	✓	✓	-	-	✓	✓
P43	✓	✓	✓	-	✓	-
P44	-	✓	-	-	✓	✓
P45	✓	-	-	-	✓	✓
P46	-	-	-	-	✓	✓
P47	✓	-	✓	-	✓	✓
P48	✓	✓	✓	-	-	✓
P49	-	-	-	-	-	✓
P50	-	-	✓	-	✓	-

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายอาร์เอพีดีพบว่าลูกผสมจำนวนทั้งหมด 50 สายต้นมีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยูคาลิปตัสยูโรฟิลลาอย่างน้อยหนึ่งแถบ ซึ่งบ่งชี้ความเป็นลูกผสมระหว่างยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสและยูคาลิปตัสยูโรฟิลลา (Uro-M) ที่เป็นต้นพ่อ (Table 4) แสดงว่าไม่ได้มาจากเมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเองของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสสายต้น T5 แต่อย่างใด ผลจากเครื่องหมายดีเอ็นเอยังสอดคล้องกับสัณฐานวิทยาของใบของลูกผสมที่มีลักษณะคล้ายกับใบของยูคาลิปตัสยูโรฟิลลา ตลอดจนสีของยอดอ่อน และลักษณะทรงพุ่มของลำต้น (สุธีร์ และ สมคิด, 2547)

แถบ ดีเอ็นเอ ขนาดต่างๆ ของไพรเมอร์ทุกชนิดจะปรากฏในลูกผสมแตกต่างกัน แถบดีเอ็นเอขนาดใดๆ ที่ปรากฏและไม่ปรากฏในลูกผสมแสดงว่าตำแหน่งดังกล่าวในพ่อแม่เป็นเฮเทอโรไซกัส ยกเว้นไพรเมอร์ OPAA 17 ที่แถบดีเอ็นเอขนาด 1.52 กิโลเบส ปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เฉพาะของสายต้น T5 (P51) และลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามจำนวน 49 สายต้น จากจำนวนทั้งหมด 50 สายต้น แต่ไม่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายต้น Uro-M (P53) ซึ่งแสดงว่าตำแหน่งดีเอ็นเอ ขนาด 1.52 กิโลเบส ของไพรเมอร์ OPAA 17 ของ สายต้น T5 ควรเป็นโฮโมไซกัส (Figure 1, Table 4)

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Agrawal *et al.*, (1992) เพื่อใช้เตรียมดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส ยูคาลิปตัสยูโรฟิลลาและลูกผสมระหว่างยูคาลิปตัสทั้งสองชนิดดังกล่าว ในการทำอาร์เอพีดี พบว่าให้ผลดีเช่นเดียวกันกับวิธีการอื่นๆ ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสชนิดอื่นๆ

2. สามารถประยุกต์ใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีในการบ่งบอกความเป็นลูกผสมข้ามชนิดพันธุ์ระหว่างยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส และยูคาลิปตัสยูโรฟิลลา โดยมีไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 15 ชนิดจากทั้งหมด 50 ชนิด ซึ่งได้แก่ ไพรเมอร์ OPAA 4 ไพรเมอร์ OPAA 6 ไพรเมอร์ OPAA 11 ไพรเมอร์ OPAA 12 ไพรเมอร์ OPAA 14 ไพรเมอร์ OPAA 16 ไพรเมอร์ OPAA 17 ไพรเมอร์ OPAA 19 ไพรเมอร์ OPAB 3 ไพรเมอร์ OPAB 9 ไพรเมอร์ PEU 3 ไพรเมอร์ PEU 6 ไพรเมอร์ PEU 8 ไพรเมอร์ PEU 9 และไพรเมอร์ PEU 10 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเกือบทั้งหมดมีลักษณะเป็นเฮเทอโรไซกัส ยกเว้นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1.52 กิโลเบสจากไพรเมอร์ OPAA 17 เป็นโฮโมไซกัส ซึ่งสามารถใช้พิสูจน์ว่าเป็นลูกผสมที่เกิดจากสายต้น T5

3. ลูกผสมที่ผลิตได้เป็นลูกผสมระหว่างยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส และยูคาลิปตัสยูโรฟิลลาอย่างแท้จริงทั้งนี้มีหลักฐานที่สามารถยืนยันได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลดีเอ็นเอ

คำนิยม

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนวิจัย พร้อมทั้งเครื่องมือบางส่วนที่จำเป็น บริษัท สยามฟอเรสทรี จำกัด ที่กรุณาสนับสนุนเงินสมทบบางส่วนเพื่อช่วยให้งานวิจัยมีความคล่องตัวในการดำเนินงานวิจัยยิ่งขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชัยรัตน์ อร่ามศรี. 2542. **การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสายต้นยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส อายุ 5 ปี.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมคิด สิริพัฒนดิลกและสุธีร์ ดวงใจ. 2545. **รายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการการปรับปรุงผลผลิตเนื้อไม้ยูคาลิปตัส โดยการสร้างลูกผสม.** ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้, คณะวนศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุธีร์ ดวงใจและสมคิด สิริพัฒนดิลก. 2547. **รายงาน-**

ความก้าวหน้าของโครงการการวิเคราะห์ยูคาลิปตัสลูกผสม. ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้, คณะวนศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agawal. 1992. Isolation of DNA from *Cheorospondias asillaris* leaves. **Biotintech. Biotindiv.** Lett. 2: 19 - 24.

Brandao, L.G., E.Campinhos and Y.K. Ikemori. 1984. Brazilís new forest soars to success. **Pulp and paper International** 26. 38-40.

Brondani, R.P.V., C.Brondani, R.Tarchini and D. Grattapaglia. 1998. Developmant, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E.urophylla.* Theor. Appl. **Genet.** 97:816-827.

Dungey, H.S., M.J. Dieters and D.G. Nibles. 2000. Hybrid breeding and genetics of forest tree. *In* **Proceedings of QFRI/ CRC-SPF Symposium,** Queensland.

Eldridge, K., J. Daridson, C. Hardwood and G. van WYX. 1997. **Eucalypt Domestication and Breeding.** Clarendon press, Oxford.

Grattapaglia, D. and R. Sederoff. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo testcross : mapping strategy and RAPD markers. **Genetics.** 137:1121-1137.

Grattapaglia, D., F.L. Bertolucci and R.R. Sederoff. 1995. Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo - testcross strategy and RAPD marker. **Theor. Appl. Genet.** 90: 933 - 947.

Grattapaglia, D., F.L. Bertolucci, R. Penchel and R.R. Sederoff. 1996. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality trait in *Eucalyptus grandis* using maternal half-sib family and RAPD marker. **Genet.** 144: 1205 - 1214.

Keil, M. and A.R. Griffin. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker in the discrimination and verification of genotype in Eucalyptus. **Theor. Apple. Genet.** 89: 442-450.

Manques, C.M., J. Vasquez-Kool, V.J. Garocha, J.G.Ferreira, D.M. OíMalley, B.H. Liu and R. Sederoff. 1999. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus.* **Theor. Appl. Genet.** 99:936-946.

Verhaegen, D., C.Plomion, J.M.Gion, M.Poitel, P.Costa and A.Kremer. 1997. Quatitative trait dissection analysis in Eucalyptus using RAPD markers: 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages. **Theor. Appl. Genet.** 95:597-608.