

การตรวจสอบพันธุกรรมของยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส
ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

GENETIC DISCRIMINATION OF
EUCALYPTUS CAMALDULENSIS DEHNH.
BY DNA FINGERPRINTING

สุธีร์ ดวงใจ¹

สมศักดิ์ อภิลิธิวานิช²

สมคิด สิริพัฒน์ดิกล¹

สุวิทย์ แสงทองพราว¹

Sutee Duangjai¹

Somsak Apisitwanich²

Somkid Siripatanadilok¹

Suwit Sangtongpraow¹

ABSTRACT

Genetic discrimination of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. was carried out by using random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprint. There were 38 samples composed of clone S10, clone T5, 14 selfing progenies and 22 outcrossing progenies of both clones. The objectives of this study were to develop technique for genetic discrimination of *E. camaldulensis*, to discriminate DNA fingerprint among samples and to analyse their genetic relationship using the NTSYS – PC computer program version 1.8. It was found that the modified method of Agrawal *et al.* (1992) could be efficiently used for DNA extraction of *E. camaldulensis*. The total of 82 decamer primers were screened and 10 of them were found to give clear reproducible result. 51 bands were observed, only 6 primers showed polymorphism among samples and 5 primers could be used for genetic linkage map and marker assisted selection (MAS). The segregation of homozygous and heterozygous were undergoing to Mendel's Law. The genetic similarity of all studied samples were greater than 90 percent. DNA fingerprinting data revealed clear separation and could be divided into two groups. Both of them were significantly different in some specific bands of DNAs.

บทคัดย่อ

การตรวจสอบพันธุกรรมของยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิสด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ใช้ตัวอย่างในการศึกษาทั้งหมด 38 ตัวอย่าง ประกอบด้วยสายต้น S10 สายต้น T5 ลูกที่เกิดจากการผสมตัวเองของแต่ละสายต้นจำนวน 14 ตัวอย่างและลูกที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสองสายต้นจำนวน 22 ตัวอย่าง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคอาร์เอพีดีในการตรวจสอบพันธุกรรมของยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส และตรวจสอบพันธุกรรมของยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิสบางสายต้นที่มีลักษณะดีบางประการพร้อมทั้งหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป NTSYS-PC เวอร์ชัน 1.8 ผลการศึกษาพบว่า

¹ ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

² ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Agrawal และคณะ (1992) สามารถใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของยูคาลิปตัส-คามาลดูเลนซิสอย่างได้ผลดี การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยูคาลิปตัส-คามาลดูเลนซิสโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟพีดีด้วยไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ พบว่าไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิดจากทั้งหมด 82 ชนิดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และก่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 51 แถบ ในจำนวนนั้นมีไพรเมอร์ 6 ชนิดที่สามารถก่อให้เกิดความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอและมีไพรเมอร์ 5 ชนิดที่สามารถประยุกต์ใช้ในการทำ genetic linkage map และเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection, MAS) ของยูคาลิปตัส-คามาลดูเลนซิส จากการตรวจสอบลักษณะการถ่ายทอดสามารถจำแนกลักษณะโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสของแถบดีเอ็นเอและมีการถ่ายทอดลักษณะแถบดีเอ็นเอเป็นไปตามกฎของเมนเดล ยูคาลิปตัส-คามาลดูเลนซิสทั้ง 38 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และสามารถแบ่งกลุ่มออกเป็นสองกลุ่มที่มีความแตกต่างของการปรากฏของแถบดีเอ็นเอบางแถบ

กานำ

ยูคาลิปตัสส่วนใหญ่เป็นไม้พื้นเมืองของออสเตรเลียที่มีจำนวนชนิดพันธุ์ทั้งหมดประมาณ 500 ชนิด (Boland และคณะ, 1992) และมีประมาณ 20-30 ชนิดที่มีการนำไปปลูกอย่างแพร่หลายเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ ที่สำคัญเช่น อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ อุตสาหกรรมชิ้นไม้สับ การก่อสร้าง และใช้เป็นเชื้อเพลิงทั้งในรูปไม้พื้นหรือถ่าน (Hodge และคณะ, 1996; Eldridge และคณะ, 1997) ในการสำรวจจำนวนพื้นที่ปลูกยูคาลิปตัสของประเทศไทยในปี 2538 พบว่ามีประมาณ 2,180,794 ไร่ ส่วนใหญ่อยู่บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออก (ศูนย์วิจัยป่าไม้, 2540) ชนิดพันธุ์ของยูคาลิปตัสที่ปลูกส่วนใหญ่เป็นยูคาลิปตัส-คามาลดูเลนซิส (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn.) เพราะเป็นชนิดพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศและดินของประเทศไทย ปัญหาที่สำคัญของการปลูกสร้างสวนป่ายูคาลิปตัส-คามาลดูเลนซิสในประเทศไทยคือมีปริมาณผลผลิตต่ำและไม่สม่ำเสมออันมีสาเหตุเนื่องมาจากการใช้กล้าไม้ที่ไม่มีคุณภาพและไม่มีการปรับปรุงพันธุ์ยูคาลิปตัส-คามาลดูเลนซิสที่เหมาะสม สำหรับแนวทางในแก้ไขปัญหาดังกล่าวจำเป็นต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมของยูคาลิปตัส

คามาลดูเลนซิสในระดับต่างๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่จะใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป การศึกษาพันธุกรรมของยูคาลิปตัส-คามาลดูเลนซิส ในระดับดีเอ็นเอเช่น การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) นั้นเป็นแนวทางหนึ่งที่ทำให้ได้ข้อมูลในการคัดเลือกหรือปรับปรุงพันธุ์ของยูคาลิปตัส-คามาลดูเลนซิส

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือการตรวจสอบพันธุกรรมด้วยดีเอ็นเอมีประโยชน์หลายประการ นอกจากทำให้ทราบความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมของแต่ละชนิดหรือสายพันธุ์แล้ว ยังสามารถประยุกต์ใช้ข้อมูลพันธุกรรมดังกล่าวในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะในไม้ยืนต้นที่จะช่วยลดระยะเวลาที่ใช้ในการคัดเลือก การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีหลายวิธี อาร์เอฟพีดี (random amplified polymorphic DNA, RAPD) เป็นวิธีการหนึ่งที่อาศัยหลักการพีซีอาร์ (PCR - based DNA fingerprinting) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองแล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณดังกล่าวโดยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอจากการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Williams และคณะ, 1990)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคอาร์เอฟ

พิธีในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส พร้อมทั้งหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพืช

ยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิสที่ใช้ในการวิจัยนี้ ประกอบด้วยสายต้น S10 สายต้น T5 ลูกที่เกิดจากการผสมตัวเองของแต่ละสายต้นจำนวน 14 ตัวอย่างและ

ลูกที่เกิดจากการผสมข้ามโดยมีสายต้น S10 เป็นต้นแม่และสายต้น T5 เป็นต้นพ่อจำนวน 22 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งหมด 38 ตัวอย่าง (Figure 1) สายต้น T5 เป็นสายต้นที่ได้จากการคัดเลือกมาจากสถานีฝึกนิสิตวนศาสตร์ อำเภอกะทู้ป่า จังหวัดพังงา ได้ผ่านการปลูกทดสอบในท้องที่ต่างๆ มีการเจริญเติบโตดีที่สุดสายต้น S10 คัดเลือกมาจากสวนป่าสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว จังหวัดกาฬสินธุ์ มีการเจริญเติบโตปานกลาง แต่ทนสภาพพื้นที่ที่ไม่เหมาะสมบางประการ

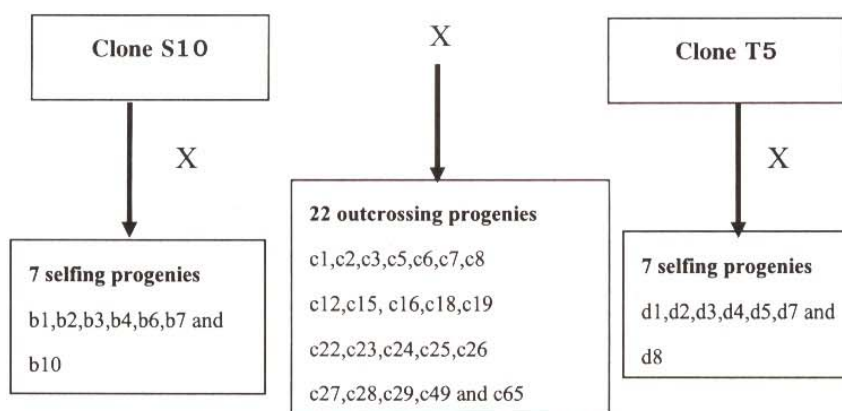


Figure 1. Diagram shows parents and pedigree of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. selected for this study.

วิธีการ

1. สกัดดีเอ็นเอของยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส ทั้ง 38 ตัวอย่างจากใบอ่อนโดยวิธีการที่ประยุกต์จาก Agrawal และคณะ (1992) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (uv spectrophotometer) รวมทั้งวิธีการวัดการเรืองแสงของเอธิเดียมโบรไมด์ที่แทรกในดีเอ็นเอ

2. การตรวจสอบพันธุกรรมของยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิสโดยเทคนิคอาร์เอพีดี มีรายละเอียดดังนี้

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรสุทธิ 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส เริ่มต้น (100 ng/ 15 µl) สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยาความเข้มข้น 1 เท่า สารละลาย dNTP (0.2 mM) สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (2.5 mM) เอนไซม์ *Taq* polymerase (0.5 unit/15 µl) ไพริเมอร์ (5 pmole/15 µl) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 3 ขั้นตอน คือ 1) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ 2) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที จำนวน 45 รอบและ 3) ที่

อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ไพร์เมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ ไพร์เมอร์ OPAA-1 ถึง OPAA-20 ไพร์เมอร์ OPAB-1 ถึง OPAB-20 ไพร์เมอร์ OPAC-1 ถึง OPAC-20 ไพร์เมอร์ OPAD-1 ถึง OPAD-20 ไพร์เมอร์ OPAE-3 และไพร์เมอร์ OPAF-1 รวมจำนวนทั้งหมด 82 ชนิด (Operon Technology) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำอาร์เอพีดี ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.25 เปอร์เซ็นต์ ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากไพร์เมอร์ต่างๆ และทดสอบลักษณะการถ่ายทอดของแถบดีเอ็นเอโดยใช้โคสแควร์ (χ^2) พร้อมทั้งวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกัน (similarity) ของตัวอย่างจากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยกำหนดให้ตัวเลข “1” เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอและ “0” เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ต่อมานำเอาค่าความคล้ายคลึงดังกล่าวไปใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของตัวอย่างโดยการจับกลุ่ม (cluster analysis) ซึ่งใช้วิธี UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-PC เวอร์ชัน 1.8

ผลและวิจารณ์ผล

การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Agrawal และคณะ (1992) เพื่อเตรียมดีเอ็นเอของยูคาลิปตัส ความลาดดูเลนซิสในการทำอาร์เอพีดีพบว่าให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี

การคัดเลือกหาไพร์เมอร์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยูคาลิปตัส ความลาดดูเลน

ซิสด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่ามีไพร์เมอร์จำนวน 10 ชนิดจากไพร์เมอร์ทั้งหมด 82 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากและชัดเจนซึ่งได้แก่ ไพร์เมอร์ OPAA1 ไพร์เมอร์ OPAA4 ไพร์เมอร์ OPAA9 ไพร์เมอร์ OPAA10 ไพร์เมอร์ OPAA11 ไพร์เมอร์ OPAA17 ไพร์เมอร์ OPAB2 ไพร์เมอร์ OPAB6 ไพร์เมอร์ OPAB 14 และไพร์เมอร์ OPAC2 ที่มีลำดับเบสแสดงไว้ใน Table 1 ไพร์เมอร์เหล่านี้มีปริมาณของเบส G และเบส C อยู่ในช่วง 60-70 เปอร์เซ็นต์และก่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดจำนวน 51 แถบที่มีขนาด 0.43-3.90 กิโลเบส แต่อย่างไรก็ตามในบรรดาไพร์เมอร์ทั้ง 10 ชนิดดังกล่าวมีเพียง 6 ชนิดที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างของตัวอย่างที่ทำการศึกษาซึ่งได้แก่ ไพร์เมอร์ OPAA4 ไพร์เมอร์ OPAA10 ไพร์เมอร์ OPAA11 ไพร์เมอร์ OPAA17 (Figure 2) ไพร์เมอร์ OPAB6 และไพร์เมอร์ OPAB 14 (Table 1)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพร์เมอร์ OPAA4 ไพร์เมอร์ OPAA10 ไพร์เมอร์ OPAA17 ไพร์เมอร์ OPAB6 และไพร์เมอร์ OPAB 14 ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยูคาลิปตัส ความลาดดูเลนซิสที่เฉพาะต่อสายต้น S10 และสายต้น T5 ซึ่งเป็นต้นพ่อต้นแม่ของตัวอย่างอื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษา แต่ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังกล่าวเกิดจากความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 1-2 แถบต่อไพร์เมอร์ ขณะที่แถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่จะปรากฏทั้งสองสายต้น ผลการศึกษาดังกล่าวมีลักษณะสอดคล้องกับการศึกษาของ Sale และคณะ (1996) ที่ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *Eucalyptus risdonii* และ *E. amygdalina*

Table 1. Primers and basepair length of RAPD generated markers

Primer	Sequencing	Marker size (Kb)							
OPAA1	5' AGACGGCTCC 3'	0.80	1.00	1.10	1.40	1.70			
OPAA4	5' AGGACTGCTC 3'	0.43	0.50	0.54	0.67	0.79	0.92	1.07	1.50 1.60
OPAA9	5' GGGTAACGCC 3'	0.70	0.89	1.45	1.60				
OPAA10	5' TGGTCGGGTG 3'	0.56	0.81	0.94	1.10	1.30	1.40	1.50	
OPAA11	5' ACCCGACCTG 3'	0.51	0.57	1.60	2.00				
OPAA17	5' GAGCCCGACT 3'	0.47	0.74	1.09	1.55	1.60			
OPAB2	5' GGAAACCCCT 3'	2.00	2.63	3.90					
OPAB6	5' GTGGCTTGGA 3'	0.75	0.90	1.19	1.50	2.00			
OPAB14	5' AAGTGCGACC 3'	0.66	0.79	1.00	1.27	1.60			
OPAC2	5' GTCGTCGTCT 3'	1.40	1.60	2.00	2.10				

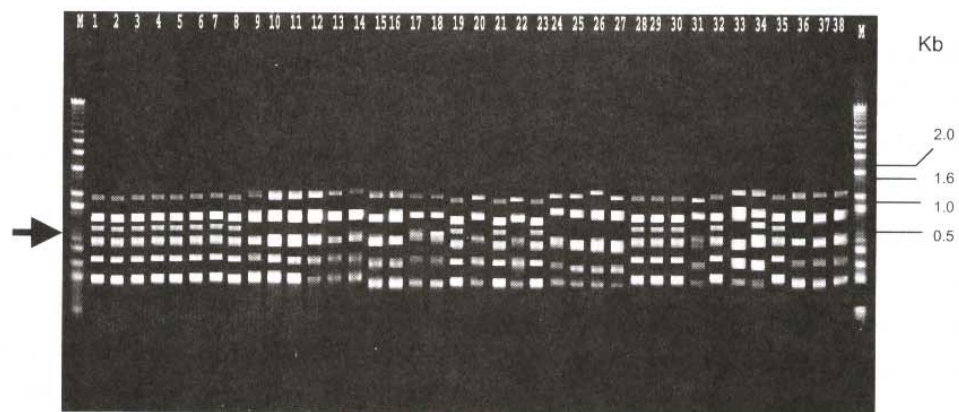


Figure 2. RAPD fragment patterns of *Eucalyptus camaldulensis* produced by primer OPAA17, showed in an ethidium bromide stained agarose gel of PCR product from *E. camaldulensis* parent clone S10, lane 8; parent clone T5, lane 16; selfing progeny of clone S10, lanes 1 – 7; selfing progeny of clone T5, lane 9 – 15; outcrossing progeny between two clones, lanes 17 – 38. Arrow indicate position of polymorphic DNA band

ลักษณะการถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกของแถบดีเอ็นเอ ที่แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่าง สายต้น S10 และสายต้น T5 ทำให้ทราบลักษณะโฮโม ไซกัสหรือเฮเทโรไซกัสของแถบดีเอ็นเอนั้นๆ ใน สายต้น S10 และสายต้น T5 ซึ่งพบว่าในสายต้น S10 มีลักษณะตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอขนาด 1.55 กิโล เบสจากไพรเมอร์ OPAA17 เป็นเฮเทโรไซกัส ส่วน สายต้น T5 มีลักษณะตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอขนาด 0.43 กิโลเบสและขนาด 0.79 กิโลเบสจากไพรเมอร์ OPAA4 แถบดีเอ็นเอขนาด 1.10 กิโลเบสจากไพร เมอร์ OPAA10 แถบดีเอ็นเอขนาด 1.19 กิโลเบสจาก ไพรเมอร์ OPAB6 เป็นเฮเทโรไซกัสและมีลักษณะ ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอขนาด 1.60 กิโลเบสจากไพร เมอร์ OPAB14 เป็นโฮโมไซกัส การถ่ายทอดแถบดี เอ็นเอนี้แตกต่างกันไปเป็นไปตามกฎของเมนเดล

ดังแสดงรายละเอียดไว้ใน Table 2 ซึ่งสอดคล้องกับ ผลการศึกษาการถ่ายทอดเครื่องหมายอาร์เอพีดีในพืช ชนิดอื่นๆ (Carlson และคณะ, 1991; Hu และ Quiros, 1991; Pillay และ Kenny, 1996) จากการถ่ายทอด ดังกล่าวจึงสามารถประยุกต์แถบดีเอ็นเอดังกล่าวใน การทำ genetic linkage map หรือ physical map (Grattapaglia และ Sederoff, 1994; Grattapaglia และ คณะ, 1996) หรือประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายในการ คัดเลือก (marker assisted selection, MAS) ซึ่งมี ประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ไม้ยืนต้นที่มีอายุ ยาวนาน สำหรับแถบดีเอ็นเอ 1.60 จากไพรเมอร์ OPAB14 ที่พบในสายต้น T5 สามารถที่จะประยุกต์ใช้ ในการหาอัตราการผสมข้ามในยูคาลิปตัส คามาลดู เลนซิสได้เช่นเดียวกันกับตัวอย่างใน *Eucalyptus urophylla* ที่ Gaiotto และคณะ (1997) ได้ศึกษา

Table 2. Chi-square analysis for goodness of fit to a 1:1 ratio of segregate DNA fingerprinting band in *Eucalyptus camaldulensis* F1 progenies of clone S10 and T5

Primer	Size of DNA(kb)	No.of present bands	No. of absent bands	Total	Chi-square
OPAA4	0.43	11	11	22	0.045 ^{ns}
OPAA4	0.79	10	12	22	0.045 ^{ns}
OPAA10	1.10	11	11	22	0.045 ^{ns}
OPAA17	1.55	9	13	22	0.409 ^{ns}
OPAB6	1.19	10	12	22	0.045 ^{ns}

ns : non significant difference

จากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 10 ชนิดของยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส ทั้ง 38 ตัวอย่างมาวิเคราะห์ความคล้ายคลึงและความสัมพันธ์ โดยใช้โปรแกรม NTSYS – PC เวอร์ชัน 1.8 พบว่า ตัวอย่างยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิสดังกล่าวมีความ คล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป (ไม่ได้แสดงข้อมูล) และมีความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรมจากการจัดจำแนกกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean analysis (UPGMA) แสดงไว้ใน Figure 3 ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างของยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิสที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดออกเป็นสอง กลุ่ม คือกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับสายต้น T5 ซึ่งได้แก่ ลูกที่เกิดจากการผสมตัวเองของสายต้น T5 (d1, d2,

d3, d4, d5, d7 และ d8) และลูกที่เกิดจากการผสมข้ามของสายต้น S10 และสายต้น T5 (c1, c2, c3, c5, c6, c7, c8, c12, c15, c16, c18, c19, c22, c23, c24, c25, c26, c27, c28, c29, c49 และ c65) กับกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับสายต้น S10 ซึ่งได้แก่ลูกที่เกิดจากการผสมตัวเองของสายต้น S10 (b1, b2, b3, b4, b6, b7 และ b10) เมื่อทำการเปรียบเทียบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างสองกลุ่มตัวอย่าง พบว่าแถบดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบมีความแตกต่างอย่าง

เด่นชัดคือ แถบดีเอ็นเอขนาด 0.43 กิโลเบสและ 0.79 กิโลเบสที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAA4 แถบดีเอ็นเอขนาด 1.10 กิโลเบสที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAA10 แถบดีเอ็นเอขนาด 1.55 กิโลเบสที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAA17 แถบดีเอ็นเอขนาด 1.19 กิโลเบสที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAB6 และแถบดีเอ็นเอขนาด 1.6 กิโลเบสที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAB14 (Figure 4)

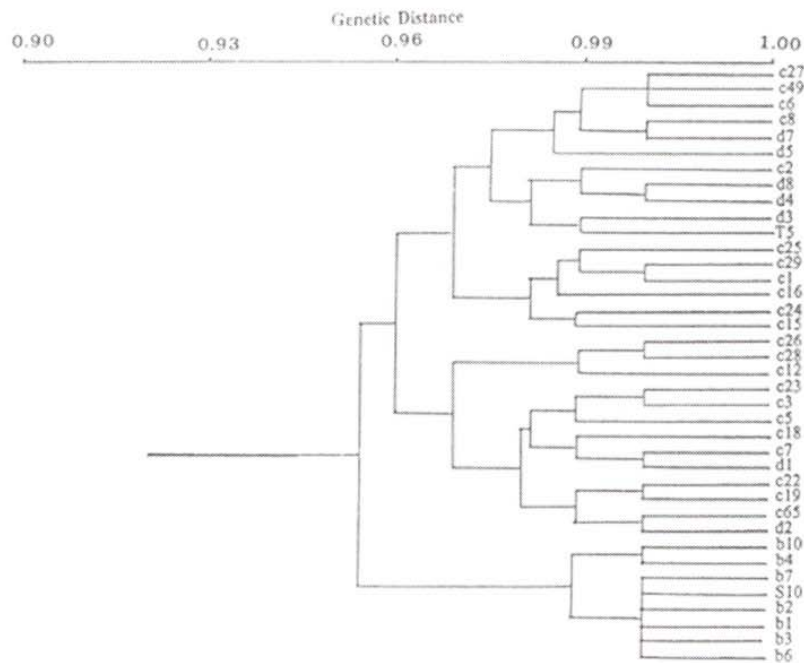


Figure 3. Phylogenetic tree of 38 *Eucalyptus camaldulensis* samples, composing of S10 clone, T5 clone, selfing progenies of S10 clone (b1, b2, b3, b4, b6, b7 and b10), selfing progenies of T5 clone (d1, d2, d3, d4, d5, d7 and d8), crossing progenies between S10 and T5 (c1, c2, c3, c5, c6, c7, c8, c12, c15, c16, c18, c19, c22, c23, c24, c25, c26, c27, c28, c29, c49 and c65)

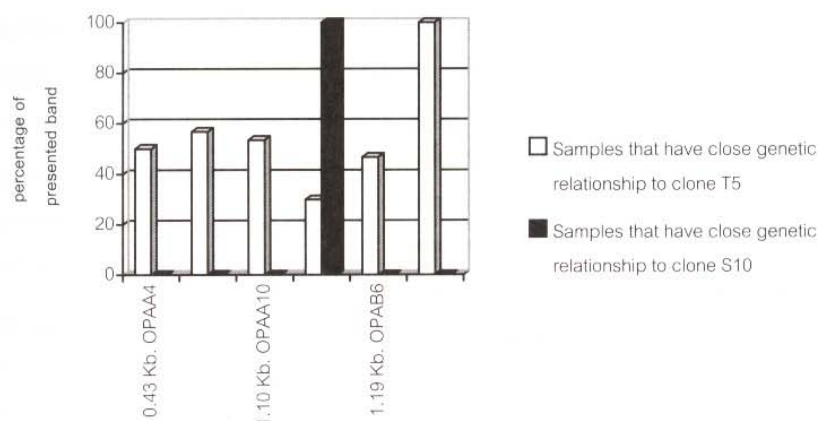


Figure 4. RAPD bands which differ significantly in frequency between two groups of *Eucalyptus camaldulensis* samples (close to clone S10 and clone T5)

สรุป

การตรวจสอบพันธุกรรมของยูคาลิปตัส คามาลดูลูเลนซิสด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอใช้ตัวอย่างในการศึกษาจำนวน 38 ตัวอย่างประกอบด้วยสายต้น S10 สายต้น T5 ลูกที่เกิดจากการผสมตัวเองในแต่ละสายต้นจำนวนชนิดละ 7 ต้น และลูกที่เกิดจากการผสมข้ามโดยมีสายต้น S10 เป็นต้นแม่และสายต้น T5 เป็นต้นพ่อจำนวน 22 ต้น สรุปผลได้ดังนี้

การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Agrawal และคณะ (1992) เพื่อใช้เตรียมดีเอ็นเอของยูคาลิปตัส คามาลดูลูเลนซิสในการทำอาร์เอฟดีให้ผลดีเช่นเดียวกันกับวิธีการอื่นๆ ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของยูคาลิปตัส

ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำอาร์เอฟดีของยูคาลิปตัส คามาลดูลูเลนซิส ได้แก่ ไพรเมอร์ OPAA1 OPAA4 OPAA9 OPAA10 OPAA11 OPAA17

OPAB2 OPAB6 OPAB14 และ OPAC2 ซึ่งก่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างจำนวน 51 แถบ ที่มีขนาด 0.43 – 3.90 กิโลเบส ในไพรเมอร์จำนวนนั้นมี 6 ชนิดที่ก่อให้เกิดความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่าง นอกจากนั้นพบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิดที่ก่อให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถประยุกต์ใช้ในการทำ genetic linkage map และ เครื่องหมายในการคัดเลือก (MAS) ของยูคาลิปตัส คามาลดูลูเลนซิส ซึ่งได้แก่ ไพรเมอร์ OPAA4 OPAA10 OPAA17 OPAB6 และ OPAB14 ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากไพรเมอร์ทั้ง 5 ชนิดดังกล่าวส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเฮเทอโรไซกัสและมีลักษณะการถ่ายทอดที่เป็นไปตามกฎของเมนเดล

ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 10 ชนิดของยูคาลิปตัส คามาลดูลูเลนซิส ทั้ง 38 ตัวอย่างในด้านการปรากฏของแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างยูคาลิปตัส คามาลดูลูเลนซิส ดังกล่าว

มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป จากการจัดจำแนกกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี UPGMA ที่สามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างออกเป็นสองกลุ่มคือกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับสายต้น T5 ซึ่งได้แก่ลูกที่เกิดจากการผสมตัวเองของสายต้น T5 และลูกที่เกิดจากการผสมข้ามของสายต้น S10 และสายต้น T5 กับกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับสายต้น S10 ซึ่งได้แก่ลูกที่เกิดจากการผสมตัวเองของสายต้น S10 เมื่อทำการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างสองกลุ่มตัวอย่าง พบว่ามีความแตกต่างอย่างเด่นชัดของแถบดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบ

คำนิยาม

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับอุปกรณ์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- ศูนย์วิจัยป่าไม้. 2540. พื้นที่ปลูกไม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทย. รายงานการศึกษาโครงการสินค้ายุทธศาสตร์เกษตร กรณีไม้เศรษฐกิจ. คณะวนศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 95 น.
- Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves. Biotech. Biodiver. Lett. 2: 19 – 24.
- Boland, D.J., M.I.H. Brooker, G.M. Chippendale, N. Hall, B.P.M. Hyland, R.D. Johnston, D.A. Kleining and J.D. Turner. 1997. Forest Tree of Australia. 4th ed. Nelson and CSIRO, Australia. 687 p.
- Carlson, J.E., L.K. Tulsierum, J.C. Glaubitz, V.W.K. Luk, C. Kauffeldt and R. Rutledge. 1991. Segregation of random amplified DNA marker in F1 progeny of conifers. Theor. Appl. Genet. 83: 194 – 200.
- Eldridge, K., J. Davidson, C. Hardwood and G. Van Wyx. 1997. Eucalypt Domestication and Breeding. Clarendon Press. Oxford, UK. 288 p.
- Gaiotto, F.A., M. Bramucci and D. Gratta-paglia. 1997. Estimation of outcrossing rate in breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 95: 842 – 849.
- Grattapaglia, D. and R. Sederoff. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudotestcross mapping strategy and RAPD markers. Genetic. 137: 1121 – 1137.
- Grattapaglia, D., F.L.G. Bertolucci, R. Penchel and R. Sederoff. 1996. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using maternal halfsib family and RAPD markers. Genetic. 144: 1205 – 1214.
- Hodge, G.R., P.W. Volker, B.M. Potts and J.V. Owen. 1996. A comparison of genetic information from openpollinated and controlpollinated progeny tests in two eucalypt species. Theor. Appl. Genet. 92: 53 – 63.
- Hu, J. and C.F. Quiros. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Rep. 10: 505 – 511.

- Pillay, M. and S.T. Kenney. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker in hop, *Humulus lupulus*: level of genetic variability and segregation in F1 progeny. Theor. Appl. Genet. 92: 334–339.
- Sale, M.M., B.M. Potts, A.K. West and J.B. Reid. 1996. Molecular differentiation within and between *Eucalyptus risdonii*, *E. amygdalina* and their hybrid using RAPD markers. Aust. J. Bot. 44: 559–569.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18: 6531–6535.
-