

การสร้างรูปแบบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอพี และไอพีบีเอสของไผ่รวกสยาม (*Thyrsostachys siamensis*)

DNA Profiles Generated by SRAP and iPBS of Monastery Bamboo (*Thyrsostachys siamensis*)

โองการ วณิชาชีวะ* และเฟื่องฟ้า สีสร้อย

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร

แขวงอนุสาวรีย์ เขตบางเขน กรุงเทพมหานคร 10220

OngkarnVanijajiva* and FuangfaSeesoi

Faculty of Science and Technology, Phranakhon Rajabhat University,

Anusoawaree, Bangkhen, Bangkok 10220

บทคัดย่อ

เครื่องหมายทางโมเลกุลนับว่าเป็นเครื่องมือสำคัญในการวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่สำคัญ โดยเฉพาะการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคเอสอาร์เอพี (sequence-related amplified polymorphism) และไอพีบีเอส (inter primer binding site) เพื่อตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของไผ่รวกสยาม กลุ่มไผ่เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบมาใช้ในการศึกษา พบว่าในการทำพีซีอาร์ที่เหมาะสมมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอไผ่ต้นแบบ 100 ng และ $MgCl_2$ 5 mM จากการทดสอบด้วยไพรเมอร์เอสอาร์เอพี 24 คู่ไพรเมอร์ของเทคนิคเอสอาร์เอพีจะให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนทั้งหมด 247 แถบโดยเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 10.29 แถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์จากการทดสอบโดยเทคนิคไอพีบีเอสใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของไผ่รวกได้ทั้งหมด 145 แถบโดยเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 7.25 แถบ ดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์สรุปได้ว่าเทคนิคเอสอาร์เอพี และไอพีบีเอสเป็นเทคนิคที่ทำการศึกษาง่ายได้อย่างรวดเร็ว สามารถนำมาใช้ในการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของพืชกลุ่มไผ่ได้

คำสำคัญ : เครื่องหมายทางโมเลกุล; เทคนิคเอสอาร์เอพี; เทคนิคไอพีบีเอส; ไผ่

Abstract

Molecular marker is an important tool in biological research, particularly of genetic diversity and evolution of organisms. In this study, molecular SRAP (sequence-related amplified polymorphism) and iPBS (inter primer binding site) markers were applied to assess genetic characterization of Monastery Bamboo (*Thyrsostachys siamensis* Gamble) one of the most important

agricultural economic Bamboo in Thailand. Genomic DNA was extracted from fresh leaf samples. The result clearly showed that at 100 ng template DNA and $MgCl_2$ 5 mM concentration are suitable for further PCR analysis. Twenty-four combination primers of SRAP technique were initially screened for analysis and all primers were chosen for further analysis. The SRAP technique, DNA band was 247 DNA fragments by 10.29 per DNA primers. Twenty primers of iPBS makers were primarily screened for analysis and all primers were chosen for further analysis. For iPBS technique, DNA band was 145 DNA fragments by 7.25 per DNA primers. Therefore, SRAP and iPBS are simply, rapid and suitable methods for analysis of genetic study among bamboo species.

Keywords: molecular marker; SRAP; iPBS; bamboo

1. คำนำ

เครื่องหมายทางโมเลกุล นับว่าเป็นเครื่องมือสำคัญในการวิจัยความหลากหลายในระดับพันธุกรรมและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตในปัจจุบัน เป็นการศึกษาเครื่องหมายพันธุศาสตร์ที่สำคัญ (ธีระชัย, 2553) ปัจจุบันพบการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลตั้งแต่สิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างเรียบง่ายจำพวกสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เช่น แบคทีเรีย จนถึงสิ่งมีชีวิตที่มีความซับซ้อนทางกายภาพ ได้แก่ พืช และมนุษย์ เป็นต้น (Wagner, 2011) ปัจจุบันพบว่าเครื่องหมายระดับโมเลกุลหลายชนิดสามารถใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพมากกว่าในอดีตที่อาศัยการจำแนกสิ่งมีชีวิตจากลักษณะสัณฐาน (morphology) ที่แตกต่างกันเป็นเครื่องหมายหรือลักษณะสำคัญเพียงอย่างเดียว ส่งผลให้มีข้อจำกัดหลายประการเครื่องหมายระดับโมเลกุลจึงเป็นเพิ่มข้อได้เปรียบ ในการศึกษาวิวัฒนาการ และความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากสามารถทำได้รวดเร็วมีความแม่นยำ และน่าเชื่อถือมากกว่าการอาศัยลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียว

เทคนิคเอสอาร์เอพี (SRAP, sequence-related amplified polymorphism) เป็นเทคนิคที่นำเอาเทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain

reaction) มาใช้โดยเทคนิคเอสอาร์เอพีถูกคิดค้นและพัฒนาโดย Li and Quiros (2001) โดยการนำจีโนมดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของสิ่งมีชีวิตมาทำการเพิ่มปริมาณในส่วน of open reading frame (ORF) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือไพรเมอร์ส่วนหน้า (forward primer) และไพรเมอร์ส่วนหลัง (reverse primer) ที่มีขนาด 17-18 นิวคลีโอไทป์แต่ละไพรเมอร์ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นลำดับเบสหลัก (core sequence) ขนาด 13-14 เบสตามลำดับโดย 10-11 เบสแรกทางด้านปลาย 5' เป็นลำดับเบสที่ไม่มีความจำเพาะเรียกว่าลำดับเบสส่วนเติม (filler sequence) ตามด้วยลำดับเบสจำเพาะคือ CCGG สำหรับลำดับเบสไพรเมอร์ส่วนหน้าและ AATT สำหรับลำดับเบสไพรเมอร์ส่วนหลัง ส่วนที่สองคือนิวคลีโอไทด์แบบคัดเลือก (selective nucleotide) จำนวน 3 เบสทางด้านปลาย 3' ในส่วนของลำดับเบสส่วนเติมของไพรเมอร์ส่วนหน้าและไพรเมอร์ส่วนหลังต้องไม่เหมือนกันไพรเมอร์ต้องไม่เกิด hairpin หรือ secondary structure และต้องมีเปอร์เซ็นต์ GC สูง 40-50 เปอร์เซ็นต์

เทคนิคไอพีบีเอส (iPBS, inter primer binding sites) เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลรูปแบบ

ใหม่พัฒนาขึ้นโดย Kalendar และคณะ (2010) อาศัยหลักการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากการใช้รูปแบบของไพรเมอร์ที่มีขนาด 12-18 นิวคลีโอไทด์บริเวณ tRNA เข้าไปสู่มุมจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายของ long terminal repeat (LTR) บริเวณ retrotransposon ซึ่งเป็นบริเวณที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอมักเกิดการผันแปรทางพันธุกรรมได้ง่ายพบในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอตทุกชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชแทบทุกชนิด ดังนั้นข้อดีของเทคนิคนี้คือผู้วิจัยจึงไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายมาก่อนทำได้ง่ายไม่ซับซ้อนให้ข้อมูลมากค่าใช้จ่ายไม่สูงใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย 25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา และให้รูปแบบดีเอ็นเอที่มีความคงตัวสูง (Kalendar *et al.*, 2011)

ไผ่ (bamboo) จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์หญ้า (Poaceae) การกระจายตัวส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณเขตร้อนและเขตอบอุ่น ทั่วโลกประมาณ 80-90 สกุล 1,500 ชนิด (วีระพงศ์ และดวงใจ, 2550) โดยเฉพาะในทวีปเอเชียที่พบว่าพืชกลุ่มนี้มีความหลากหลายอย่างมาก ในประเทศจีนพบราว 626 ชนิด ประเทศอินเดีย 102 ชนิด ประเทศญี่ปุ่น 84 ชนิด ประเทศพม่าพบ 75 ชนิด ประเทศมาเลเซียพบราว 50 ชนิด (Das and Rout, 1994) สำหรับประเทศไทยพบไผ่จำนวน 15-20 สกุล ประมาณ 80-100 ชนิด (รุ่งนภา และคณะ, 2544) ไผ่ นับเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญ เนื่องจากมนุษย์นำพืชในกลุ่มไผ่มาใช้ในการดำรงชีวิตมาอย่างยาวนาน จนกลายเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่เกี่ยวข้องกับมนุษย์ทั้งในด้านวัฒนธรรม และทางด้านเศรษฐกิจ ไผ่จึงถือว่ามีความสำคัญต่อมนุษย์เป็นอย่างมาก (ธัญพิสิษฐ์, 2557) โดยเฉพาะคนไทย พบหลักฐานการประยุกต์ใช้ไผ่มาใช้ประโยชน์อย่างมากมายเพื่อตอบสนองตามความต้องการทั้งด้านวิถีชีวิตที่อยู่ เนื่องจากสามารถนำทุกส่วนของไผ่มาใช้ประโยชน์

ได้ ได้แก่ หน่อ ลำต้น ใบ ดอก และผล นอกจากนี้ปัจจุบันพบว่าไผ่สามารถสร้างรายได้และเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถสร้างความมั่นคงให้แก่ประเทศได้ และยังช่วยป้องกันดินถล่มได้ เนื่องจากระบบรากฝอยของไผ่ประสานอย่างเหนียวแน่นช่วยยึดติดตามไหล่เขาและริมฝั่งน้ำไว้ไม่ให้พังทลายได้ง่ายรวมทั้งดินชุ่มไผ่ซึ่งมีลักษณะร่วนโปร่งเบาเหมาะกับการปลูกพืช (สุจิตรา, 2553)

ไผ่ นับว่าเป็นพืชที่มีความหลากหลายและจำแนกได้ยากที่สุดกลุ่มหนึ่งในพืชที่มีท่อลำเลียงเนื่องจากลักษณะภายนอกที่มีความผันแปรไปตามสภาวะแวดล้อม รวมทั้งอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น ดอกและเมล็ด ซึ่งถือว่าเป็นส่วนสำคัญในการจำแนกพืชที่มีท่อลำเลียงพบได้ยาก ทำให้การจำแนกและยืนยันชนิดของพืชในกลุ่มนี้ทำได้ยากกว่าพืชในกลุ่มอื่น ๆ (Das and Rout, 1994) พบว่าปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้นวัตกรรมทางโมเลกุลในหลายมิติด้วยกัน โดยเฉพาะการใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในการช่วยยืนยันการจำแนกของพืชกลุ่มนี้ได้ดียิ่งขึ้น สำหรับประเทศไทยพบว่าข้อมูลการประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในการศึกษาพืชในกลุ่มนี้มีน้อยมาก พบว่าสมิต และคณะ (2545) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคอาร์เอฟดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) ในการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่ 13 ชนิด และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้กับงานทางด้านปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต และสุจิตรา (2553) ได้ศึกษาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite marker) ในการเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ชางนวลของอุทยานแห่งชาติแก่งกระจานจังหวัดเพชรบุรีกับแหล่งอื่น ๆ ในประเทศไทย เพื่อประยุกต์ใช้สำหรับการอนุรักษ์ อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการประยุกต์ใช้เทคนิคเอสอาร์เอฟพีและไอพีบีเอสกับไผ่รวมมาก่อน

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประยุกต์ใช้นวัตกรรมทางโมเลกุลในการบ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรมของไผ่รวกสยาม โดยใช้เทคนิคเอสอาร์เอพีในการสร้างรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมในการจำแนกกลุ่มพืชวงศ์ไผ่ในอนาคตต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำ ส่วน ใบ อ่อน ไผ่ รว ก สยาม (*Thyrsostachys siamensis* Gamble) จำนวน 100-150 กรัม มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น นำมาบดโดยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบโดยใช้สารละลาย CTAB ดัดแปลงตามวิธีของโองการ (2555) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยที่สกัดได้โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นอะกาโรสเจล (agarose gel electrophoresis) เข้มข้น 0.8 %

2.2 การทดสอบเทคนิคเอสอาร์เอพี

ดีเอ็นเอไผ่รวกสยามต้นแบบที่ได้มาทดสอบเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์เบื้องต้นในตารางที่ 1 โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 µl ประกอบด้วย 10x Promega reaction buffer (100 mM Tris-HCl pH 9, 500 mM KCl, 1 % Triton X-100), 0.4 mM each dNTP, 0.6 mM primer, 0.5 unit *Taq* polymerase (Promega), $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 3, 4, 5 mM และ 25, 50, 100 ng ของดีเอ็นเอไผ่ต้นแบบนำใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermohybrid PX2 ที่มีอุณหภูมิในขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ initiation denaturation อุณหภูมิ 94 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 94 °C นาน 1 นาที 30 วินาที อุณหภูมิ 35 °C นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 °C นาน 2 นาที จำนวน 5 รอบ และ

ตามด้วย 30 รอบของการปรับเพิ่มอุณหภูมิในช่วง annealing ขึ้นเป็น 50 °C และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 8 นาที จำนวน 1 รอบ

Table 1 SRAP primers

Forward primer	Sequence (5'-3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC
Reverse primer	Sequence (5'-3')
Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Em6	GACTGCGTACGAATTGCA

2.3 การทดสอบเทคนิคไอพีบีเอส

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับเทคนิคเอสอาร์เอพีเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์เบื้องต้นในตารางที่ 2 แต่ปรับอุณหภูมิและรอบในการทำพีซีอาร์ดังนี้ เริ่มด้วยอุณหภูมิ 95 °C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 45-50 °C นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 °C นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และอุณหภูมิ 72 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ

2.4 การตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอ

ทำการตรวจโดยใช้เทคนิคโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.8 % จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เทียบกับดีเอ็นเอขนาด 100 bp โดยตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, UK)

โดยใช้โปรแกรม Gene Snap (Syngene, Cambridge, UK)

Table 2 iPBS primers

Primer	Sequence (5'-3')
2081	GCAACGGCGCCA
2272	GGCTCAGATGCCA
2076	GCTCCGATGCCA
2077	CTCACGATGCCA
2079	AGGTGGGCGCCA
2080	CAGACGGCGCCA
2083	CTTCTAGCGCCA
2085	ATGCCGATACCA
2374	CCCAGCAAACCA
2378	GGTCCTCATCCA
2380	CAACCTGATCCA
2392	TAGATGGTGCCA
2393	TACGGTACGCCA
2394	GAGCCTAGGCCA
2273	GCTCATCATGCCA
2277	GGCGATGATACCA
2279	AATGAAAGCACCA
2382	TGTTGGCTTCCA
2389	ACATCCTTCCCA
2391	ATCTGTCAGCCA

3. ผลการวิจัย

3.1 การสกัดดีเอ็นเอไผ่รวกสยาม

จากการสกัดดีเอ็นเอเบื้องต้นด้วยสารละลาย CTAB โดยดัดแปลงจากวิธีของโองการ (2555) พบว่าได้ปริมาณดีเอ็นเอมากพอกับความต้องการในการนำมาใช้ศึกษา โดยจากการสกัดดีเอ็นเอในครั้งนี้พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และความเข้มข้นแตกต่างกันโดยเมื่อนำ

ดีเอ็นเอมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยเทียบอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวัดค่าความบริสุทธิ์และค่าความเข้มข้นนั้น พบว่าค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสามารถหาได้จากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบผลคือ ถ้าค่าที่ได้อยู่ระหว่าง 1.62 ถึง 1.93 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เหมาะแก่การนำไปศึกษาขั้นต่อไป ถ้าค่าดีเอ็นเอที่ได้เท่ากับ 1.5 หรือต่ำกว่า แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนอยู่มาก และถ้าค่าที่ได้เท่ากับ 2.0 หรือมากกว่า แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนอยู่มาก อาจต้องนำกลับไปกำจัดด้วย RNase จากการศึกษพบว่าไผ่รวกสยามที่ยังอ่อนอยู่เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอจะให้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าใบที่มีความแก่กว่าซึ่งมักจะให้ดีเอ็นเอที่มีสีน้ำตาลไม่เหมาะนำมาทำพีซีอาร์ต่อเนื่องจากมีสารโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) และฟีนอลิกคอมพาวด์ (phenolic compound) ปนมากับดีเอ็นเอซึ่งไปรบกวนกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการทำพีซีอาร์ จากนั้นนำมาตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นอะกาโรสเจล พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ มีลักษณะเป็นแถบชัดเจนเพียงแถบเดียว

3.2 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค เอสอาร์เอฟ

จากการทดสอบไพรเมอร์คู่ผสมที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไผ่รวกสยามโดยใช้เทคนิค เอสอาร์เอฟ ทั้ง 24 คู่ เพื่อใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์จากการปรับปริมาณสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอไผ่ต้นแบบ 100 ng พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัดสูงมีความเหมาะสมที่สุดที่จะใช้ทำปฏิกิริยาใน

การศึกษาครั้งนี้ และพบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 5 mM ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนสูงสุด

จากการทดสอบเบื้องต้นเพื่อทำการคัดเลือกชนิดไพรเมอร์ที่เหมาะสมสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของไผ่รวก ซึ่งใช้กลุ่มไพรเมอร์ที่ประกอบด้วยไพรเมอร์ส่วนหน้า 4 ชนิด และไพรเมอร์ส่วนหลัง 6 ชนิดไพรเมอร์คู่ผสมทั้งหมด 24 คู่ไพรเมอร์พบว่าชนิดไพรเมอร์ 24 คู่ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของไผ่รวกได้ทั้งหมด 247 แถบ โดยเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 10.29 แถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ ส่วนใหญ่ที่ให้ความแตกต่างกันจะอยู่ในช่วง 100-3000 คู่เบส (Fig. 1-2)

3.2 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอพีบีเอส

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไผ่รวกสยามโดยใช้เทคนิคเอสอาร์เอฟพีทั้ง 24 ชนิด เพื่อใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์จากการปรับปริมาณสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอไผ่ต้นแบบ 100 ng มีแถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัดสูงมีความเหมาะสมที่สุดที่จะใช้ทำปฏิกิริยาในการศึกษาครั้งนี้ และพบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 5 mM ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนสูงสุด จากการทดสอบเบื้องต้นเพื่อทำการคัดเลือกชนิดไพรเมอร์ที่เหมาะสมสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของไผ่รวกจากไพรเมอร์ทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ พบว่าทุกไพรเมอร์สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ พบแถบทั้งหมด 145 แถบ เฉลี่ย 7.25 แถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ (Fig. 3-4)

4. วิจัย

4.1 การเตรียมดีเอ็นเอและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เทคนิคเอสอาร์เอฟพีและไอพีบีเอสเป็นเทคนิคที่ใช้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อย แต่ต้องเป็น

ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์และอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ (integrity) การเตรียมดีเอ็นเอจากใบไผ่มีปัญหาค่อนข้างมาก เนื่องจากใบไผ่มีสารประกอบฟีนอลอยู่ในปริมาณมากเช่นเดียวกับพืชเขตร้อนชนิดต่าง ๆ ดังนั้นสำหรับการเตรียมดีเอ็นเอจากใบไผ่ในครั้งนี้ใช้วิธีการของ Doyle และ Doyle (1987) ที่มีการปรับปรุงโดยโองการ (2555) เนื่องจากได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดี ใช้เวลาในการสกัดน้อย สามารถทำได้หลายตัวอย่างต่อวัน และควรสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อน จะได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีกว่าใบแก่ นอกจากนี้ยังสามารถปรับเปลี่ยนปริมาณสารในขั้นต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับพืชชนิดอื่นได้ง่าย และราคาไม่สูงมากเมื่อเทียบกับน้ำยาสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอ สอดคล้องกับผลการศึกษาของโองการ (2555) ที่เตรียมดีเอ็นเอจากใบกระชายกระบี่ได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ และสามารถนำไปวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้อย่างมีคุณภาพ

4.2 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงและอนุรักษ์สายพันธุ์ไผ่

จุดประสงค์สำคัญในปรับปรุงการอนุรักษ์ทรัพยากรของสิ่งมีชีวิตเพื่อให้ประชากรของสิ่งมีชีวิตคงอยู่ต่อไปได้นั้น พบว่าประเด็นสำคัญคือข้อมูลพื้นฐานความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจส่งผลต่อความอยู่รอดของประชากรของสิ่งมีชีวิตในการอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปทั้งในระยะสั้นและในระยะยาว ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับการความหลากหลายทางพันธุกรรมนั้นนับเป็นหัวใจสำคัญในกระบวนการวางแผนในการปรับปรุงและอนุรักษ์สิ่งมีชีวิตแต่ละท้องถิ่น (โองการ, 2555) จากการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Ding และคณะ (2010) ที่สามารถประยุกต์ใช้เทคนิคเอสอาร์เอฟพีในการศึกษาไผ่น้ำ (*Zizania latifolia* Turcz) ในประเทศจีนได้ และ Lin และคณะ (2011)

ที่รายงานว่ารูปแบบของเทคนิคเอสอาร์เอฟที่สามารถ
ยืนยันการจำแนกไผ่ชนิด *Phyllostachys*
violascens อย่างไรก็ตาม พบว่าสำหรับเทคนิค

ไอพีบีเอสยังไม่เคยมีการประยุกต์ใช้กับไผ่ชนิดใด
มาก่อน

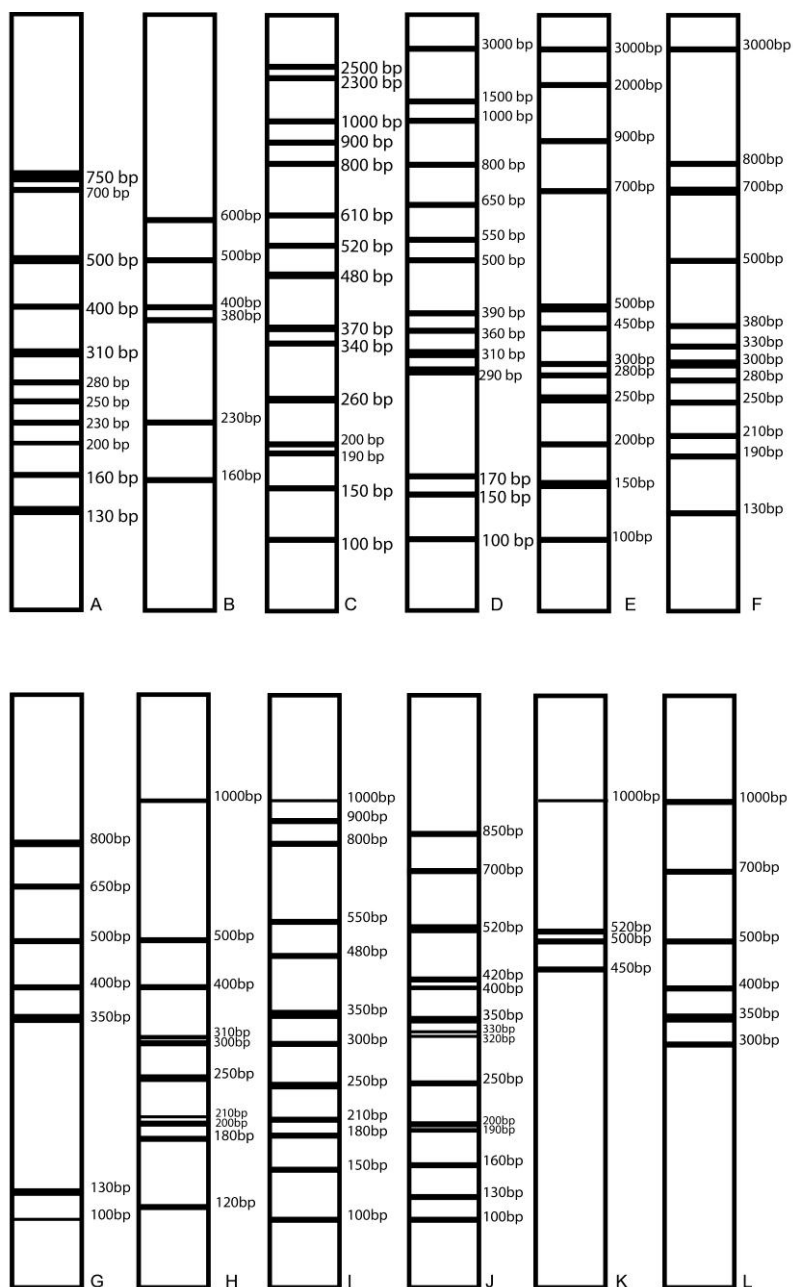


Figure 1 DNA profiles of SRAP primers: A (me1/em1), B (me1/em2), C (me1/em3), D (me1/em4), F (me1/em5), G (me2/em1), H (me2/em2), I (me2/em3), J (me2/em4), K (me2/em5), L (me2/em6)

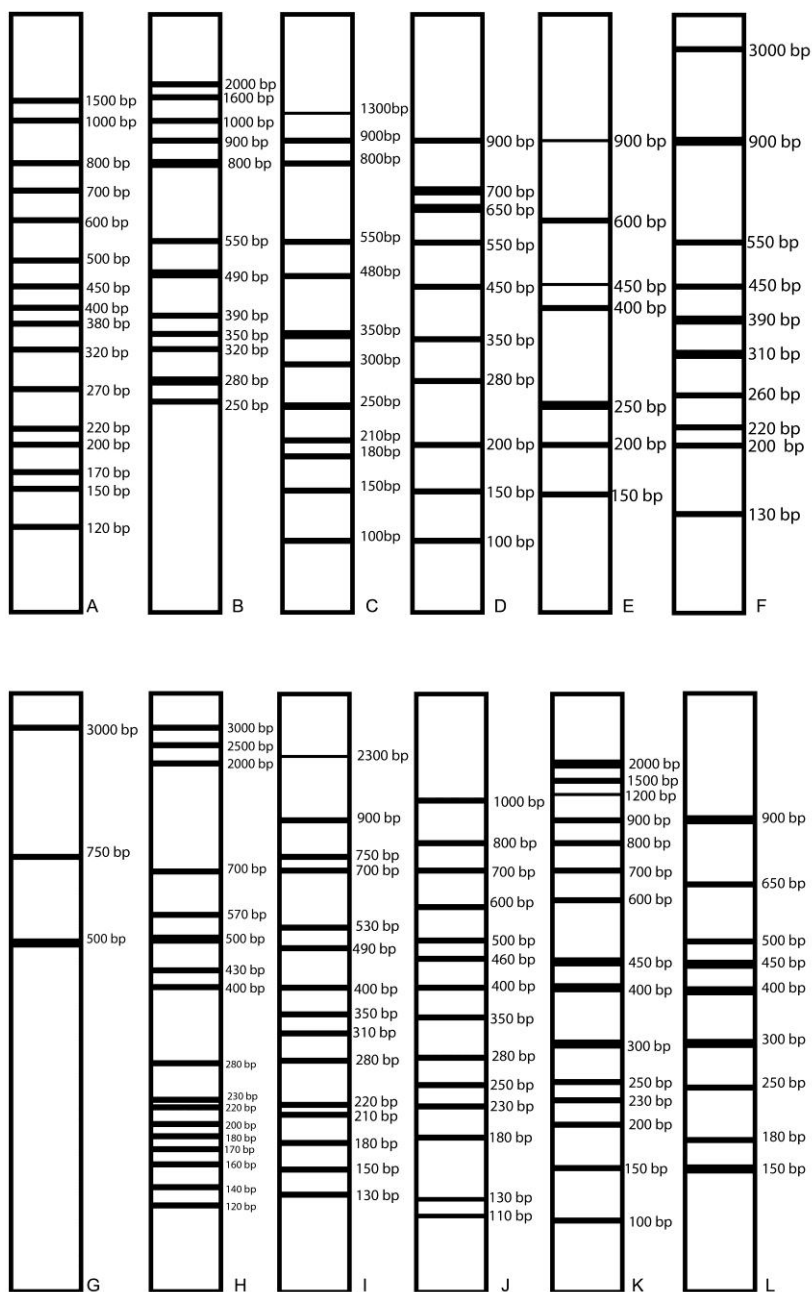


Figure 2 DNA profiles of SRAP primers: A (me3/em1), B (me3/em2), C (me3/em3), D (me3/em4), F (me3/em5), G (me4/em1), H (me4/em2), I (me4/em3), J (me4/em4), K (me4/em5), L (me4/em6)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถประยุกต์ใช้เทคนิคเอสอาร์เอพีและไอพีบีเอสในการศึกษา ลักษณะทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ไผ่ในประเทศไทยได้ รวมทั้งทำให้ทราบถึงรูปแบบของพันธุกรรมของไผ่รวกสยามซึ่งเป็นพืชที่มีความทนทานต่อสภาพอากาศเขตร้อนและพบกระจายตัวทั่วไปใน

ประเทศไทย นิยมนำมาใช้เป็นพืชประดับซึ่งช่วยในการป้องกันพังทลายของหน้าดินได้ตังนั้นข้อมูลที่ได้นับเป็นข้อมูลพื้นฐานในการยืนยันการจำแนกพืชชนิดนี้จากสกุลไผ่ชนิดอื่น ๆ ให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น อีกทั้งสามารถนำข้อมูลและเทคนิคที่ได้ประยุกต์ใช้กับไผ่ชนิดอื่น ๆ ในประเทศไทยต่อไป

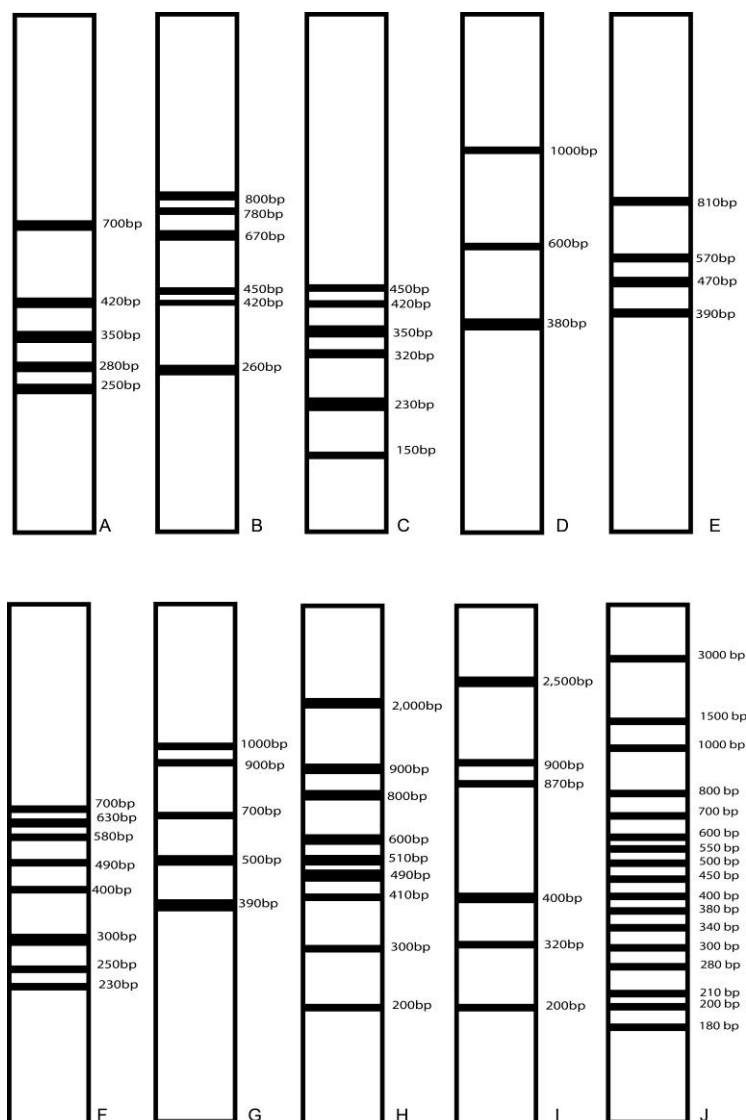


Figure 3 DNA profiles of iPBS primers: A 2081, B 2272, C 2076, D 2077, E 2079, F 2080, G 2083, H 2085, I 2374, J 2378

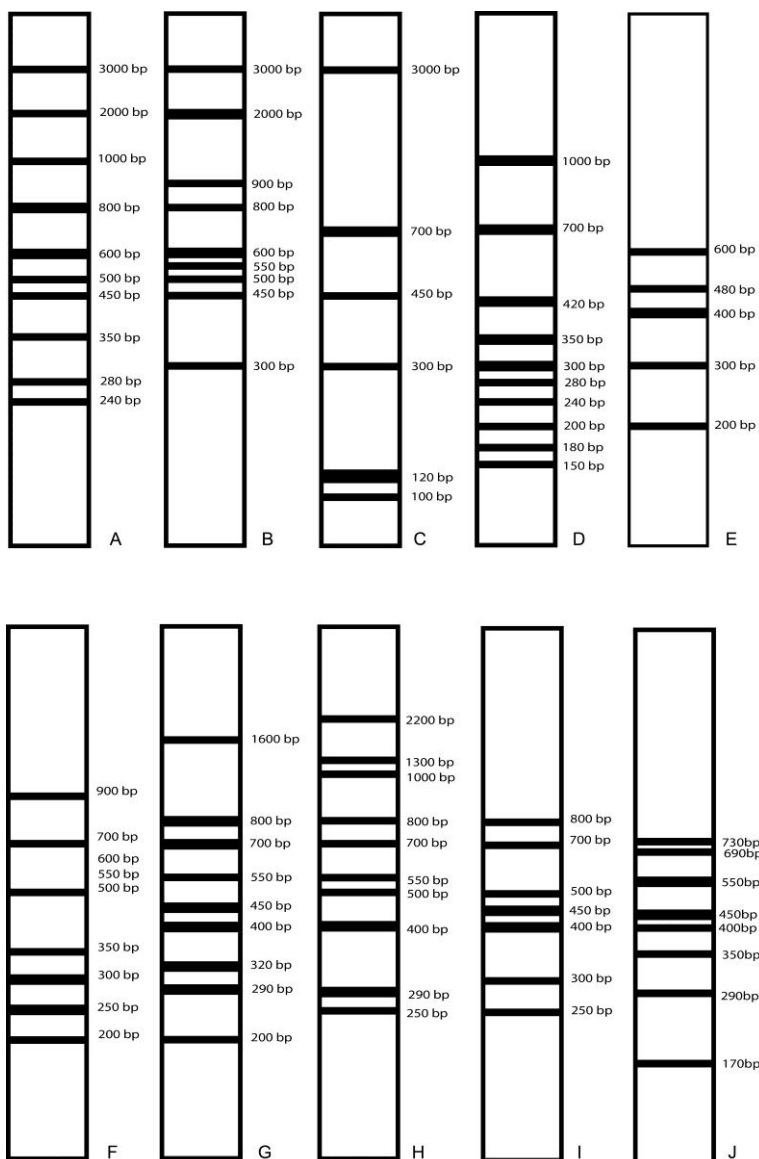


Figure 4 DNA profiles of iPBS primers: A 2380, B 2392, C 2393, D 2394, E 2273, F 2277, G 2279, H 2382, I 2389, J 2391

ในอนาคตกาได้ตัวอย่างชนิดไม่มากขึ้น รวมทั้งไพรมอร์เอสอาร์เอฟี่ที่มากขึ้น และใช้เทคนิคอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) เอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence

repeats) จะสามารถทำให้ทราบถึงข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ในประเทศไทยมากยิ่งขึ้น อันน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการยืนยันผลการจำแนก การพัฒนา และการอนุรักษ์สายพันธุ์ที่ยั่งยืนต่อไป

5. สรุป

การสกัดดีเอ็นเอทำโดยใช้ CTAB ดัดแปลงวิธีการมาจากวิธีการของโองการ (2555) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจากพืชหลายชนิด เนื่องจากได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดี ใช้เวลาในการสกัดน้อยสามารถทำได้หลายตัวอย่างต่อวัน และควรสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อน จะได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีกว่าใบแก่ นอกจากนี้ยังสามารถปรับเปลี่ยนปริมาณสารในชั้นต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับพืชชนิดอื่นได้ง่าย และราคาไม่สูงมาก เมื่อเทียบกับน้ำยาสำเร็จในการสกัด ดีเอ็นเอ และจากการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลของไผ่รวกสยามโดยเทคนิคเอสอาร์เอพีจาก 24 คู่ไพรเมอร์พบว่าให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 247 แถบ เฉลี่ย 10.29 แถบต่อไพรเมอร์ สำหรับเทคนิคไอพีบีเอสใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของไผ่รวกได้ทั้งหมด 145 แถบโดยเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 7.25 แถบ ดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ส่วนใหญ่ที่ให้ความแตกต่างกันจะอยู่ในช่วง 100-3000 คู่ ดังนั้นสรุปได้ว่าเทคนิคเอสอาร์เอพีและเทคนิคไอพีบีเอสสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในพืชวงศ์ไผ่ได้ดีและเหมาะที่จะนำไปศึกษาพืชกลุ่มนี้ต่อไปในอนาคต เนื่องจากทำการทดลองได้ง่าย ให้อุปกรณ์แบบของดีเอ็นเอที่มีความคงตัวสูง และราคาไม่สูงมากเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่น ๆ

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร สำหรับการสนับสนุนในทุกด้าน และผู้ทรงคุณวุฒิไม่ทราบนามในการตรวจสอบเนื้อหาให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

7. เอกสารอ้างอิง

- ธีระชัย ธนาคันต์, 2553, พันธุศาสตร์โมเลกุล, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี.
- ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก, 2557, ไผ่: พืชพลังงานแห่งอนาคต ?, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22:130-136.
- วีระพงศ์ โคระวัตร และดวงใจ สุขเฉลิม, 2550, การศึกษาอนุกรมวิธานของไผ่ (วงศ์ Poaceae) สกุลไผ่ป่า (*Bambusa* Schreber) สกุลไผ่ตง (*Dendrocalamus* Nees) สกุลไผ่ไร่ (*Gigantochloa* Kurz) ในผืนป่าตะวันตก, รายงานการวิจัยในโครงการ BRT, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- รุ่งนภา พัฒนวิบูลย์, บุญฤทธิ์ ภูริยากร และวัลย์พร สติติวิบูลย์, 2544, ไผ่ไม้ในประเทศไทย, สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.
- รังสันต์ หล้าพรหม และสุจิตรา จางตระกูล, 2548. การประเมินความหลากหลายของพันธุกรรมของไผ่บางชนิดในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีและไมโครแซทเทลไลต์, รายงานการประชุมความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ และสัตว์ป่า, เพชรบุรี.
- สมิต บุญเสริมสุข, รุ่งนภา พัฒนวิบูลย์ และวัลย์พร สติติวิบูลย์, 2545, น. 321-331, ใน รายงานการสัมมนาทางวนวัฒนวิทยาครั้งที่ 7: วนวัฒนวิทยาเพื่อพัฒนาสวนป่าเศรษฐกิจ.
- สุจิตรา จางตระกูล, 2553, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ขางนวล (*Dendrocalamus membranaceus*) ในประเทศไทยโดยใช้ Microsatellite Markers, การประชุมวิชาการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 3 : ความ

- หลากหลายทางชีวภาพภูมิภาคชีวิตโลก, ศูนย์
แสดงสินค้าและการประชุมอิมแพ็คเมืองทอง
ธานี, นนทบุรี.
- โครงการ วนิชาชีวะ, 2555, ความแปรปรวนทาง
พันธุกรรมในระดับต่ำของกระชายกระบี่พิษ
เฉพาะถิ่นที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของประเทศ
ไทยโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี, Thai J.
Genet. 5: 63-75.
- Das, M., Bhattacharya, S., Singh, P.,
Filgueiras, T.S. and Pal, A., 2008,
Bamboo taxonomy and diversity in the era
of molecular markers, Adv. Bot. Res. 47:
225-268.
- Ding, C.H., Hua, J.W., Hu, T.T. and Xu, P.,
2010, Genetic diversity analysis of water
bamboo (*Zizania latifolia* Turcz.)
germplasms in Zhejiang employing SRAP
markers, Acta Agri. Zhejian gensis 5: 5-
15.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA
isolation procedure for small quantities of
fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-
15.
- Kalendar, R., Antonius, K., Smykal, P. and
Schulman, A.H., 2010, iPBS: A universal
method for DNA fingerprinting and
retrotransposon isolation, Theor. Appl.
Genet. 121: 1419-1430.
- Kalendar, R, Flavall, A.J., Ellis, T.H.N., Sjakste,
T., Moisy, C. and Schulman, A.H., 2011,
Analysis of plant diversity with
retrotransposon-based molecular markers,
Heredity 106: 520-530.
- Li, G. and Quiros, C.F., 2001, Sequence-
related amplified polymorphism (SRAP), a
new marker system based on a simple
PCR reaction: Its application to mapping
gene tagging in Brassica, Theor. Appl.
Genet. 103: 455-461.
- Lin, X., Lou, Y., Zhang, Y., Yuan, X., He, J.
and Fang, W., 2011, Identification of
genetic diversity among cultivars of
Phyllostachys violascens using ISSR,
SRAP and AFLP markers, Bot. Rev. 77:
223-232.
- Wagner, A., 2011, The molecular origins of
evolutionary innovations, Trend. Genet.
27: 397-410.