การวิเคราะห์พันธุกรรมของชำมะเลียง 2 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

(The Genetic Analysis of Two Varieties of Luna nut by Random Amplified Polymorphic DNA Technique, RAPD)

วรพันธ์ บุญชัย*

*สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ถนนอิสรภาพ 15 แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างและเปรียบเทียบแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ผลการวิจัยพบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิดได้แก่ เอ03 เอ13 บี04 ซี02 เค10 เค20 เค08 ดี11 ไอ01 และไอ07 สามารถที่จะสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แยกความแตกต่างของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำในระดับสายพันธุ์เมื่อใช้ไพรเมอร์เค 10 โดยไพรเมอร์เค 10 เกิดแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีขนาด 600 คู่เบส ในชำมะเลียงขาว สหรับชำมะเลียงดำไม่เกิดแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบส จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำโดยใช้โปรแกรมเอ็นทีเอสวาย พบว่า มีค่าความแตกต่างทางวิวัฒนาการระหว่างชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ เท่ากับ 0.9512 ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อจำแนกความแตกต่างทางสายพันธุ์ของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ

คำสำคัญ : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ/ เทคนิคอาร์เอพีดี/ ชำมะเลียง

Abstract

The objectives of this research were to construct and compare DNA fingerprinting of two varieties of *Lepisanthes fruticosa* by RAPD technique. 10 primers included A03, A13, B04, C02, K10, K20, K08, D11, I01 and I07 were used to separate 2 varieties of *Lepisanthes fruticosa*. The results revealed that K10 primer generated different DNA fingerprinting of that two varieties with DNA band at 600 base pairs in *Lepisanthes fruticosa* (white) and no DNA band at 600 base pairs in *Lepisanthes fruticosa* (black). Genetic analysis of two varieties of *Lepisanthes fruticosa* by NTSYSpc program for Windows Version 2.10e showed phylogenetic tree between *Lepisanthes fruticosa* (white) and *Lepisanthes fruticosa* (black) at 0.9512. Therefore, DNA fingerprinting of the two varieties of *Lepisanthes fruticosa* by RAPD techniques can be used for genetic analysis.

Keywords: DNA fingerprinting/ *Lepisanthes fruticosa* / RAPD technique

บทนำ

การวิเคราะห์พันธุกรรมหรือการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นวิธีการตรวจเอกลักษณ์ของสารพันธุกรรม ซึ่งมีประโยชน์ในการจัดจำแนก เนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแตกต่างกัน (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2546) เทคนิคการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปัจจุบันมีหลายวิธี วิธีหนึ่งคือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือวิธีพีซีอาร์ โดยการตรวจสอบดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งโดยวิธีพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ชนิดสุ่มรหัสเพียงชนิดเดียวมาใช้เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ จากตอนแรกมีจำนวนน้อยๆ ให้มีการเพิ่มจำนวนขึ้นเฉพาะบางแห่งเท่านั้น จนเมื่อดีเอ็นเอมีมากขึ้นก็สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและย้อมเห็นแถบดีเอ็นเอบางแถบได้ วิธีนี้จึงเรียกว่า อาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) ซึ่งสามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดีทั้งชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน เพราะเป็นวิธีทำได้ง่าย รวดเร็วและสามารถใช้ได้ดีกับตัวอย่างจำนวนมากๆ (มลิวรรณ นาคขุนทด, 2541)

ชำมะเลียงมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Lepisanthes fruticosa* (Roxb.) Leenth. ชื่อวงศ์ Sapindaceae ชื่อสกุลคือ *Lepisanthes* ชำมะเลียงมีชื่อสามัญในแต่ละท้องถิ่นแตกต่างกัน เช่น ชำมะเลียงบ้าน ชำมะเลียง พุมเรียง พุงเรียง สวน ชุมเรียง มะเต้า (ภาคเหนือ) พูเวียง (นครราชสีมา) ในประเทศไทยพบขึ้น ตามป่าโปร่งทั่วไปในที่ราบที่ลาดเนินหรือปลูกไว้กินผลตามบ้าน ในต่างประเทศพบทั่วไปในประเทศอินโดนีเซีย ประเทศมาเลเซีย เป็นต้น การใช้ประโยชน์เป็นพืชอาหารส่วนที่ใช้เป็นอาหารคือ ผลสุกจะมีรสหวานมีเนื้อหุ้มเมล็ดสีดำแดง ด้านสมุนไพร ส่วนที่ใช้เป็นสมุนไพร

คือ ราก แก้ไข้สันนิบาต แก้ไข้ร้อนในด้านการเป็นไม้ประดับ คือ เป็นไม้ขนาดเล็กมาก รูปทรงต้นเป็นรูปกรวยสูงหรือทรงกระบอก ไม่มีกิ่งก้านสาขาที่เกะกะ ใช้พื้นที่แคบ ๆใบเขียวเข้มตลอดปี เมื่อผลิใบใหม่สีเขียวอ่อนแกมเหลืองสดใส แต้มด้วยก้านใบและประดับด้วยหูใบดูแปลกตา ผลกินได้และให้สีสวย นิยมใช้ในการจัดสวนตามบ้านและสถานที่ราชการ อีกทั้งยังปลูกเป็นพืชอาหารสัตว์ป่าในป่าอนุรักษ์ได้ (ธงชัย เปาอินทร์ และ นิวัตร เปาอินทร์, 2544)

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี และวิเคราะห์แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยมีขั้นตอน 4 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 วิธีแยกสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืช

1.1 ใช้ใบพืชขนาดเล็ก 1 ใบ เลือกใบยอด น้ำหนักใบพืช 0.1 กรัม ใส่ใบพืชลงในโกร่งสำหรับบด

1.2 เติมชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอจากพืช ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และทำการบดใบพืชให้ละเอียด

1.3 ดูดสารละลายใส่ในหลอดที่เตรียมไว้ จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม 5 นาที

1.4 ทำการหมุนเหวี่ยงแยกเศษพืชออกที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนออกมาใส่หลอดใหม่ (450 – 500 ไมโครลิตร)

1.5 ทำการหมุนเหวี่ยงตะกอนดีเอ็นเอโดยผสมปริมาตร 0.225 ไมโครลิตร ของสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 100% และผสมตัวอย่างให้เข้ากัน 6 – 8 นาที และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ เป็นเวลา 4 นาที

1.6 เทสารละลายส่วนบนทิ้งและเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่อยู่ด้านล่างไว้

1.7 เติมน้ำยาสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากพืชปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสารละลายเอทานอลปริมาตร 150 ไมโครลิตร กับตะกอนดีเอ็นเอผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม

1.8 พักตัวอย่างไว้ 5 นาที และทำการหมุนเหวี่ยงตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ เป็นเวลา 4 นาที

1.9 ทำการย้ายน้ำยาออก เติมเอทานอลความเข้มข้น 75% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที

1.10 ดูดสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 75% ออกให้หมดเท่าที่จะทำได้ คว่ำหลอดบนกระดาษซับ จนกว่าตะกอนจะแห้ง หรือทำให้แห้งในเครื่องสุญญากาศ

1.12 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ 50 ไมโครลิตร

1.13 เติมอาร์เอ็นเอเอส (RNAase) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ

ขั้นที่ 2 การตรวจวิเคราะห์ผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 1% สำหรับตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่เตรียมจากเนื้อ เยื่อพืช โดยมีวิธีการทำดังนี้

2.1 เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย

2.2 ชั่งผงอะกาโรส 1 กรัม เติมบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ในสารละลายทีบีอีบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร

2.3 หลอมอะกาโรสโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรส ละลายจนหมด

2.4 ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50 - 55 ^{O}C แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้เจล หนาประมาณ 5 มิลลิเมตร เสียบหวีลงไปตรงตำแหน่งเพื่อทำให้เกิดร่องสำหรับหยดตัวอย่างดีเอ็นเอ ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

2.5 เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อย ๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ใส่บัฟเฟอร์ให้ท่วมเจล โดยให้สูงกว่าผิวเจล 2 – 3 มิลลิลิตร

2.6 ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่สกัด 5 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายของสีติดตาม (loading buffer) 1ไมโครลิตร แล้วหยอดสารที่ผสมแล้วลงไปในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้

2.7 ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าโดยแรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 100โวลต์ต่อเซนติเมตร

2.8 ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนไปพอประมาณ โดยดูจากสีติดตามที่ผสมอยู่ในสารละลายของ ดีเอ็นเอแล้วจึงปิดเครื่อง

2.9 นำเจลมาย้อมในสารละลายระบบเจลสตาร์ (gel star) ขั้นนี้ต้องระวังไม่สัมผัสกับสารละลายด้วยมือเปล่า เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen)

2.10. นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

ขั้นที่ 3 วิธีทำอาร์เอพีดี

ในการทดลองเบื้องต้นต้องตรวจหาไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ก่อนโดยใส่สารต่างๆ ในปฏิกิริยาที่ระดับหนึ่ง เมื่อเลือกได้ไพรเมอร์ที่ต้องการแล้ว จึงทดลองเปลี่ยนแปลงสภาพต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ และอุณหภูมิกับเวลาที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ เพื่อให้ได้สภาพที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3.1 การหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในชำมะเลียงขาวและดำโดยในการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิดมีลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ 1

3.1.1 ผสมสารต่างๆ ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ 10 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัย

ไพรเมอร์	ลำดับเบส
A03	5'-AGTCAGCCAC-3'
A13	5'-CAGCACCCAC-3'
B04	5'-GGACTGGAGT-3'
C02	5'-GTGAGGCGTC-3'
K10	5'-GTGCAACGTG-3'
K20	5'-GTGTCGCGAG-3'
K08	5'-GAACACTGGG-3'
D11	5'-AGCGCCATTG-3'
I01	5'-ACCTGGACAC-3'
I07	5'-CAGCGACAAG-3'

ตารางที่ 2 ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อศึกษาการทำอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด ในชำมะเลียงขาวและดำ

สารที่ใช้ (µl)	ไพรเมอร์									
	A13	K08	K10	K20	A03	B04	C02	D11	I01	I07
ดีเอ็นเอ (1 ng / µl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10×$MgCl_2$ free PCR Buffer	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10×PCR buffer w / 20 mM $MgCl_2$	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
dNTP (2 mM)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ไพรเมอร์ (5 pmole / µl)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Taq polymerase (5 unit / µl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
น้ำกลั่น	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
ปริมาตรรวม	20 ไมโครลิตร									

3.1.2 นำเข้าสู่กระบวนการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิคอาร์เอพีดี และใช้สภาวะการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังนี้

1) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที

2) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที (สำหรับ denature)

อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส 1 นาที (สำหรับ annealing)

อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที (สำหรับ primer extension) ทำซ้ำ 45 รอบ

3) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที เพื่อให้เกิด primer extension

4) หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา หยุดปฏิกิริยาด้วย 10 ul Loading buffer (10 mM EDTA (pH 8.0), 98% formamide, Bromophenol Blue & Xylenecyanol) และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.1.3 ตรวจวิเคราะห์ผลโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ตามขั้นตอนที่ 4

ขั้นที่ 4 การตรวจวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นที่ 3 กระบวนการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีวิธีการทำดังนี้

4.1 เตรียมถาด สำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย

4.2 ชั่งผงอะกาโรส 1.5 กรัม เติมบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ในสารละลายทีบีอีบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร

4.3 หลอมอะกาโรสโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรสละลายจนหมด

4.4 ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50 - 55 ^{O}C แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้เจล หนาประมาณ 5 มิลลิเมตร เสียบหวีลงไปตรงตำแหน่งเพื่อทำให้เกิดร่องสำหรับหยดตัวอย่างดีเอ็นเอ ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

4.5 เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ใส่บัฟเฟอร์ให้ท่วมเจล โดยให้สูงกว่าผิวเจล 2 – 3 มิลลิลิตร

4.6 ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายของสีติดตาม 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดสารที่ผสมแล้วลงไปในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้

4.7 ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส แล้วเปิดกระแสไฟฟ้า โดยแรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร

4.8 ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนไปพอประมาณ โดยดูจากสีติดตามที่ผสมอยู่ในสารละลายของ ดีเอ็นเอแล้วจึงปิดเครื่อง

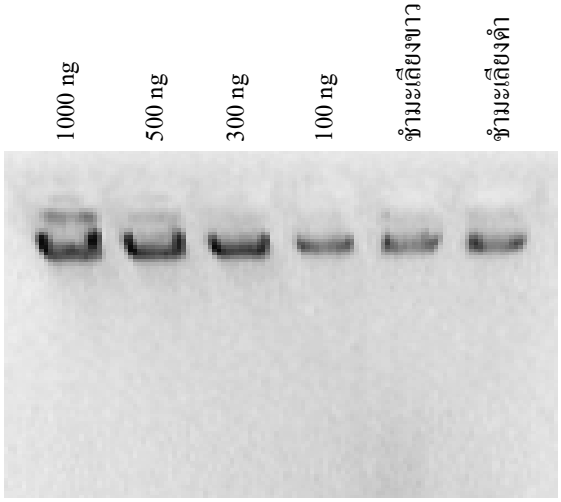
4.9 นำเจลมาย้อมในสารละลายระบบเจลสตาร์ ขั้นนี้ต้องระวังไม่สัมผัสกับ

สารละลายด้วยมือเปล่า เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง

4.10 นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

4.11 ทำการเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแผ่นเจล โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ จะให้คะแนนเป็น 1 ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้คะแนนเป็น 0

นำผลการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างชำมะเลียง ทั้ง 2 ชนิดตัวอย่าง โดยใช้ program NTSYSpc for Windows Version 2.01e รายงานผลในรูปแบบของไฟโลจีเนติกทรี (phylogenetic tree)



ภาพที่ 1 ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้ของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ

ผลการวิจัย

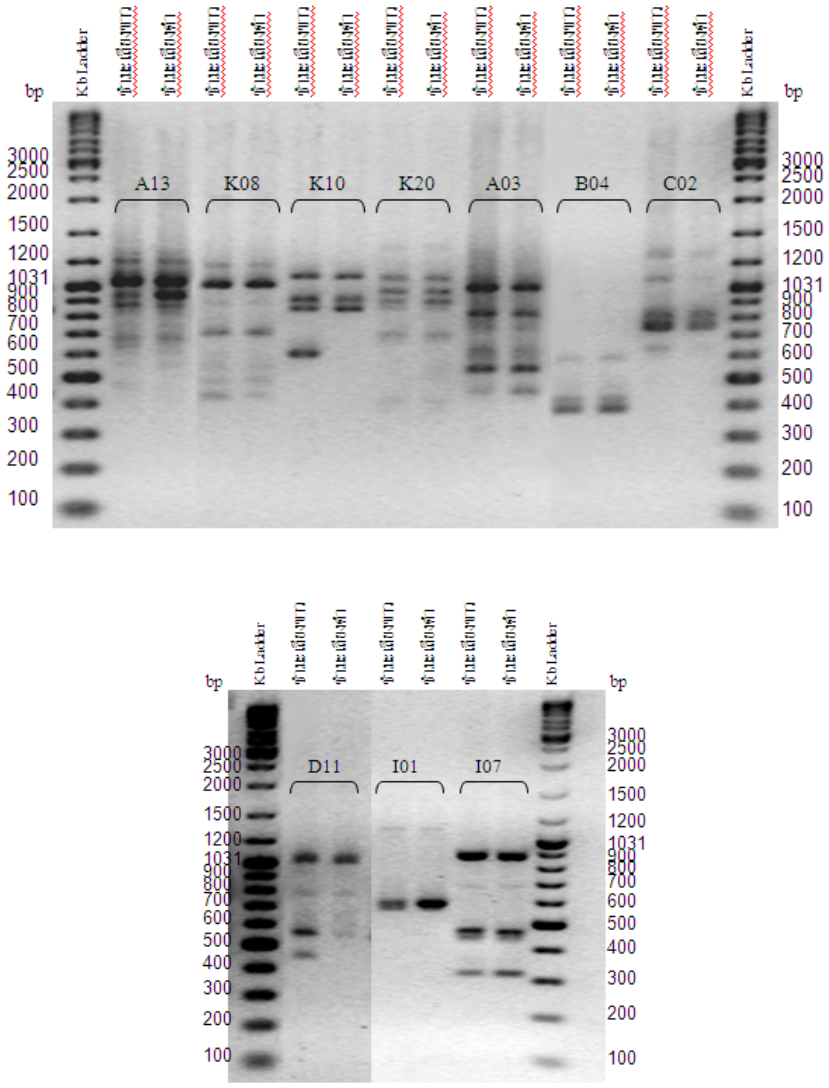
จากการวิจัยตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอจากชำมะเลียงขาวและดำ การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดีของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ พร้อมทั้งการวิเคราะห์ผลโดยไฟโลจีเนติกทรีของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ ได้ผลการวิจัยดังนี้

1. ผลของการสกัดดีเอ็นเอจากชำมะเลียงขาวและดำ

จากการสกัดดีเอ็นเอจากชำมะเลียงขาวและดำ โดยใช้น้ำยาสำหรับสกัดดีเอ็นเอของพืชและวิเคราะห์หาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวิธีสังเกตจากเจลเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 100 นาโนกรัม (ภาพที่ 1)

2. การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดีของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ

ใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 2 นาโนกรัม และไพรเมอร์ทั้ง 10 ชนิด เมื่อนำไปผ่านกระบวนการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ พบว่า เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี ที่มีความเหมือนหรือใกล้เคียงกันเมื่อใช้ไพรเมอร์A13 K08 K20 A03 B04 C02 I01 และ I07 ส่วนลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี ที่มีความแตกต่างระหว่างชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำอย่างชัดเจน เมื่อใช้ไพรเมอร์ K10 (ภาพที่ 2)

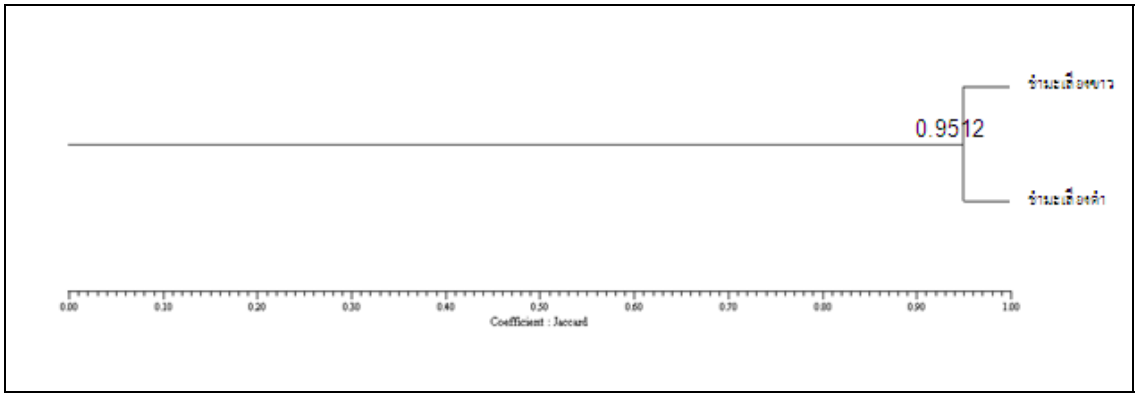


ภาพที่ 2 ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดีของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ เมื่อใช้ไพรเมอร์A13 K08 K20 A03 B04 C02 I01 และ I07

3. การวิเคราะห์ผลโดยไฟโลจีเนติกทรี

โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแผ่นเจล โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ จะให้คะแนนเป็น 1 ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้คะแนนเป็น 0 นำผลการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ โดยใช้

program NTSYSpc for Windows Version 2.01e พบว่า รูปแบบของไฟโลจีเนติกระหว่างชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ มีค่าความแตกต่างทางวิวัฒนาการ (coefficient level) เท่ากับ 0.9512 (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ไฟโลจีเนติกทรีของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ

สรุปและการอภิปรายผล

จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดีของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำโดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด พบว่าสามารถที่จะใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแยกความแตกต่างของชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำในระดับสายพันธุ์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ K10 โดยไพรเมอร์ K10 เกิดแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีขนาด 600 คู่เบส ในชำมะเลียงขาว ส่วนในชำมะเลียงดำไม่เกิดแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบส จากนั้นวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำ โดยใช้ program NTSYSpc for Windows Version 2.01e พบว่า รูปแบบของไฟโลจีเนติกระหว่างชำมะเลียงขาวและชำมะเลียงดำมีค่าความแตกต่างทางวิวัฒนาการ (coefficient level) เท่ากับ 0.9512 มีการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืชอื่นๆ เช่น มังคุด โดยมลิวรรณ นาคขุนทด (2541) ได้ทำการศึกษาอนุกรมวิธานและวิวัฒนาการของพืชสกุลมังคุด จำนวน 12 ชนิด โดยรวมมังคุด 11 ตัวอย่างและพืชสกุลใกล้เคียงอีก 2 ชนิดเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบรวมทั้งสิ้น 24 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ผลการศึกษาด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 12 ชนิด พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 107 แถบ พืชทั้ง 14 ชนิดแสดงความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ในขณะที่มังคุด 10 ตัวอย่างเกิดแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันทั้งหมด แต่มังคุดอีก 1 ตัวอย่างนั้นเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเล็กน้อย นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีกับ ปาล์มน้ำมันเพื่อระบุความแตกต่างของสกุล โดย ธนวัฒน์ ชูช่อ (2546)

ได้ทำการศึกษาใช้เทคนิคอาร์เอพีดี จากการทดลอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคอาร์เอพีดีประกอบด้วย การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันโดยใช้เอสดีเอสบัฟเฟอร์ (SDS buffer) จากนั้นหมุนเหวี่ยงแยกดีเอ็นเอโดยใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์หลังจากสังเคราะห์ดีเอ็นเอแล้วทำการตรวจสอบผลโดยใช้อะกาโรสเจลเทคนิคอาร์เอพีดีสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ขนาด 10-meroligonucleotide ได้ 14 ชนิด (OPA11, OPA17, OPC07, OPC08, OPC15, OPAD01, OPD03, OPD12, OPE01, OPE16, OPE17, OPE19, OPF07, and OPF08) จาก 100 ชนิด ได้ดีเอ็นเอ 81 แถบ โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 0.35–1.7 กิโลเบส เมื่อนำ polymorphism ของแถบดีเอ็นเอมาทำการวิเคราะห์ผลโปรแกรม NTSYSpc ได้แผนภูมิทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ที่แบ่งปาล์มน้ำมันได้เป็น 4 กลุ่ม ไพรเมอร์ที่ทำการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการวิจัยการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดีกับพืชสกุลหรือวงศ์อื่นๆ ที่ใกล้เคียงกับชำมะเลียงได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพและชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำการวิจัย และขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ธนวัฒน์ ชูช่อ. (2546). **การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (Elaeis guineensis Jacq.) โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี**. กรุงเทพฯ: สาขาวิชาพืชไร่ สถาบันเทคนิคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

มลิวรรณ นาคขุนทด. (2541). **การศึกษาอนุกรมวิธานของพืชสกุลมังคุดบางชนิดโดยการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.** กรุงเทพฯ**:** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. (2546). **หลักพันธุศาสตร์**. กรุงเทพฯ: สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย.

ธงชัย เปาอินทร์ และ นิวัตร เปาอินทร์. (2544). **ต้นไม้ยาน่ารู้**. กรุงเทพฯ: ออฟเซ็ท เพรส จำกัด.