การศึกษาพื้นฐานพันธุกรรมของละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองไทย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD

Characterization of Genetic Bases of Thai Local Caster Bean Cultivars Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ*,ภัทรพร คุ้มภัย และ สุวิมล ไหลรัตนกุล****

*ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (รังสิต), ปทุมธานี 12121

**นักศึกษาชั้นปีที่ 4 (2542) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (รังสิต), ปทุมธานี 12121

บทคัดย่อ

การทดลองนี้เป็นการประยุกต์ใช้เครื่องหมาย RAPD ในการศึกษาลายพิมพ์ DNA เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความแตกต่างทางพันธุกรรมของละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองของไทย 4 พันธุ์คือ พันธุ์ลายดำสนิท, พันธุ์หินอ่อนเทาแก่, พันธุ์ลายหลังเหลือง, และพันธุ์ลายดำใหญ่ และละหุ่งพันธุ์ที่ปรับปรุงใหม่โดยการนำพันธุ์มาจากต่างประเทศคือ พันธุ์ TCO101 และ พันธุ์ H22 จากไพรเมอร์ที่คัดเลือกทั้งหมด 40 ไพรเมอร์ พบว่า 13 ไพรเมอร์เป็นไพรเมอร์ที่สามารถสร้างแถบเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ละหุ่งได้ 30 แถบเครื่องหมายจากจำนวนทั้งหมด 94 แถบเครื่องหมาย ละหุ่งพันธุ์ TCO101, H22, และลายดำใหญ่ มีแถบเครื่องหมาย RAPD จำเพาะ 4, 1, และ 1 แถบเครื่องหมายตามลำดับ แถบเครื่องหมายนี้สามารถใช้จำแนกพันธุ์ละหุ่ง 3 พันธุ์นี้ได้ จากการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) พบว่าละหุ่งพันธุ์ TCO101 มีพื้นฐานพันธุกรรมที่แตกต่างมากที่สุดจากละหุ่งพันธุ์อื่น ส่วนละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 4 พันธุ์มีพื้นฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ เมื่อจัดกลุ่มความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์แขนงวิวัฒนาการ (Phylogram tree) พบว่ามีแขนง 3 แขนงคือ แขนงกลุ่มละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองของไทยทั้ง 4 พันธุ์ ส่วนแขนงที่ 2 และ 3 คือ พันธุ์ H22 และ TCO 101 ตามลำดับ

Abstract

The technique of Ramdom Amplified Polymorphic DNA was applied to generate the fingerprint in caster bean cultivars. The group of 4 Thai local cultivars consisting of Lai-dum-snit, Lai-lang—laung, Lai-dum-yai, and Lai-hin-on-thao-kae and the group of 2 new improved cultivars consisting of TCO 101 and H22 were studied for the genetic relatedness among and between groups. Thirteen primers out of 40 primers generated 30 polymorphic markers out of total 94 markers. Four, one and one specific RAPD markers were identified in TCO101, H22 and Lai-dum-yai respectively. TCO101 showed the most distance of the genetic base from the others. A phylogram tree of the 6 cultivars was constructed. The caster bean cultivars were classified into the single group of Thai local cultivars and 2 separated branches of H22 and TCO101.

1. คำนำ

ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีความสำคัญอย่างมากในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืช ในละหุ่งการจำแนกพันธุ์เพื่อศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ผ่านมายังอยู่ในขอบเขตจำกัด เนื่องจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยดูจากฟีโนไทป์ภายนอกอาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ในกรณีที่สายพันธุ์มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกัน และในบางกรณีลักษณะความแตกต่างของสายพันธุ์อาจต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบ เนื่องจากต้องพิจารณาในระยะที่พืชเจริญจนถึงระยะออกดอกหรือแก่จนกระทั่งเก็บเกี่ยวผลผลิต

ในปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องหมาย DNA หรือลายพิมพ์ DNA มีบทบาทและมีความสำคัญอย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจาก 1) ใช้ในการจำแนกตรวจสอบสายพันธุ์ที่ให้ผลแม่นยำโดยไม่ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตหรือชิ้นส่วนของพืช 2) ใช้ในการหาความสัมพันธ์และความแตกต่างทางพันธุกรรม ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ต่างสปีชีส์กัน และภายในสปีชีส์เดียวกัน 3) ใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะที่สำคัญทางพืชไร่กับเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อประโยชน์ในการคัดเลือกและผสมลักษณะที่สำคัญนี้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช [1,2]

เนื่องจากในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชจำเป็นต้องศึกษาพันธุ์พืชเป็นจำนวนมาก รวมทั้งลูกผสมที่เกิดจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นกลยุทธ์ในการศึกษาพันธุ์พืชเหล่านี้โดยอาศัยเครื่องหมายโมเลกุลควรต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในโครงการ แต่ขณะเดียวกันก็ให้ผลการศึกษาที่เชื่อถือได้ จากงานวิจัยที่ผ่านมา [3,4,5] พบว่าเทคนิคการสร้างลายพิมพ์ DNA โดยวิธี PCR (Polymerase chain reaction) โดยใช้ลำดับเบสไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primer) มีข้อได้เปรียบต่อการสร้างลายพิมพ์ DNA โดยอาศัยวิธีไฮบริไดร์เซชั่นเนื่องจากวิธีการปฏิบัติทำได้ง่าย รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายถูกกว่า และให้ผลการทดลองที่เชื่อถือได้

เทคนิคการสร้างลายพิมพ์ DNA โดยวิธี PCR โดยใช้ลำดับเบสไพรเมอร์แบบสุ่มในเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA หรือ RAPD [3] เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการสร้างลายพิมพ์ DNA ในพืชหลายชนิดทั้งในพืชผสมข้ามและพืชผสมตัวเอง [6,7,8,9] เทคนิคนี้สามรถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชภายในสปีชีส์เดียวกัน (intra specific variation) และต่าง สปีชีส์กัน (interspecific variation) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเทคนิคนี้จำเป็นต้องคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม และต้องควบคุมการทดลองให้ดีพอเพื่อให้ผลการทดลองคงที่เชื่อถือได้ (reproducibility)

ในการทดลองนี้เป็นการสร้างลายพิมพ์ DNA โดยอาศัยเทคนิค RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์มีลำดับเบสสุ่มขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ เพื่อศึกษาพื้นฐานพันธุกรรมของละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย และพันธุ์ที่ปรับปรุงขึ้นมาใหม่โดยการนำสายพันธุ์มาจากต่างประเทศ ในการศึกษามีการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการสร้างแผนภูมิแขนงวิวัฒนาการ (Phylogram tree)

2. อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ละหุ่ง พันธุ์ละหุ่งที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 6 พันธุ์ได้รับการเอื้อเฟื้อจากบริษัท สยามน้ำมันละหุ่ง ลักษณะทางทางพฤกษศาสตร์และที่มาของละหุ่งทั้ง 6 พันธุ์แสดงดังตารางที่ 1 ละหุ่งพันธุ์ TCO101 และพันธุ์ H22 เป็นพันธุ์ที่ปรับปรุงขึ้นมาใหม่และส่งเสริมแก่เกษตรกรโดยบริษัทสยามน้ำมันละหุ่ง ทั้งสองพันธุ์มีพื้นฐานพันธุกรรมจากต่างประเทศ ส่วนละหุ่งพันธุ์ลายดำสนิท, ลายหินอ่อนเทาแก่, ลายหลังเหลือง และลายดำใหญ่ เป็นพันธุ์พื้นเมืองขึ้นกระจัดกระจายทั่วไป ในการปลูกละหุ่งเพื่อสกัด DNA ได้ทำการคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ละหุ่งที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ละ 16-20 เมล็ด นำเมล็ดแช่น้ำหนึ่งคืนแล้วปลูกลงในกระถางๆละ 6-10 หลุมๆละ 2-3 เมล็ด หลังงอก 2-3 สัปดาห์จึงถอนให้เหลือ 1 ต้นต่อหลุม เมื่อละหุ่งโตประมาณ 1 เดือน จึงเริ่มเก็บใบอ่อนมา สกัด DNA

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และที่มาของละหุ่งทั้ง 6 พันธุ์

พันธ์ละหุ่ง	ลำต้น	ไข	ผล	รูปทรงช่อดอก	ที่มา
TCO 101	ต้นสีแดง สูงประมาณ 2-3 เมตร	มีไขทุกส่วน	ผลมีหนาม	ช่อดอกรูปทรงกรวยยาว	พันธุ์จาก อินเดีย
H 22	ต้นสีแดง สูงประมาณ 1.5-2.5 เมตร	มีไขทุกส่วน	ผลมีหนาม	ช่อดอกรูปทรงกรวยยาว	พันธุ์ลูกผสม จากบราซิล
ลายดำสนิท	ลำต้นสีเขียว สูงกว่า 1.5 เมตร	ไม่มีไข	ผลมีหนาม	ช่อดอกรูปทรงกรวย หรือทรงกระบอก	พันธุ์พื้นเมือง ของไทย
ลายหินอ่อน เทาแก่	ลำต้นเขียว สูงกว่า 1.5 เมตร	ไม่มีไข	ผลมีหนาม	ช่อดอกรูปทรงกรวย หรือทรงกระบอก	พันธุ์พื้นเมือง ของไทย
ลาย หลังเหลือง	ลำต้นสีเขียว สูงกว่า 1.5 เมตร	ไม่มีไข	ผลมีหนาม	ช่อดอกรูปทรงกรวย หรือทรงกระบอก	พันธุ์พื้นเมือง ของไทย
ลายดำใหญ่	ลำต้นสีเขียว สูงกว่า 1.5 เมตร	ไม่มีไข	ผลไม่มีหนาม	ช่อดอกรูปทรงกรวย หรือทรงกระบอก	พันธุ์พื้นเมือง ของไทย

การเก็บตัวอย่างใบละหุ่ง เนื่องจากธรรมชาติของละหุ่งมีการผสมเกสรข้ามต้นได้จึงทำให้ประชากรในพันธุ์ละหุ่งอาจมีจีโนไทป์ไม่สม่ำเสมอ (heterogeneous population) ดังนั้นการเก็บตัวอย่างจากใบละหุ่งแต่ละพันธุ์เพื่อสกัด DNA จึงสุ่มเก็บตัวอย่างใบรวมจากละหุ่ง 5 ต้นๆละหนึ่งใบ ดังนั้น DNA ที่ได้จึงเป็น DNA รวม (bulk genomic DNA) ซึ่งถือเป็น DNA ตัวแทนของประชากรละหุ่งพันธุ์นั้น วิธีการเก็บตัวอย่างใบรวมด้วยวิธีนี้ Yu และ Pauls [6] ได้ใช้เทคนิค RAPD สร้างลายพิมพ์ DNA ของอัลฟัลฟา (*Medicago sativa ssp.*) ซึ่งถือเป็นพืชผสมข้ามได้ โดยใช้ DNA รวมจากประชากรของพันธุ์อัลฟัลฟา 5 ต้น โดยเขาแสดงให้เห็นว่าแถบ DNA ที่เกิดจากใช้ DNA รวมสามารถเป็นตัวแทนของแถบ DNA ของประชากรพันธุ์อัลฟัลฟาได้

การสกัด DNA วิธีการสกัด DNA เป็นวิธีที่ประยุกต์จากวิธีของ Gawel และ Jarret [10] นำใบอ่อนของละหุ่งแต่ละพันธุ์มาประมาณ 500 mg บดใน
ไนโตรเจนเหลวจนละเอียด แล้วเติม extraction buffer (2 % (w/v) CTAB, 100 mM Tris HCL pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.1 % (v/v) mercaptoethanol) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม Chloroform :Isoamyl alcohol (24:1) 10 ml ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมาประมาณ 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วเติม Absolute ethanol ที่แช่เย็นจัดในปริมาณ 1 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมาจนกระทั่งเห็นสาย DNA แล้วใช้แท่งแก้วงอเกี่ยว DNA ขึ้นมา ล้าง DNA ใน 70 % ethanol, แช่ DNA ใน 0.2 M NaAc 20 นาที แล้วล้าง DNA อีกครั้งหนึ่งใน 0.01 M NH_4Ac 10 วินาที ละลาย DNA ใน TE buffer 250 □l ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm

การเพิ่มปริมาณ DNA ในปฏิกิริยา PCR ปฏิกิริยา PCR มีปริมาตร 20 □l ประกอบด้วย DNA 200 ng, 10 mM Tris HCl pH 8.3, 50 mM KCL, 0.001% gelatin, 2.5 mM $MgCl_2$, 200 □M dNTPs, 6.6 ρmole primer (Operon technology) และ 0.375 U เอนไซม์ *Tag* polymerase (QIAGEN) ปฏิกิริยาดำเนินในเครื่อง PCR system 2400 Perkin-Elmer โดยตั้งอุณหภูมิดังนี้ 94 °C 5 นาที แล้วตามด้วยโปรแกรมการเพิ่มปริมาณ DNA 3 ระดับคือ 94 °C 1 นาที, 37 °C 1 นาที, 72 °C 2 นาที

จำนวน 40 รอบ หลังจากสิ้นสุดโปรแกรมการเพิ่มปริมาณ DNA ปฏิกิริยาถูกปรับให้มีอุณหภูมิ 72 °C 5 นาที แล้วลดอุณหภูมิต่ำลงที่ 4 °C จนกระทั่งนำผลผลิต PCR ออกไปวิเคราะห์ ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ถูกวิเคราะห์ใน 1.4% agarose gel electrophoresis โดยมี DNA มาตราฐานขนาด100 bp เป็น DNA เปรียบเทียบขนาด DNA ถูกนำไปย้อมด้วย ethidium bromide นาน 10 นาทีแล้วนำไปส่องภายใต้แสง UV เพื่อถ่ายภาพด้วยกล้องโพลารอยด์ผ่านแผ่นกรองแสงสีแดง

การวิเคราะห์ข้อมูล ปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RAPD ถูกดำเนินซ้ำ 2-3 ครั้ง เฉพาะแถบ DNA หรือแถบเครื่องหมายที่ให้ผลการทดลองคงที่จะถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล การตั้งชื่อแถบเครื่องหมายใช้ชื่อไพรเมอร์แล้วตามด้วยขนาดชิ้น DNA มีหน่วยเป็น bp เช่น BF1-600 หมายถึงแถบ DNA ขนาด 600 bp ถูกเพิ่มจำนวนในปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ BF1 แถบเครื่องหมายที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลถูกแปลเป็นคะแนน 1 สำหรับการปรากฏของแถบ DNA หรือคะแนน 0 สำหรับการไม่ปรากฏของแถบ DNA ในตำแหน่งที่พิจารณา จำนวนแถบเครื่องหมายที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ (polymorphic markers)

และจำนวนแถบเครื่องหมายทั้งหมดถูกนำมาใช้ในการคำนวณค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) [11] โปรแกรมคอมพิวเตอร์ PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 2.4) ประดิษฐโดย Swofford [12] ถูกนำมาใช้ในการสร้างไฟโลแกรมทรี (phylogram tree)

3. ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง

จากไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองจำนวน 40 ไพรเมอร์ สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่สร้างลายพิมพ์ DNA ได้จำนวน 13 ไพรเมอร์ หลักการในการคัดเลือกเริ่มจากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ DNA ของละหุ่งเพียงหนึ่งพันธุ์ (ลายดำใหญ่) จากไพรเมอร์ 40 ไพรเมอร์ พบว่า 24 ไพรเมอร์เป็นไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้และจาก 24 ไพรเมอร์ เมื่อนำทุกไพรเมอร์ไปเพิ่มปริมาณ DNA ในละหุ่งทั้ง 6 พันธุ์เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถสร้างลายพิมพ์ DNA ได้ กล่าวคือเป็นไพรเมอร์ที่สามารถแสดงความแตกต่างของแถบ DNA (polymorphic primer) เมื่อพิจารณาการปรากฏของแถบ DNA ที่ชัดเจนเทียบกับการไม่ปรากฏแถบ DNA แถบ DNA ที่แตกต่างกันนี้ถือเป็นเครื่องหมาย RAPD (polymorphic RAPD marker) ในการพิจารณาการปรากฏของแถบ DNA นั้นต้องให้ผลการทดลองคงที่เมื่อเทียบกับการคัดเลือกไพรเมอร์รอบแรก โดยวิธีการคัดเลือกดังกล่าวพบว่ามี 13 ไพรเมอร์ สามารถสร้างลายพิมพ์ DNA ได้โดยมีลำดับเบสแสดงดังตารางที่ 2

ไพรเมอร์ทั้ง 13 ไพรเมอร์นี้สามารถสร้างแถบเครื่องหมาย RAPD ได้ทั้งหมด 94 แถบ จำนวนแถบเครื่องหมายของแต่ละไพรเมอร์อยู่ในช่วงระหว่าง 3 (BF2) ถึง 15 (BF3) ค่าเฉลี่ยแถบเครื่องหมายต่อหนึ่งไพรเมอร์คิดเป็น 7.2 แถบเครื่องหมาย แถบเครื่องหมายมีขนาดตั้งแต่ 250 bp ถึงขนาดใหญ่กว่า 1500 bp จากจำนวนแถบเครื่องหมายทั้งหมดนี้พบว่ามี 30 แถบเครื่องหมาย (31.9%) เป็นแถบเครื่องหมายที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ละหุ่ง ค่าเฉลี่ยของแถบเครื่องหมายที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ละหุ่งต่อหนึ่งไพรเมอร์คิดเป็น 2.3 แถบเครื่องหมาย โดยมีจำนวนแตกต่างกันตั้งแต่ 1 แถบเครื่องหมาย (จำนวน 6ไพรเมอร์) จนถึง 7 แถบเครื่องหมาย (BF13) เมื่อพิจารณาไพรเมอร์ BF13 (แสดงดังรูปที่ 1) พบว่าเป็นไพรเมอร์ที่สามารถสร้างแถบเครื่องหมายได้ทั้งหมด 10 แถบเครื่องหมาย แต่มีจำนวนแถบเครื่องหมายที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ละหุ่งถึง 7 แถบเครื่องหมาย ซึ่งแตกต่างจากไพรเมอร์อื่นมีจำนวนแถบเครื่องหมายที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ละหุ่งน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของจำนวนแถบเครื่องหมายทั้งหมด ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าความแตกต่างของลายพิมพ์ DNA ระหว่างพันธุ์ละหุ่งนอกจากจะขึ้นกับความแตกต่างของพื้น

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์, จำนวนแถบ DNA ที่ปรากฏเหมือนกัน (nonpolymorphic markers), จำนวนแถบ DNA ที่ปรากฏแตกต่างกัน (polymorphic markers) และจำนวนแถบ DNA ทั้งหมด ที่เกิดจากไพรเมอร์ที่สามารถสร้างแถบเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ละหุ่ง (polymorphic RAPD primers)

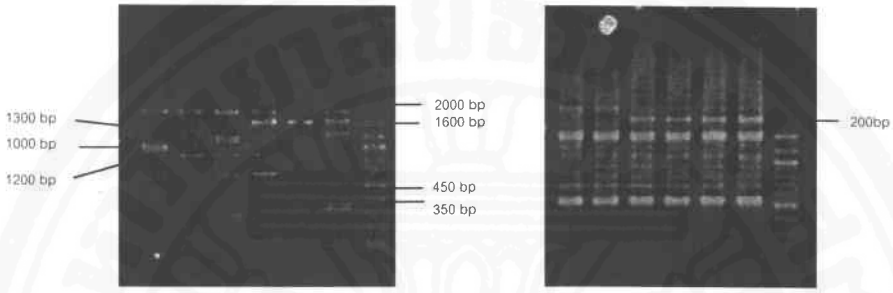
RAPD primers	Primer Sequence	Polymorphic markers	Nonpolymorphic Markers	Total
BF1	GGA GCT GAC T	1	5	6
BF2	GAC ACA CTC C	1	2	3
BF3	TCC CTT GAC C	4	11	15
BF4	GAC AGG TTG G	2	4	6
BF6	TCC ACG GGG A	1	3	4
BF8	CCT GGG TCC A	2	3	5
BF10	GTG ACC AGA G	1	4	5
BF13	CCG CCG GTA A	7	3	10
BF14	CCG CGT TGA G	5	5	10
BF15	ACG CGA ACC T	2	6	8
BF19	TTC CCG CAC T	1	3	4
BG1	GTG GTC CTC C	1	5	6
BG16	TGC TTG GGT G	2	10	12
Total		30	64	94
Mean		2.3	4.3	7.2
%		31.9	68.1	100

ฐานทางพันธุกรรมแล้ว ยังขึ้นกับลำดับเบสของไพรเมอร์ด้วยว่าจะไปจับกับตำแหน่งใดของจีโนม ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบส ซึ่งสามารถจับกับตำแหน่งของจีโนมบริเวณที่ทำให้เกิดแถบเครื่องหมายที่แตกต่างกัน (polymorphic site) ระหว่างพันธุ์ละหุ่งได้หลายตำแหน่ง เช่นกรณีไพรเมอร์ BF13 ก็จะเป็นไพรเมอร์ที่มีประโยชน์สามารถนำมาใช้สร้างลายพิมพ์ DNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เมื่อพิจารณาแถบเครื่องหมาย RAPD ที่จำเพาะต่อละหุ่งแต่ละพันธุ์ พบว่าละหุ่งพันธุ์TCO 101 มีแถบเครื่องหมาย RAPD จำเพาะ 4 แถบเครื่องหมาย คือ BF1-600, BF3-250, BF13-1000, และ BF15-600 ละหุ่งพันธุ์ H22 มีแถบเครื่องหมายจำเพาะ 1 แถบเครื่องหมาย คือ BF6-750 ละหุ่งพันธุ์ลายดำใหญ่มีแถบเครื่องหมายจำเพาะ 1 แถบเครื่องหมาย คือ BF13-450 ส่วนละหุ่งพันธุ์ลายดำสนิท, พันธุ์ลายหลังเหลือง, พันธุ์หินอ่อนเทาแก่ ไม่มีแถบเครื่องหมาย RAPD จำเพาะ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า ละหุ่งพันธุ์ TCO101 ซึ่งมีพื้นฐานพันธุกรรมจากประเทศบราซิลมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากละหุ่งอีก 5 พันธุ์อย่างชัดเจน เนื่องจากมีจำนวนแถบเครื่องหมายจำเพาะแตกต่างจากละหุ่งพันธุ์อื่นมากซึ่งแสดงถึงการมีลำดับเบสที่แตกต่างจากละหุ่งพันธุ์อื่นมากเช่นกัน จำนวนแถบเครื่องหมายจำเพาะเหล่านี้นอกจากจะมีประโยชน์ในแง่การบ่งชี้ลักษณะประจำพันธุ์แล้ว ยังใช้ช่วยพิจารณาถึงการเพิ่มความกว้างของพื้นฐานพันธุกรรมของละหุ่งในโครงการผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ละหุ่ง โดยใช้พันธุ์ TCO101 ช่วยเพิ่มความหลากหลายของพันธุกรรมในประชากรลูกผสม นอกจากแถบเครื่องหมายที่จำเพาะต่อพันธุ์ละหุ่งแล้ว ยังมีแถบเครื่องหมายที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่างละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองของไทยกับละหุ่งพันธุ์ต่างประเทศคือแถบเครื่องหมาย BF3-2000 ซึ่งแถบเครื่องหมายจะปรากฏเฉพาะในละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองของไทย (แสดงดังรูป ที่ 1)

จากการคำนวณค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic distance; D; แสดงดังตารางที่ 3) โดยใช้แถบเครื่องหมาย RAPD ที่ปรากฏเหมือนกันในคู่พันธุ์ละหุ่งที่นำมาเปรียบเทียบ พบว่าค่า D มีค่าตั้งแต่ 0.038 (ลายหินอ่อนเทาแก่เทียบกับลายหลังเหลือง) ถึง 0.247 (TCO101 เทียบกับลายดำใหญ่) โดยค่า D เท่ากับ 0 แสดงถึงคู่พันธุ์ละหุ่งที่นำมาเปรียบเทียบมีความเหมือนกันหรือเป็นพันธุ์เดียวกัน ถ้าค่า D เท่ากับหนึ่ง แสดงว่าพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างสิ้นเชิง จากตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองของไทยทั้ง 4 พันธุ์ด้วยกันเองพบว่า ค่า D มีค่าระหว่าง 0.038 ถึง 0.075 (ลายดำสนิทเทียบกับลายหินอ่อนเทาแก่) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพันธุ์ละหุ่งพื้นเมืองทั้ง 4 พันธุ์นี้ มีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันเนื่องจากค่า D มีค่าอยู่ในเกณฑ์ต่ำ สาเหตุอาจเนื่องมาจากละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองของไทยซึ่งมีจำนวนพันธุ์ไม่มากนัก มีการปลูกกันมาช้านานและขึ้นกระจัดกระจายปะปนทั่วไปในพื้นที่บริเวณที่มีการปลูกละหุ่ง ปัจจัยเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการจับคู่ของยีนซึ่งเหมือนกันจึงเป็นการเพิ่มอัตราของอินบรีดดิ้ง (inbreeding) ทำให้พันธุกรรมของละหุ่งพื้นเมืองอยู่ในวงจำกัดซึ่งตรวจพบได้ในการทดลองนี้ เมื่อพิจารณาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างละหุ่งพันธุ์ H22 กับกลุ่มละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองของไทย และระหว่างละหุ่งพันธุ์ TCO101 กับ

กลุ่มละหุ่งพันธุ์เมืองของไทย พบว่าค่า D มีค่าอยู่ระหว่าง 0.125 (H22 เทียบกับลายดำสนิท) ถึง 0.181 (H22 เทียบกับลายหินอ่อนเทาแก่หรือลายดำใหญ่) และ 0.209 (TCO101 เทียบกับลายดำสนิท) ถึง 0.247 ตามลำดับ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าละหุ่งพันธุ์ TCO101 มีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ความแตกต่างทางพันธุกรรมของคู่เปรียบเทียบระหว่างละหุ่งพันธุ์ TCO101กับพันธุ์ลายดำใหญ่



รูปที่ 1 แสดงลายพิมพ์ RAPD ของละหุ่งทั้ง 6 พันธุ์ จากรูปทั้งสองรูป แถบที่ 1-6 เรียงลำดับพันธุ์ละหุ่งจาก TCO101, H22, ลายดำสนิท, ลายหินอ่อนเทาแก่, ลายหลังเหลือง และลายดำใหญ่ ส่วนแถบที่ 7 เป็น DNA มาตราฐานเทียบขนาด 100 bp (a) แสดงแถบเครื่องหมาย RAPD ที่เกิดจากไพรเมอร์ BF13 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่สามารถสร้างแถบเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ละหุ่งถึง 7 แถบเครื่องหมาย (polymorphic RAPD markers) คือแถบเครื่องหมายขนาด 350 bp, 450 bp, 1000 bp, 1200 bp, 1300 bp, 1600 bp, และ ประมาณ 2000 bp (b) แสดงแถบเครื่องหมาย BF3-2000 ซึ่งใช้แยกความแตกต่างระหว่างละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองของไทยกับละหุ่งพันธุ์ต่างประเทศ

ถือว่าเป็นค่าที่ไม่สูงมากนัก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าถ้าต้องการสร้างแผนที่ยีนโดยใช้แถบเครื่องหมาย RAPD จากคู่ผสมนี้ก็อาจทำได้ไม่ง่ายนักเนื่องจากพื้นฐานพันธุกรรมของทั้งสองพันธุ์นี้ไม่แตกต่างกันมากเท่าที่ควร ทำให้การคัดเลือกแถบเครื่องหมาย RAPD ที่ใช้ในการสร้างแผนที่ยีนมีประสิทธิภาพต่ำ

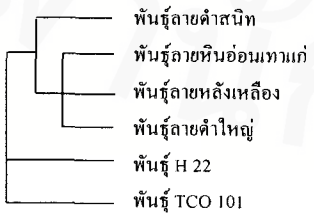
เมื่อพิจารณาไฟโลแกรมทรีที่ได้จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ PAUP ซึ่งเป็นการคำนวณความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้วิธี parsimony (แสดงดังรูปที่ 2) สามารถแตกแขนง วิวัฒนาการได้ 3 แขนง แขนงที่ 1 คือกลุ่มพันธุ์ละหุ่งพื้นเมือง ซึ่งอาจแบ่งเป็นแขนงย่อยได้ 2 แขนงย่อยคือพันธุ์ลายดำสนิท และกลุ่มของพันธุ์ 3 พันธุ์ประกอบด้วยพันธุ์ลายหินอ่อนเทาแก่, พันธุ์ลายหลังเหลือง, และพันธุ์ลายดำใหญ่ แขนงที่ 2 คือพันธุ์ H22 และแขนงที่ 3 คือพันธุ์ TCO101 ผลของแขนงวิวัฒนาการนี้ค่อนข้างสอดคล้องกับลักษณะที่คล้ายคลึงกันของลักษณะทางพฤษศาสตร์ในตารางที่ 1 กล่าวคือในแขนงวิวัฒนาการที่ 1 เป็นกลุ่มละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองลำต้นสีเขียวไม่มีไข สูงกว่า 1.5 เมตร ช่อดอกรูปทรงกรวย ผลมีหนามยกเว้นพันธุ์ลายดำใหญ่ไม่มีหนาม ส่วนแขนงวิวัฒนาการที่ 2 และ 3 คือพันธุ์ H22 และ TCO101 มีลักษณะทางพฤษศาสตร์แตกต่างอย่างเห็นได้ชัดจากกลุ่มละหุ่งพันธุ์พื้นเมือง คือลำต้นสีแดงมีไข แต่เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางพฤษศาสตร์ระหว่างละหุ่งสองพันธุ์นี้ด้วยกันเอง พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน จึงค่อนข้างยากที่จะพิจารณาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะทางพฤษศาสตร์ อย่างไรก็ตามค่า D ของคู่เปรียบเทียบนี้มีค่า 0.214 ซึ่งจัดว่ามีค่าสูงเมื่อเทียบกับค่า D ของคู่เปรียบเทียบละหุ่งพันธุ์อื่นในการทดลองนี้ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า เครื่องหมาย RAPD ที่สร้างจากการทดลองนี้สามารถนำมาใช้อธิบายความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดีกว่าการใช้ลักษณะทางพฤษศาสตร์อย่างชัดเจน

ตารางที่ 3 แสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic Distance; D) ของคู่เปรียบเทียบพันธุ์ละหุ่งทุกคู่ของละหุ่งทั้ง 6 พันธุ์

	TCO101	H22	ลายดำสนิท	ลายหินอ่อนเทาแก่	ลายหลังเหลือง	ลายดำใหญ่
TCO101	0	0.214	0.209	0.22	0.235	0.247
H22		0	0.125	0.181	0.148	0.181
ลายดำสนิท			0	0.075	0.051	0.063
ลายหินอ่อนเทาแก่				0	0.038	0.086
ลายหลังเหลือง					0	0.039
ลายดำใหญ่						0

4. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาในการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า เครื่องหมายโมเลกุล RAPD สามารถนำมาประยุกต์เพื่อการศึกษาพื้นฐานพันธุกรรมของละหุ่งพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ที่ปรับปรุงขึ้นมาใหม่ได้เป็นอย่างดี แถบเครื่องหมาย RAPD จำเพาะต่อพันธุ์ละหุ่งที่สร้างจากแต่ละไพรเมอร์สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ได้โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวหรือไม่กี่ไพรเมอร์ แต่อย่างไรก็ตามการพิจารณาแถบเครื่องหมายจากไพรเมอร์หลายไพรเมอร์สามารถช่วยให้การตรวจสอบแม่นยำขึ้น แต่ขณะเดียวกันก็ต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายประกอบด้วย เมื่อพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่งที่นำศึกษาในการทดลองนี้โดยใช้เครื่องหมาย RAPD ได้แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่งที่นำมาศึกษาในการทดลองนี้อยู่ในระดับปานกลางถึงต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพื้นฐานพันธุกรรมที่แคบของพันธุ์ละหุ่งเอง และจำนวนพันธุ์จำนวนน้อยที่นำมาศึกษา ดังนั้นการวิจัยในขั้นต่อไปควรรวบรวมพันธุ์ละหุ่งเป็นจำนวนมากขึ้นจากแหล่งพันธุกรรมต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศ เพื่อทำให้เห็นภาพที่สมบูรณ์มากขึ้นของพื้นฐานพันธุกรรมของละหุ่งในประเทศไทย



รูปที่ 2 แสดง Phylogram tree ของละหุ่ง 6 พันธุ์ ที่คำนวณโดยวิธี parsimony

5. คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากคณะกรรมการส่งเสริมการวิจัยเสริมหลักสูตร มหาวิทยาลัย ธรรมศาสตร์

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Tingey, S.V., Rafalski, J.A., and Williams, J.G.K., Genetic Analysis with RAPD Markers, pp.3-8, In Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. 1st Nov. Minneapolis, Minnesota., 1992.

[2] Soller, M. and Beckmann, J.S., Genetic Polymorphism in Varietal Identification and Genetic Improvement, Theor. Appl. Genet., Vol. 67 ; pp. 25-33, 1983.

[3] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R. , Livak, K.J. , Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers, Nucl. Acids Res., Vol. 18 ; pp. 6531-6535, 1990.

[4] Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M., DNA Amplification Fingerprinting Using Very Short Arbitrary Oligonucleotide Primers., Bio/Technology. 9 ; pp. 553-557, 1991.

[5] Welsh, J. and McClelland, M., Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers, Nucl. Acids Res., Vol. 18 ; pp. 7213-7218, 1990.

[6] Yu, K., and Pauls, K.P., Rapid Estimation of Genetic Relatedness among Heterogeneous Populations of Alfalfa by Random Amplification of Bulked Genomic DNA Samples, Theor. Appl. Genet., Vol. 86 ; pp. 788-794, 1993.

[7] Kresovich, S., Williams, J.G.K. , McFerson, J.R. , Routman, E.J. , and Schaal, B.A., Characterization of Genetic Identities and Relationships of *Brassica oleracea* L. via a Random Amplified Polymorphic DNA Assay, Theor. Appl. Genet., Vol. 85 ; pp. 190-196, 1992.

[8] Wilkie, S.E., Isaac, P.G. , and Slater, R.J., Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers for Genetic Analysis in *Allium*, Theor. Appl. Genet., Vol. 86 ; pp. 497-504, 1993.

[9] Yang, X., and Quiros, C., Identification and Classification of Celery Cultivars with RAPD Markers, Theor. Appl. Genet., Vol. 86 ; pp. 205-212, 1993.

[10] Gawel, N.L. and Jarret, R.L., A Modified CTAB DNA Extraction Procedure of *Musa* and *Ipomoea*, Plant Mol. Bio. Rpt., Vol. 9 ; pp. 262-266, 1991.

[11] Anderberg, M.R., Cluster Analysis for Applications, Academic Press, New York, 1973.

[12] Swofford, D.L., Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.0 Users' Manual, Illinois Natural History Survey, Champaign, 1990.