การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชกลุ่มกระเจียว โดยเทคนิค RAPD

จรัสศรี แก่นเมือง[1] สมบรูณ์ อนันตลาโภชัย[2] และ พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์[1,3]

[1]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200 [2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ [3]ศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ C/O มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Analysis of genetic variation in *Curcuma* spp. by RAPD

Jarussi Kanmerng[1] Somboon Anantalabhochai[2] and Pimchai Apavatjrut[1,3]

[1]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand; [2]Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University; [3]H.M. The King's Initiative Centre for Flower and Fruit Propagation, c/o Chiang Mai University.

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชกลุ่มกระเจียวจำนวน 27 ชนิด โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD (High Annealing Temperature Random Polymorphic DNA) จากการใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 16 ไพรเมอร์เข้าจับ พบว่ามี 9 ไพรเมอร์ คือ OPA11, OPA20, OPG13, OPG14, OPV08, OPAB04, OPAQ06, OPAQ12 และ OPAX17 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันทั้งหมด 230 แถบ โดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 150-3000 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สามารถจัดพืชกลุ่มกระเจียวที่นำมาศึกษาออกเป็น 6 กลุ่มใหญ่ โดยมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Abstract

The genetic relationship of 27 species in genus *Curcuma* were analysed by HAT-RAPD technique using 10 nucleotide primers. The study showed that 9 from 16 primers, i.e. OPA11, OPA20, OPG13, OPG14, OPV08, OPAB04, OPAQ06, OPAQ12 and OPAX17 produced 230 polymorphic DNA bands ranging in size from 150-3000 bp. Analysing these DNA fingerprint patterns could classify the plants studied into 6 major groups which were consistent with their morphological characteristics.

บทนำ

พืชกลุ่มกระเจียว (*Curcuma*) จัดอยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) พบในธรรมชาติมากกว่า 70 ชนิด มีความหลากหลายในลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งระหว่างชนิดและภายในชนิดเดียวกัน นอกจากนี้บางชนิดมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ใกล้เคียงกันมาก (Apavatijrut *et al*., 1999) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดความสับสนในการจำแนก จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาด้านต่างๆ ทั้งในแง่สัณฐานวิทยา จำนวนโครโมโซม และเทคนิคทางอณูชีววิทยา เพื่อช่วยในการจำแนกชนิดได้ถูกต้องยิ่งขึ้น ใช้สนับสนุนการพัฒนาพันธุ์พืช และการจดทะเบียนพันธุ์พืช (พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์ *และคณะ*, 2539) เทคนิค HAT-RAPD (High Annealing Temperature Random Polymorphic DNA) เป็นเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม และแสดงระดับความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชแต่ละชนิดได้ (Anuntalabhochai *et al*., 2000) การทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาการใช้เทคนิค HAT-RAPD ในการวิเคราะห์ความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ เพื่อแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในกระเจียว 27 ชนิด

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

เตรียมดีเอ็นเอของพืชกลุ่มกระเจียว 27 ชนิด คือกระเจียว *C2* = *Curcuma* sp.,ว่านชักมดลูก = *Curcuma xanthorrhiza,* ว่านมหาเมฆ = *Curcuma aeruginosa,* กระเจียวกาบแดง = *Curcuma rubescens,* ขมิ้นอ้อย = *Curcuma zedoaria,* พลอยชมพู= *Curcuma elata,* กระเจียว Cm = *Curcuma* sp., กระเจียวดอกอาว = *Curcuma attenuata,* กระเจียวไก่ขัน = *Curcuma* sp., กระเจียวกุหลาบ = *Curcuma* sp., ขมิ้นขาวชนิดหัวเล็ก = *Curcuma* sp., ขมิ้นชัน = *Curcuma longa,* เพชรเชียงใหม่ = *Curcuma petiolata,* บัวชั้น = *Curcuma* sp., พลอยทักษิณ = *Curcuma aurantiaca,* บัวสีส้ม = *Curcuma* sp., กระเจียวส้ม = *Curcuma roscoeana,* ทับทิมสยาม = *Curcuma* sp., ปทุมรัตน์ = *Curcuma* sp., ปทุมมา = *Curcuma alismatifolia,* บัวโกเมน = *Curcuma rhabdota,* บัวลายกาญจน์ = *Curcuma* sp., กระปุกสีน้ำหมาก = *Curcuma* sp., นพเก้า = *Curcuma* sp., หิ่งห้อย (2n) = *Curcuma paviflora,* บัวสีขาวลาว = *Curcuma thorelii* และช่อมรกต = *Curcuma* sp.โดยสกัดดีเอ็นเอจากวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1990) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR (1×reaction buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs, 100 ng Primer, 5-10 ng DNA template และ 0.5 unit Taq Polymerase) ด้วยเทคนิค HAT-RAPD (ตาราง 1) โดยสุ่มใช้ไพรเมอร์จำนวน 16 ชนิด คือ OPA07, 08, 11, 20; OPB15, 20; OPG13, 14, 15, 18, 20; OPV08; OPAB04; OPAQ06, 12 และ OPAX17 แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ตรวจดูตำแหน่งของการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของกระเจียวแต่ละชนิด จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างกระเจียวแต่ละชนิดโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS ด้วยวิธี UPGMA ในการวิเคราะห์แบบ cluster analysis และแสดงความสัมพันธ์ของกระเจียวในรูป dendrogram

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกระเจียว 27 ชนิดโดยใช้เทคนิค HAT-RAPD และสุ่มใช้ไพรเมอร์ 16 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 9 ชนิด คือ OPA11, OPA20, OPG13, OPG14, OPV08,

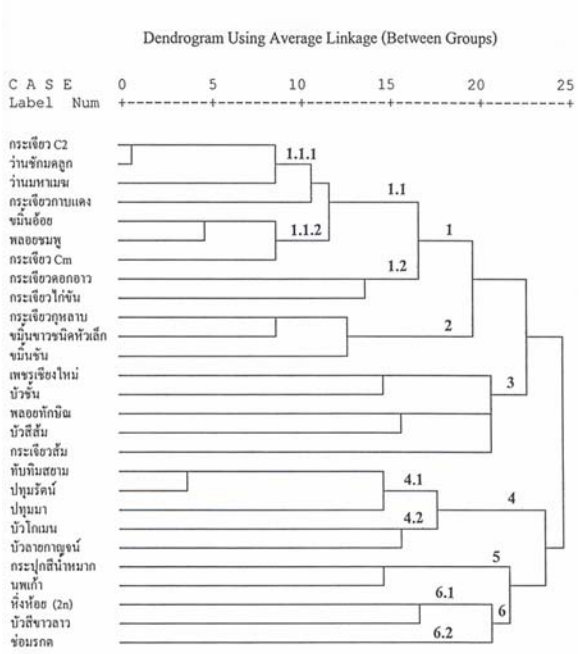
OPAB04, OPAQ06, OPAQ12 และ OPAX17 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 235 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอลักษณะ polymorphic จำนวน 230 แถบ และ monomorphic จำนวน 5 แถบ ซึ่งอยู่ในช่วง 150-3000 bp เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์สามารถแบ่งกลุ่มกระเจียวที่นำมาศึกษาออกเป็น 6 กลุ่มใหญ่ ดังนี้ : กลุ่ม 1 มี 9 ชนิด กลุ่ม 2 มี 3 ชนิด กลุ่ม 3 มี 5 ชนิด กลุ่ม 4 มี 5 ชนิด กลุ่ม 5 มี 2 ชนิด และกลุ่ม 6 มี 3 ชนิด (ภาพ1) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางพฤษศาสตร์ของช่อดอกและการเจริญด้านการออกดอก

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างกระเจียว 27 ชนิดโดยเทคนิค HAT-RAPD พบว่าต้องใช้แถบดีเอ็นจำนวน 235 แถบ จาก 9 ไพรเมอร์ จึงสามารถจำแนกกระเจียวออกเป็น 6 กลุ่มใหญ่ที่สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการศึกษานี้สามารถใช้สนับสนุนงานด้านอนุกรมวิธาน

ตาราง 1: เงื่อนไขปฏิกิริยา PCR

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	94	:	94	46	72	:	72
เวลา (นาที)	2	:	0.3	0.3	0.45	:	7
จำนวนรอบ (รอบ)	1	:		30		:	1



ภาพ 1: Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างกระเจียว 27 ชนิด จากการใช้ไพรเมอร์ 9 ชนิดคือ OPA11, OPA20, OPG13, OPG14, OPV08 OPAB04, OPAQ06, OPAQ12 และ OPAX17

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ และโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์พวงเพ็ญ ศิริรักษ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านการจำแนกชนิดพืช และขอบคุณคุณกัลยา ปานคง ในการช่วยเตรียมต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์, ถกลวรรณ ศิริสวัสดิ์, พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, พิศิษฐ์ วรอุไร และ ฉันทนา สุวรรณธาดา 2539. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชกลุ่มกระเจียวไทย 17 ชนิด รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติครั้งที่ 2 พ.ศ. 2539: 86-99.

Anuntalabhochai, A., Chudet, R., Chiangda, J. and Apavatjrut, P. 2000. Genetic diversity within lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) base on RAPD analysis. International Symposium on Tropical and Subtropical Fruit 26th Nov.-1st Dec. 2000. Cairns, Australia.

Apavatjrut, P., Anuntalabhochai, S., Sirirugsa, P., and Alisi, C. 1999. Molecular marker in the identification of some early flowring *Curcuma* L. (Zingiberaceae) species. Annals of Botany. 84: 529-534.

Doyle,L.J. and Doyle,J.J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-14.