การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวซาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

Study on Genetic Diversity of *Musa* by Using High Annealing Temperature Random Amplified Polymorphic DNA Technique

ฐิติพร โท้มโสภา[1], **เปรมณัช ขุนปักษี**[1], **ธีระชัย ธนานันต์**[1] **และ นฤมล ธนานันต์**[2]*

Titiporn Thomsopa[1], Premmanuch Khunpugsee[1], Theerachai Thanananta[1] and Narumol Thanananta[2]*

[1]*ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120;* [2]*คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปทุมธานี 13180*

[1]*Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Center, Pathum Thani 12120;* [2]*Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkrrn Rajabhat University under Royal Patronage, Pathum Thani 13180*

**Corresponding author: narumolpla@yahoo.com*

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวซา 10 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 สาย พบว่าไพรเมอร์ 52 สาย สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 15 สาย ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์นอกจากนั้นยังพบไพรเมอร์ 4 สาย ที่สามารถจำแนกกล้วยทั้ง 10 พันธุ์ ออกจากกันได้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS สามารถจำแนกกล้วยสกุลมิวซา 10 พันธุ์ที่ศึกษาในครั้งนี้ออกเป็น 4 กลุ่ม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.50 ถึง 0.89

ABSTRACT

High annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to study the genetic diversity among 10 *Musa* cultivars. Seventy-two random primers were screened and 52 primers could be used for DNA amplification. Fifteen primers which gave clear amplified products were selected and used to analyze all cultivars. The result showed significant differences among 10 cultivars by using specific fragments for each cultivar. Moreover, 4 primers were able to identify all cultivars. A dendrogram, which constructed base on polymorphic bands using the NTSYS program, showed genetic similarities among the 10 species of *Musa* and separated to 4 clusters with similarity coefficients ranging from 0.50 to 0.89.

คำสำคัญ ความหลากหลายทางพันธุกรรม, กล้วยสกุลมิวซา, แฮตอาร์เอพีดี

Keywords: genetic diversity, *Musa*, HAT-RAPD

บทนำ

กล้วย (*Musa* spp.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในวงศ์ Musaceae มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมบริโภคเป็นอาหารกันอย่างแพร่หลาย โดยคณะที่ปรึกษาของการวิจัยด้านเกษตรนานาชาติ (Consultative Group on International Agricultural Research, CGIAR) ได้จัดลำดับความสำคัญของกล้วยให้เป็นอาหารที่ประชากรโลกบริโภคสูงเป็นอันดับที่ 4 ในแง่ของปริมาณการผลิตรวม สำหรับประเทศไทยนั้นกล้วยที่มีศักยภาพในการส่งออกนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ได้แก่ กล้วยไข่ และกล้วยหอมทอง (พานิชย์, 2554)

จากความสำคัญดังกล่าวจึงมีแนวคิดที่จะรวบรวมพันธุ์กล้วยในประเทศไทยเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) โดยใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature random amplified polymorphic DNA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) (Williams *et al*., 1990) ซึ่งสะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequence) และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ชนิดอื่น (สุรินทร์, 2552)

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวซาและตรวจหาเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD marker) ที่สามารถจำแนกพันธุ์กล้วย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการคุ้มครองพันธุกรรมและการอนุรักษ์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พันธุ์กล้วย

กล้วยที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มี 10 พันธุ์ คือ (1) กล้วยจีโนม AA จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ กล้วยไข่กำแพงเพชร และกล้วยเล็บมือนาง (2) กล้วยจีโนม AAA จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ กล้วยนาก กล้วยหอมทอง และกล้วยหอมเขียว (3) กล้วยจีโนม ABB จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ กล้วยไข่ขาว กล้วยน้ำว้ากาบขาว กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง และกล้วยหักมุก และ (4) กล้วยไข่กำแพงเพชรที่ต้นอ่อนได้รับการฉายรังสีแกมมาซึ่งไม่ทราบจีโนมที่แน่ชัด จำนวน 1 พันธุ์ คือ กล้วยไข่เกษตรศาสตร์

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของกล้วยทั้ง 10 พันธุ์ ด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al*., 1989)

3. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

มี 2 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอกล้วยทั้ง 10 พันธุ์ เป็นตัวอย่างเดียวกัน และ (2) การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยคัดเลือกไพรเมอร์ 15 สาย ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยแต่ละพันธุ์ โดยไพรเมอร์แบบสุ่มที่ใช้ 72 สาย คือไพรเมอร์ 6 ชุด (A2, B2, C2, D2, E2 และ F2) จาก Wako Company (Japan) ซึ่งมีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ (นฤมล และคณะ, 2012)

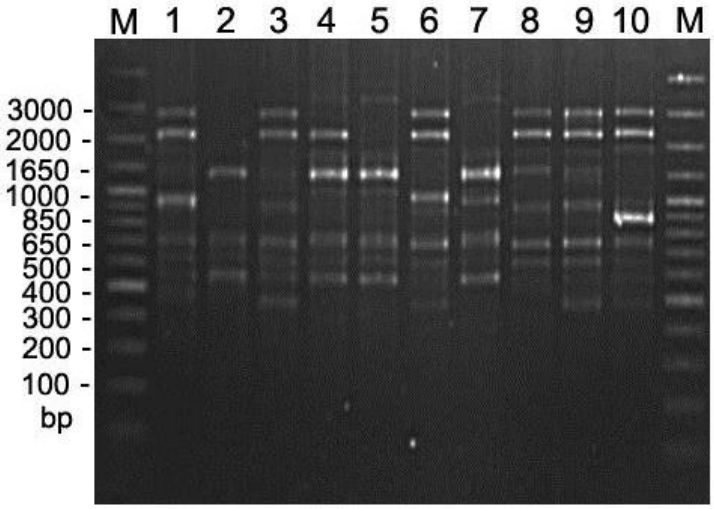
4. การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยทั้ง 10 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดแล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

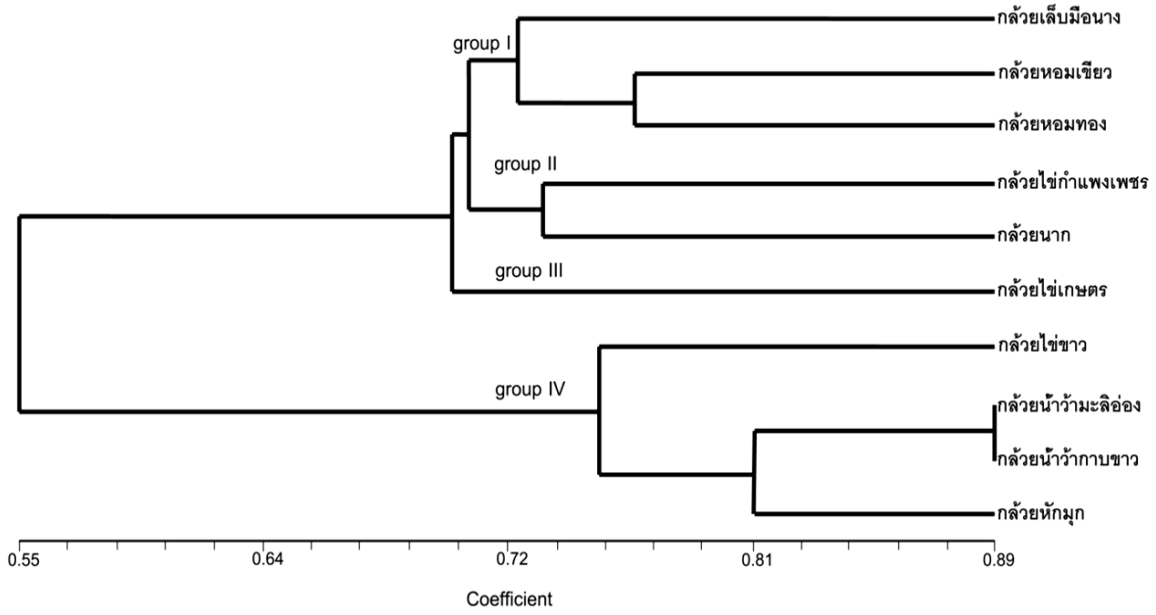
ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 72 สาย เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของกล้วยด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี พบว่าไพรเมอร์ 52 สาย หรือคิดเป็น 72.22 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ หลังจากนั้นจึงคัดเลือกไพรเมอร์ 15 สาย ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยแต่ละพันธุ์ จำนวน 10 พันธุ์ ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 184 แถบ มีขนาดประมาณ 350-3,000 คู่เบส (base pairs) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกพันธุ์ (monomorphic band) 24 แถบ (13.04 %) และแถบดีเอ็นเอที่พบแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ 160 แถบ (86.96 %) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมีรูปแบบจำเพาะต่อกล้วยแต่ละพันธุ์ (รูปที่ 1) และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีสำหรับจัดจำแนกกล้วย นอกจากนั้นยังพบไพรเมอร์ถึง 4 สาย ที่สามารถจำแนกกล้วยทั้ง 10 พันธุ์ออกจากกันได้ ได้แก่ B32 (5'-ATCGCGGCTTAT-3'), C22 (5'-GGTCACCGATCC-3'), E22 (5'-GGAATGGAACCG-3') และ F27 (5'-CAGGTGGGAGTA-3')

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน และแสดงผลในรูปแผนภูมิความสัมพันธ์ (รูปที่ 2) ถ้าพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.72 พบว่ากล้วยสกุลมิวซาที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จำนวน 10 พันธุ์ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 คือ กล้วยที่มีจีโนม AA และ AAA กลุ่ม 3 คือ กล้วยไข่กำแพงเพชรที่ต้นอ่อนได้รับการฉายรังสีแกมมาซึ่งไม่ทราบจีโนมที่แน่ชัด และกลุ่ม 4 คือ กล้วยจีโนม ABB โดยผลการวิจัยครั้งนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.50 ถึง 0.89 (รูปที่ 3) ผลการวิจัยนี้แสดงว่ากล้วยสกุลมิวซามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์สามารถใช้เป็นเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีสำหรับการจำแนกกล้วยสกุลมิวซาและแถบดีเอ็นเอบางแถบที่จำเพาะกับพันธุ์สามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจำแนกพันธุ์กล้วยได้ นอกจากนี้ผลการวิจัยยังแสดงให้เห็นว่ากล้วยไข่เกษตรศาสตร์นั้นมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับทั้งกล้วยจีโนม AAA และ ABB อย่างไรก็ตามเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดียังไม่สามารถจำแนกกล้วยจีโนม AA ออกจากกล้วยจีโนม AAA ได้ แต่เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาวิจัยและการวางแผนอนุรักษ์ในอนาคต ผลงานวิจัยนี้ยังสนับสนุนศักยภาพของเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์พืชต่าง ๆ



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ B32 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-10 คือ กล้วยเล็บมือนาง กล้วยไข่ขาว กล้วยหอมเขียว กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง กล้วยน้ำว้ากาบขาว กล้วยไข่เกษตร กล้วยหักมุก กล้วยไข่กำแพงเพชร กล้วยหอมทอง และกล้วยนาก ตามลำดับ]



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ 15 สาย

	กล้วยเล็บมือนาง	กล้วยไข่ขาว	กล้วยหอม	กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง	กล้วยน้ำว้ากาบขาว	กล้วยไข่เกษตร	กล้วยหักมุม	กล้วยไข่กำแพงเพชร	กล้วยหอมทอง
กล้วยเล็บมือนาง	1.00								
กล้วยไข่ขาว	0.53	1.00							
กล้วยหอม	0.72	0.50	1.00						
กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง	0.56	0.78	0.55	1.00					
กล้วยน้ำว้ากาบขาว	0.57	0.78	0.58	0.89	1.00				
กล้วยไข่เกษตร	0.72	0.50	0.70	0.56	0.56	1.00			
กล้วยหักมุม	0.57	0.71	0.55	0.79	0.83	0.56	1.00		
กล้วยไข่กำแพงเพชร	0.68	0.51	0.72	0.52	0.56	0.69	0.57	1.00	
กล้วยหอมทอง	0.73	0.53	0.77	0.59	0.61	0.70	0.56	0.73	1.00

รูปที่ 3 ค่าดัชนีความเหมือนของกล้วยที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ 15 สาย

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวซา จำนวน 10 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี พบว่ากล้วยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยงานวิจัยนี้พบไพรเมอร์ถึง 4 สาย ที่สามารถจำแนกกล้วยทั้ง 10 พันธุ์ ออกจากกันได้ และเมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS พบว่าสามารถแบ่งกล้วยสกุลมิวซาที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็น 4 กลุ่ม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณณัฐภัทร พงศ์ศิริพัฒน์ คุณบริพัตร สิชฌนุกฤษฎ์ คุณพรรณิตา ศานติยานนท์ คุณอนันตพล ประทีปพลีผล และคุณอรวรรณ เกียรติอมรรักษ์ ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธ์ และธีระชัย ธนานันต์, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี. Thai J. Sci. Technol. 2012. 1: 169-179.

พานิชย์ ยศปัญญา, กล้วยในเมืองไทย. กรุงเทพ ฯ: สำนักพิมพ์มติชน. 2554.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2552.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 1987. 19:11-15.

Rohlf, F.J. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Applied Biostatistics, Inc. 2002.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. Melecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 1990. 18: 653.