ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Saccharum spontaneum* และลูกผสมโดยเทคนิคอาร์เอพีดี

Genetic Relationship in *Saccharum spontaneum* and Their Hybrids by RAPD

ไอลดา ไชยบุตร[1]*, **สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม**[1] **และ กษิดิศ ดิษฐบรรจง**[2]

Ailada Chaiyabut[1]*, Supattra Poeaim[1] and Karsedis Distabanjong[2]

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520; [2]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ปทุมธานี 12110

[1]Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520; [2]Biotechnology Research and Development, Department of Agriculture, Pathumthani, 12110

**Corresponding author: beshall_555@hotmail.com*

บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลายของอ้อย (*Saccharum spontaneum*) และลูกผสมจำนวน 28 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 47 ชนิด พบว่ามี 20 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจน 5 ชนิด มาวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Jaccard มีค่าระหว่าง 0.36-0.91 และเมื่อสร้างเดนโดรแกรมโดยวิธี UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ 3 กลุ่มมีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม(genetic similarity) เฉลี่ย 49 เปอร์เซ็นต์ โดยตัวอย่าง B41-227 และ Thai แสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด (similarity = 14.8%) ดังนั้นการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดีสามารถช่วยนักปรับปรุงพันธุ์ในการประเมินและปรับปรุงพันธุ์ให้ได้อ้อยสายพันธุ์ใหม่

ABSTRACT

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to study genetic relationship among 28 samples of *Saccharum spontaneum* and their hybrids. Forty-seven random primerswere screened and 20 primers are able to amplify DNA fragments. Five primers which gave clear RAPD banding patternwere selected and analyzed all species.The value of Jaccard similarity coefficient ranged from 0.36-0.91. A dendrogram constructed by UPGMA clustering method was revealed three major clusters. The mean genetic similarity calculated was 49 percentages. The lowest genetic similarity was found between genotypes B41-227 and Thai (similarity = 14.8%). RAPD fingerprints help breeders to evaluate and improve the new genetically sugarcane.

คำสำคัญ: เทคนิคทางโมเลกุล, อ้อย, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, อาร์เอพีดี

Keywords: molecular techniques, Sugarcane, Genetic diversity, RAPD

บทนำ

อ้อย (Sugarcane) จัดเป็นพืชวงศ์หญ้าอยู่ในสกุล *Saccharum* L. ประกอบไปด้วยสปีชีส์ที่สำคัญ 6 สปีชีส์ คือ *Saccharum officinarum, S. spontaneum, S. barberry, S. sinense, S. robustum* และ *S. edule* (Daniels and Roach, 1987) โดยสกุล *Saccharum* ยังมีความสัมพันธ์กับสกุลอื่นๆอีก คือ *Erianthus, Miscanthus, Narenga* และ *Sclerostachya* ซึ่งเรียกรวมกันว่า Saccharum complex (Mukherjee, 1957; Daniels et al., 1975) โดยในสปีชีส์เดียวกันจะแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในอ้อย จึงนิยมใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงสายพันธุ์อ้อย (Vaze et al., 2010) และในปัจจุบันการปรับปรุงสายพันธุ์อ้อยจะทำการผสมระหว่างสปีชีส์ (interspecific hybridization) ซึ่งพบว่าโคลนที่มีอยู่นั้นมีจำนวนจำกัด ส่งผลให้อ้อยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ดังนั้นในการปรับปรุงสายพันธุ์จึงไม่ทำให้สายพันธุ์อ้อยมีมากขึ้นกว่าเดิม

เทคนิคทางโมเลกุลถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของอ้อย เช่น เทคนิค Random amplified polymorphism DNA (RAPD) (Kawar et al.,2008; Tabusum et al., 2010), Amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Jone and Edward,1997; Rodriguez et al., 2005) และ Microsattlelite (Giovanni,2003; Cordeiro et al., 2000) เป็นต้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของอ้อยด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การเก็บตัวอย่างใบอ้อยและการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างใบอ้อย**

เก็บตัวอย่างใบอ้อยจากแหล่งรวบรวมสายพันธุ์อ้อย 2 แหล่ง คือศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง ดังนี้ สุพรรณบุรี 80, อู่ทอง84-10, จีนแดง, CO-290 และ อียิปต์ และจากศูนย์วิจัยพืชไร่จังหวัดขอนแก่น 23 ตัวอย่าง คือ ขอนแก่น 3, KU60-5, B41-227, สองคนภูเรือ, TP07-424, 97-48, ขอนแก่น 1, K88-92, 97-45, 97-42, 97-41, 97-51, 97-10, SO10-08, TP07-305, KU60-3, B37-16, มหาสารคาม, TP07-124-1, B47-419, Thai, SO10-06 และ TP07-305 สกัดดีเอ็นเอจากใบอ้อยสดโดยวิธี CTAB (ดัดแปลงจาก Dole and Doyle, 1990) เลือกใช้ใบอ้อยบริเวณส่วนที่มีสีเขียวอ่อน เพราะมีสารประกอบฟีนอลิคน้อยกว่าการสกัดจากใบอ้อยแก่ ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร และเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส

2. **การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี**

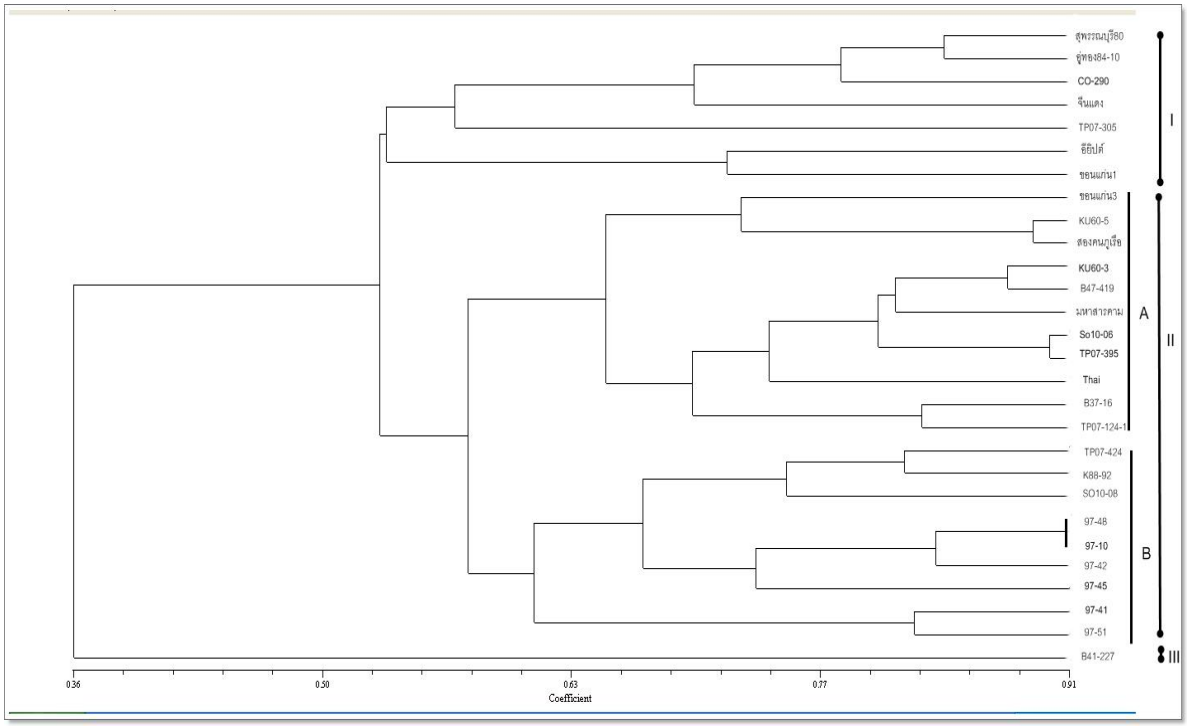
ทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Deoxynucleotide triphosphat 1.25 mM ปริมาตร 6 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer ปริมาตร 3 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ 20 pM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase 500U ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร, แมกนีเซียมคลอไรด์ 50 mM ปริมาตร 1.8 ไมโครลิตร, ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 250 นาโนกรัม โดยใช้สภาวะดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที Annealing ใช้อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Tabasum et al.,2010) วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาร์เอพีดีโดยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจลที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส นำข้อมูลจากการให้คะแนนวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS version2.01e แบบ UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาความหลากหลายของอ้อยด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 47 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 20 ไพรเมอร์ คัดเลือกมาเฉพาะที่ให้แถบชัดเจนจำนวน 5 ไพรเมอร์ คือ OPC02, OPC18, OPC19, OPD02 และ OPH08 พบว่าแถบมีขนาดตั้งแต่ 350-1,200 คู่เบส โดยสามารถสร้างผลิตภัณฑ์อาร์เอพีดีได้ทั้งหมด 584 แถบ เป็นแบบชนิด polymorphic จำนวน 500 แถบ คิดเป็นค่า polymorphism เท่ากับ 85.62 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงโดยอาศัยค่าพารามิเตอร์ของ Jaccard แสดงเป็นค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Genetic similarity) ของแต่ละตัวอย่างนั้น พบว่ามีค่าเฉลี่ยของความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่ 49 เปอร์เซ็นต์ โดยตัวอย่างที่มีค่าความคล้ายคลึงต่ำที่สุด คือ B41-227 และ Thai มีค่าความคล้ายคลึงที่ 14.8 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีความเหมือนกันน้อยที่สุด และตัวอย่างที่มีค่าความคล้ายคลึงมากที่สุด คือ ตัวอย่างที่ 97-48 และ 97-10 มีค่าความคล้ายคลึงที่ 83.3 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีความเหมือนกันของพันธุกรรมมากที่สุด ซึ่งทั้ง 2 ตัวอย่าง มีความแตกต่างกันเพียง 11 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จาก 5 ไพรเมอร์

การวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Jaccard ด้วยโปรแกรม NTSYS version2.01e มีค่าระหว่าง 0.36-0.91 และเมื่อสร้างเดนโดรแกรมโดยวิธี UPGMA สามารถแบ่งแยกตัวอย่างอ้อยได้ทั้งหมด 3 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ III มีเพียงตัวอย่างเดียว คือ ตัวอย่าง B41-227 สำหรับกลุ่มที่ I ประกอบไปด้วยสุพรรณบุรี80, อู่ทอง84-10, CO-290, จีนแดง, อียิปต์, ขอนแก่น1 และ TP07-305 และกลุ่มที่ II สามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A ประกอบด้วยตัวอย่าง ขอนแก่น3, KU60-5, สองคนภูเรือ, KU60-3, B37-16, มหาสารคาม, B47-419, Thai, SO-06, TP07-395 และ TP07-124-1 เมื่อพิจารณาจากค่าความคล้ายคลึง พบว่า ตัวอย่าง B41-227 (กลุ่มที่ III) และตัวอย่าง Thai มีค่าความคล้ายคลึงต่ำที่สุด คือ 14.8 เปอร์เซ็นต์ โดยกลุ่มที่ I และกลุ่ม IIA มีแนวโน้มเป็นลูกผสมของสกุล *Saccharum* สำหรับกลุ่ม IIB ประกอบด้วยตัวอย่าง 97-48, 97-42, 97-42, 97-41, 97-51 และ 97-10 โดยข้อมูลของตัวอย่างอ้อยกลุ่มนี้พบว่าเป็นอ้อยป่า หรือ *Saccharum spontaneum* และมีแนวโน้มว่าอีก 3 ตัวอย่าง คือ SO10-08, TP07-424 และ KK88-92 อาจเป็น *S. spontaneum* หรือลูกผสมของสปีชีส์นี้ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงเดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของอ้อยแต่ละตัวอย่างด้วย UPGMA

สรุปผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาความหลากหลายของอ้อยด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ตัวอย่างที่รวบรวมสายพันธุ์อ้อย 2 แหล่ง คือศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดสุพรรณบุรี และจังหวัดขอนแก่น จำนวน 28 ตัวอย่าง เมื่อแยกความแตกต่างของตัวอย่างอ้อยจาก 5 ไพรเมอร์ คือ OPC02, OPC18, OPC19, OPD02 และ OPH08 สามารถสร้างผลิตภัณฑ์อาร์เอพีดีได้ทั้งหมด 584 แถบ เป็นแบบชนิด polymorphic จำนวน 500 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ polymorphism เท่ากับ 85.62 เปอร์เซ็นต์ ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมีค่า 49 เปอร์เซ็นต์ สามารถบ่งชี้ได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างอ้อยที่นำมาศึกษาอยู่ในระดับต่ำ อาจเนื่องมาจากการขาดแคลนสายพันธุ์พ่อแม่ที่มีความหลากหลายและการที่อ้อยมีโครโมโซมเป็นแบบ polyploidy จากกระบวนการผสมข้ามสายพันธุ์ ส่งผลให้ความหลากหลายของอ้อยอยู่ในระดับต่ำ การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์อย่างมากแก่นักปรับปรุงพันธุ์อ้อย เพื่อใช้ในการประเมินสายพันธุ์อ้อย และวางแผนปรับปรุงผสมพันธุ์อ้อย และใช้เป็นข้อมูลในการพิสูจน์สายพันธุ์อ้อยจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

กิตติกรรมประกาศ

ตัวอย่างอ้อยที่ศึกษาในครั้งนี้ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดสุพรรณบุรี และจังหวัดขอนแก่น และขอขอบพระคุณคุณวีระพล พลรักดี นักวิชาการเกษตร ชำนาญการพิเศษ จากศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดขอนแก่น ที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับสายพันธุ์อ้อยของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา

เอกสารอ้างอิง

Cordeiro, GM. Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.) a highly polyploidy species. Plant Science 2000; 155: 161-168.

Daniels, J., Smith, P., Paton, N. and William CA. The origin of the genus *Saccharum* sugarcane breed. Newsl. 1975; 36 : 24-39.

Daniels, J.and Roach, BT. Taxonomy and Evolution in sugarcane. In sugarcane improvement through breeding. Elsevier Press. Amsterdam 1987; 7-84.

Doyle, JJ. and Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bulletin. 1990; 19: 11-15.

Glaszman, JC., Frostret, A., Noyer, JL., Feldmann, P. and Lanaud, C. Biochemical markers in sugarcane theory applied genetics 1989; 4: 425-430.

Giovanni, M.2003. Sugarcane microsatellites for the assesement of genetic diversity in sugarcane germplasm. Plant science 2003; 165: 181-189.

Jone, CJ., Edward, KJ. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding 1997; 3: 351-390.

Kawar, PG., Devarumath, RM. and Nerkar, Y. Use of RAPD markers for assessment of genetic diversity in sugarcane cultivars. Molecular Biology and Genetic Engineering Laboratory. Vasantdada Sugar Institute Pune. India. 2008

Mukherjee, SK. Origin and distribution of Saccharum. Bot. Gaz. 1957; 199 : 55-61.

Nair, NV., Nair, S., Screenivasan, TV., Moham, M. Analysis of genetic diversity and phylogeny in Saccharum and related genera using RAPD markers. Genetic Resource Crop evolution 1999; 46 : 73-79.

Roach, BT. Taxonomy and Evolution in sugarcane : In Sugarcane Improvement Through Breeding . Elsevier Press. Amsterdam 1987;7-84.

Rodriguez, H. Genetic diversity of the most important sugar cultivars in Mexico. E-Gnosis [Online] 2005; Vol.3.

Tabussum, S.2010. DNA profiling of sugarcane genotypes using randomly amplified polymorphic DNA. Genetic and Molecular Research 2010; 9(1): 471-483.

Vaze, A. Isolation and PCR amplification of genomic DNA from dry leaf samples of sugarcane. International Journal of Pharma and Bio Sciences 2010; Vol.1(2): 1-6.