ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพารา (*Heveabra siliensis* Muell Arg.) จากลำดับเบสบางส่วนของยีน *Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase*

Genetic Diversity of The Para Rubber Tree (*Heveabra siliensis* Muell Arg.) Based on Partial Sequences of *Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase* Gene

อรวรรณ วราพุฒ และ ชูตา บุญภักดี*
Orawan Waraput and Chuta Boonphakdee*
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131
Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131
**Corresponding author: chuta@buu.ac.th*

บทคัดย่อ

ยางพารา (*Heavea brasiliensis* Muell Arg.) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ปัจจุบันความต้องการใช้ไม้ยางพาราทั้งในด้านเป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ หรือใช้เนื้อไม้ผลิตเป็นเฟอร์นิเจอร์โดยตรงมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นการคัดเลือกสายพันธุ์ของยางพาราที่สัมพันธ์กับลักษณะของเนื้อไม้มักศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยาซึ่งใช้ระยะเวลานานและอาศัยผู้ชำนาญ ดังนั้นการทราบข้อความพันธุกรรมของยีน *Cinnamyl alcohol dehydrogenase* (*CAD*) ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินในพืชและใช้เทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) จะทำให้การระบุสายพันธุ์ทำได้ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วขึ้น การศึกษาครั้งนี้จึงเริ่มต้นศึกษาจากยางพาราจำนวน 8 สายพันธุ์ คือ RRIT 251, RRIM 600, PB 235, PB 255, PB 260, BPM 24, ฉะเชิงเทรา 50 และบางปิด สกัดดีเอ็นเอแล้วเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน *CAD* ขนาด 1,281 คู่เบส จากนั้นโคลน อ่านลำดับเบส และวิเคราะห์ตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ *Scr*FI และ *Mbo*II ปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในยางพาราแต่ละสายพันธุ์

ABSTRACT

Para rubber tree (*Heveabra siliensis* Muell Arg.) is an important economic crop of Thailand. The bark of rubber tree has been widely used as raw materials by wood-processing industries or used directly in a production of furniture which is currently in high demand. Cultivar selection of the rubber tree, in particular associated with wood characteristic have been reported which is typically based on morphological criteria. Nevertheless, this method requires specialists and is very time-consuming. In such cases genetic sequences, the *Cinnamyl alcohol dehydrogenase* (*CAD*) gene involved in lignin biosynthesis in plants, and particular PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) method can provide specificity, accuracy and fast as an alternative means of identification to the cultivar level. In this study, therefore, eight cultivars of rubber tree, RRIM 600, RRIT 251, BPM 24, Chachoengsao 50, PB 260, PB 255, PB 235 and Bangpid were examined. The extracted DNA was PCR-amplified and the obtained *CAD* gene (1,281bp in length) was then cloned and subsequently sequenced. Two restriction endonucleases, *Scr*FI and *Mbo*II, were then selected to produce 8 different DNA restriction digested patterns that were consistent among individuals within each cultivar of the examined rubber tree.

คำสำคัญ: ยางพารา, *cinnamyl alcohol dehydrogenase*, *Heveabra siliensis*
Keywords: rubber tree, *cinnamyl alcohol dehydrogenase*, *Heveabra siliensis*

บทนำ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) เป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญของไทย ทั้งนี้ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกยางธรรมชาติมากเป็นอันดับหนึ่งของโลก (สถาบันวิจัยยาง,2555)ยางพารามีคุณสมบัติที่ยางสังเคราะห์ไม่สามารถทดแทนได้ แต่เนื่องจากยางพาราในแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน ทำให้การจำแนกในระดับสายพันธุ์ต้องใช้ผู้ชำนาญและใช้เวลานาน ในปัจจุบันชีวเชิงโมเลกุลสามารถนำมาใช้ระบุสายพันธุ์ของยางพาราได้โดยใช้เวลาสั้น เช่น เทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) วิธีนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายแบบเฉพาะเจาะจงโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสแล้วใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ตัดดีเอ็นเอเป็นชิ้นและอ่านผลโดยการวิเคราะห์ขนาดที่ต่างกันหลังจากแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซีส (สุชาดา สุขหร่อง, 2548) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP เพื่อระบุและใช้เป็นแบบตรวจสอบสายพันธุ์ของยางพาราโดยศึกษาในส่วนของยีน *Cinnamyl-alcohol dehydrogenase* (*CAD*) ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินในพืช

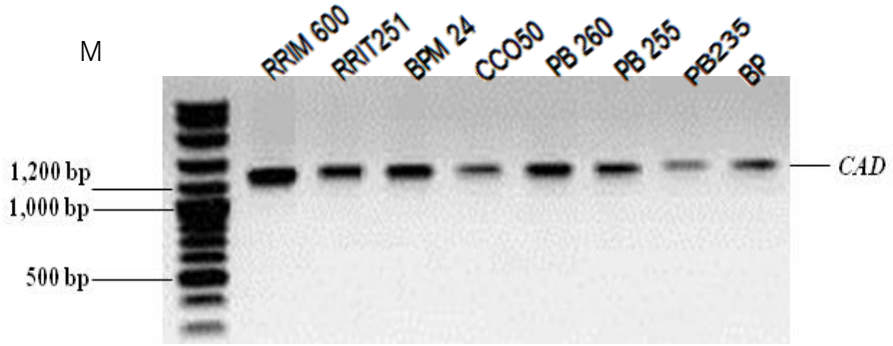
อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างยางพาราจำนวน 8 สายพันธุ์ คือ RRIT 251, RRIM 600, PB 235, PB 255, PB 260, BPM 24, ฉะเชิงเทรา 50 (CCO 50) และบางปิด (BP) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทราตำบลลาดกระทิง อำเภอสนามชัยเขต จังหวัดฉะเชิงเทรา ใช้ใบอ่อนสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด SP Plant DNA Kit ตามวิธีของบริษัท Omega Bio-Tek (USA) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *CAD* ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยมีขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C, 45 วินาที annealing 48 °C, 30 วินาทีและ extension 72 °C, 90 วินาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แล้วบันทึกภาพ จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปทำการโคลนโดยเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T easy (promega, USA) นำพลาสมิดสายผสมส่งอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท 1 BASE (Malaysia) แล้ววิเคราะห์หาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเลือกชนิดเอนไซม์ที่ยางพาราแต่ละสายพันธุ์ปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

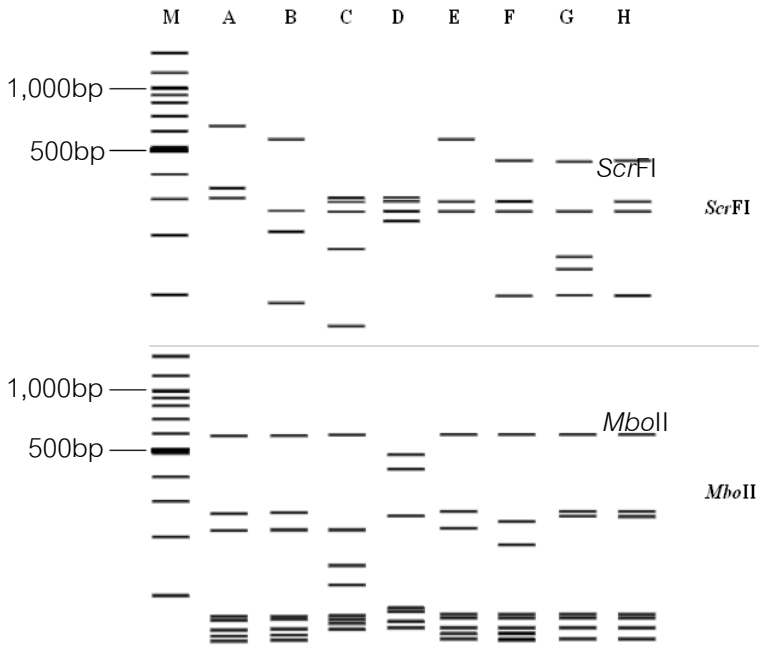
ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลผลิต PCR ในส่วนของยีน *CAD* ของยางพาราทุกสายพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนได้มีขนาดเท่ากับ 1,281 คู่เบส (รูปที่ 1) ซึ่งต่างจากรายงานของกุหลาบ คงทอง และประสาน สืบสุข (2550) ที่ศึกษาในยางพาราสายพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 เพิ่มจำนวนในส่วนของยีน *CAD* เช่นกันมีขนาด 542 คู่เบส โดยศึกษาจาก cDNA ซึ่งถอดรหัสย้อนกลับจาก mRNA บริเวณที่เป็นแอกซอน แต่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเป็น genomic DNA โครงสร้างของยีนจะมีทั้งส่วนที่เป็นอินทรอนและแอกซอน เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของยีน *CAD* ของยางพาราที่เพิ่มจำนวนได้ประกอบด้วย 4 แอกซอน และ 3 อินทรอน แต่ละแอกซอนมีขนาดเท่ากันในทุกสายพันธุ์คือ 144, 118, 231 และ 439 คู่เบส ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงผล) สอดคล้องกับงานวิจัยบางส่วนของ Christian *et al.* (2012) ที่แอกซอนแรกของยีน *CAD* ของ purple false brome (*Brachypodium distachyon*) มีขนาด 144 คู่เบสเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบเคียงทั้ง 8 สายพันธุ์สามารถคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Scr*FI และ *Mbo*II ที่จะปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของยางพาราแต่ละสายพันธุ์ 8 รูปแบบร่วมกันที่แตกต่างกัน (รูปที่ 2;A-H) ทั้งนี้ ในรายงานของกรรณิการ์ ธีระวัฒนสุขและคณะ (2553) ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไมโครแซทเทิลไลต์และเทคนิค RAPD ในยางพาราพันธุ์ปลูกแนะนำจำนวน 50 สายพันธุ์ และยางพาราที่มีต้นกำเนิดจากแหล่งเดิมจำนวน 20 สายพันธุ์พบว่าแถบดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันน้อย ไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของยางพาราทั้งสองกลุ่มได้ แต่เทคนิค PCR-RFLP ที่ศึกษาในครั้งนี้ และบริเวณยีน *CAD* ซึ่งความแตกต่าง

ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอินทรอนมีมาก มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้บ่งชี้เอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละสายพันธุ์ได้ โดยเทคนิค PCR-RFLP ที่มีการทำซ้ำได้ง่ายและประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากวิเคราะห์ผลบนเจลอะกาโรสผ่านวิธีการทำอิเล็กโทรโฟริซีส



รูปที่ 1 ผลผลิต PCR ในส่วนของยีน CAD ของยางพาราจำนวน 8 สายพันธุ์ มีขนาด 1,281 คู่เบส (M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder)



รูปที่ 2 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในส่วนของยีน *CAD* ขนาด 1,281 คู่เบส ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Scr*FI และ *Mbo*II ของยางพาราจำนวน 8 สายพันธุ์ (A = RRIM 600, B = RRIT 251, C = BPM 24, D = ฉะเชิงเทรา 50, E = PB 260, F = PB 255, G = PB 235 และ H = บางปิด) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้สามารถเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน *CAD* ในยางพาราจำนวน 8 สายพันธุ์ที่ทดสอบได้จาก genomic DNA ผลผลิต PCR มีขนาดเท่ากับ 1,281 คู่เบส ในยางพาราทุกสายพันธุ์ และพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ในส่วนของยีน *CAD* มีความจำเพาะกับสายพันธุ์ยางพาราแต่ละสายพันธุ์เมื่อตัดผลผลิต PCR ด้วยเอนไซม์ *Scr*FI และ *Mbo*II

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทราที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างยางพาราสำหรับการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข กัลยา ประพาน และนภาวรรณ เลขะวิพัฒน์. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ยางแนะนำและพันธุ์ยางจากแหล่งกำเนิดเดิมโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทิลไลต์ และ RAPD. 2553. วันที่ค้นข้อมูล 27 ธันวาคม 2555, เข้าถึงได้จาก http://it.doa.go.th

กุหลาบ คงทอง และประสาน สืบสุข. การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน *CAD* เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของเนื้อไม้ยางพารา. 2550. วันที่ค้นข้อมูล 27 ธันวาคม 2555, เข้าถึงได้จาก http://it.doa.go.th.

สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงการเกษตรและสหกรณ์. ข้อมูลยางพารา 2555. 2555. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

สุชาดา สุขหร่อง. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร. 2555. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Christian, B., Pia H. Nord, L. and Soren, K.R. Phylogeny and structure of the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in *Brachypodium distachyon.* Journal of Experimental Botany. 2012;63(17): 6223-36.