ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ ของมอสส์ และการประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์

DNA Fingerprinting of Mosses and Its Implication for Forensic Investigation

ชารียา ฉัตรวโรดม[1]*, **สหัช จันทนาอรพินท์**[2] **และ เครือวัลย์ ยุนรัมย์**[1]**

Chareeya Chatwarodom[1]*, Sahut Chantanaorrapint [2] and Krueawan Yoonram [1]**

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์; [2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

[1]Department of Applied Science; [2]Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110

*Corresponding author: *picnic.cry@gmail.com; **krueawan@gmail.com*

บทคัดย่อ

มอสส์เป็นพืชไม่มีดอก ขนาดเล็ก สามารถพบได้ทั่วไป ชิ้นส่วนมอสส์สามารถติดเสื้อผ้าหรือร่างกายได้ง่ายเมื่อสัมผัส จึงอาจใช้เป็นพยานวัตถุเชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยกับสถานที่เกิดเหตุได้ การระบุสปีชีส์ของมอสส์ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วนแกมีโตไฟต์ แต่ไม่สามารถระบุว่าเป็นมอสส์จากพื้นที่เดียวกัน งานวิจัยนี้เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างมอสส์ *Campylopus ericoides (Greif.)* A. Jeager จากพื้นที่ต่างกัน โดยเทคนิค Ramdom Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) PCR ผลการทดลองพบว่า RAPD primer ที่ใช้ในการทดลองให้รูปแบบผลิตภัณฑ์ PCR แตกต่างกันจากมอสส์แต่ละพื้นที่ เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่ามอสส์ที่เก็บจากพื้นที่เดียวกันมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้เคียงกันที่สุด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมอสส์ประกอบเป็นหลักฐานในการเชื่อมโยงสถานที่เกิดเหตุและผู้ต้องสงสัยได้

ABSTRACT

Mosses are small spore-bearing land plants and commonly found in moist shady area. Small shoot particles of mosses are easily transferred to clothes or body by touching. Mosses were proposed that are usable plants to provide botanic evidence for forensic investigations. Our study compares the DNA fingerprints of a moss species *Campylopus ericoides (Greif.)* A. Jeager from 4 locations using RAPD PCR. The results showed polymorphic PCR product bands of same mosses species from different locations. The phylogenetic tree analysis revealed that mosses from the same area are closely related. The results showed that DNA fingerprinting of moss plants in combination with phylogenetic are probable forensic tools in criminal investigations.

คำสำคัญ: Random Amplified Polymorphic DNA, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, มอสส์

Keywords: Random Amplified Polymorphic DNA, DNA fingerprinting, mosses

บทนำ

มอสส์ เป็น พืชกลุ่มไบรโอไฟต์ ที่มีขนาดเล็ก ไร้ดอก ไม่มีเนื้อเยื่อลำเลียง และไม่มีราก มีไรซอยด์ ซึ่งทำหน้าที่ช่วยในการยึดเกาะ ลำเลียงแร่ธาตุและน้ำสู่ต้นโดยผ่านเซลล์ สามารถพบได้ทั่วไป ซึ่งมอสส์ สปีชีส์ *Campylopus ericoides (Greif.)* A. Jeager ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Dicranaceae มีลักษณะเด่น คือ มีลักษณะของต้นแกมีโตไฟต์จะตั้งตรง สูงไม่เกิน 5 เซนติเมตรส่วนของลำต้นปกคลุมด้วยไรซอยด์ (rhizoid) สีแดง จำนวนมาก ใบเกิดเวียนรอบลำต้น แผ่นใบรูปใบหอกแคบ เส้นกลางใบ costa กว้างประมาณ ½ ของความกว้างแผ่นใบ ยาวพ้นแผ่นใบ ปลาบใบเรียวยาว ไม่เรียบ เซลล์บริเวณมุมของฐานใบมีขนาดใหญ่ ผนังหนา สีแดง รูปร่างสี่เหลี่ยมจัตุรัส เซลล์ฐานใบบริเวณอื่นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าบางกว่า เซลล์บริเวณกลางใบถึงปลายใบรูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูนถึงรูปไข่และที่สำคัญ ชิ้นส่วนมอสส์สามารถติดเสื้อผ้าหรือร่างกายได้ง่ายเมื่อสัมผัส มีเขตการกระจายพันธุ์กว้างสามารถพบได้ในหลายพื้นของไทย และประเทศเพื่อนบ้าน เช่น พม่า มาเลเซีย อินโดเนียเซีย เวียดนาม และ ฟิลิปปินส์ มักขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยกิ่งที่หักออกเจริญเป็นต้นใหม่ทำให้ต้นใหม่ จึง มีความแปรพันทางพันธุกรรมน้อย ดังนั้นมอสส์ชนิดนี้ที่พบในบริเวณใกล้เคียงกันน่าจะมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากกว่ากลุ่มประชากรที่อยู่ห่างออกไป

ลายพิมพ์ดีเอ็นเป็น หลักฐานสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งเป็นที่ยอมรับและใช้อย่างกว้างขวาง โดยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นของสารพันธุกรรมมนุษย์ที่พบในที่เกิดเหตุ แต่นอกจากลายพิมพ์ดีเอ็นจากสารพันธุกรรมมนุษย์แล้ว ยังมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ ได้แก่ สัตว์ เช่น การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ในการพิสูจน์ซากสัตว์ป่า หรือแม้กระทั่งการทดสอบอาหารประเภทฮาลาล

ดีเอ็นเอพืช ซึ่งอาจเป็นวัตถุพยานชิ้นสำคัญที่สามารถใช้ในการเชื่อมโยง ผู้ต้องสงสัยและสถานที่เกิดเหตุได้ เพราะหากพบชิ้นส่วนของพืชที่ตัวผู้ต้องสงสัย สามารถนำมาเปรียบเทียบพืชว่าเป็นชนิดเดียวกับสถานที่เกิดเหตุหรือไม่ โดยตัวอย่างพืช เช่น มอสส์ที่เป็นพืชที่มีขนาดเล็ก ไม่มีดอก และสามารถพบได้ทั่วไป เมื่อสัมผัสสามารถติดเสื้อผ้าหรือร่างกายได้ง่าย และใช้เป็นหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในการระบุสปีชีส์ แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยานี้ระบุได้ว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน แต่บอกไม่ได้ว่ามาจากพื้นที่ใด งานวิจัยของ Korpelainen และ Virtanen ในปี 2003 พบวัตถุพยานมอสส์ติดกับตัวผู้ต้องสงสัย มา 3 ชนิด และพบว่ามอสส์ที่สืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศ เก็บได้จากตัวผู้ต้องสงสัยมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอใกล้เคียงกับมอสส์จากที่เกิดเหตุและน่าจะมาจากต้นกำเนิดเดียวกัน

Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPD) เป็นวิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้น 10 เบสเพียงชนิดเดียว เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis) จากรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้ สามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง และบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่างได้ด้วย โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีแนวคิดนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมอสส์สปีชีส์ Campylopus ericoides (Greif.) A. Jeager ที่เก็บจากพื้นที่ต่างกันมาเปรียบเทียบกัน และนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้เพื่อระบุตำแหน่งของมอสส์

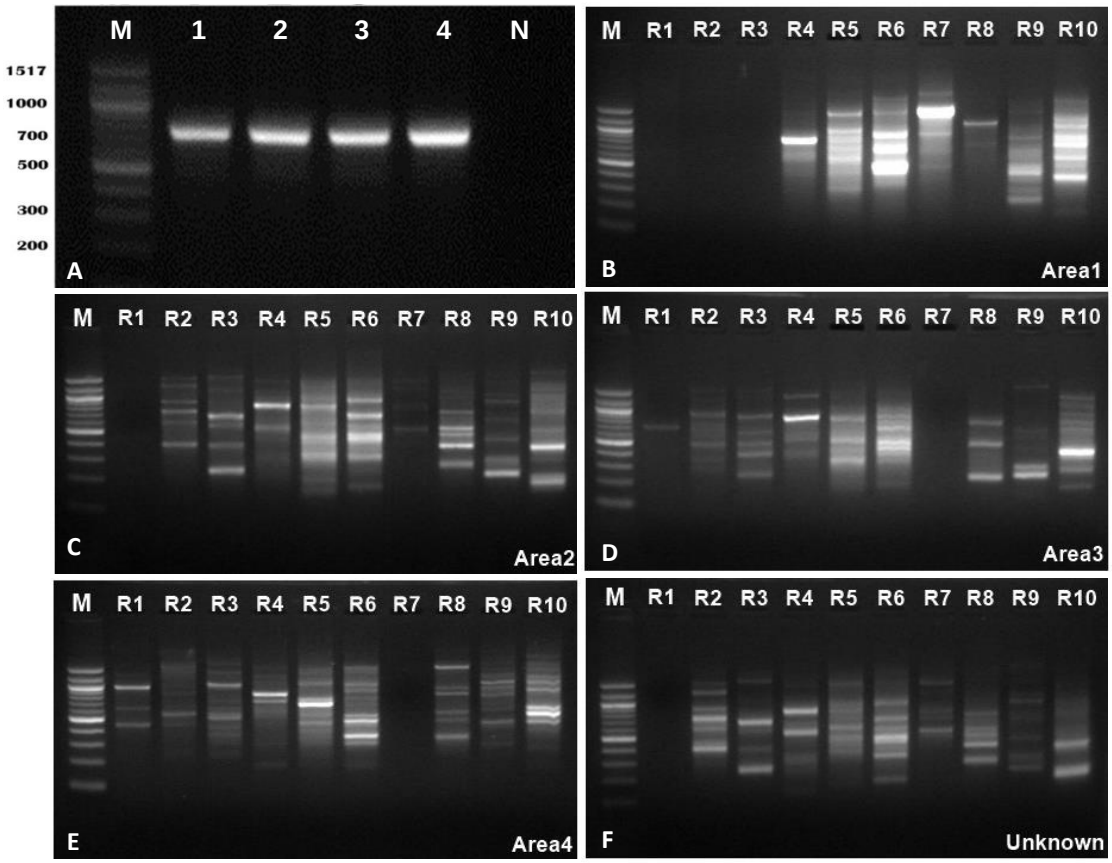
อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างมอสส์สปีชีส์ *Campylopus ericoides (Greif.)* A. Jeager จาก 4 พื้นที่ คือ พื้นที่ 1 เขารามโรม อุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง จังหวัดนครศรีธรรมราช พื้นที่ 2 ลานหินปุย อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก พื้นที่ 3 เขาเขียว อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา พื้นที่ 4 หนองปิง อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา ก่อนสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมอสส์ ทำความสะอาดเพื่อกำจัดให้ดิน

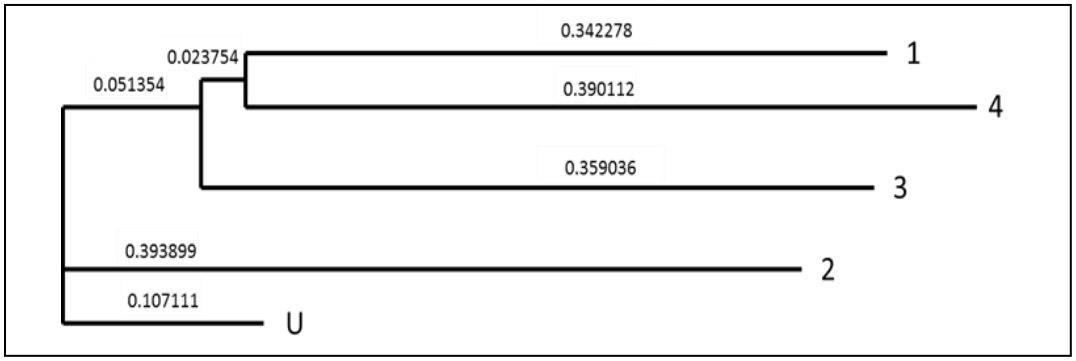
และสิ่งสกปรก แล้วบดมอสส์ในไนโตรเจนเหลว และสกัดดีเอ็ดเอด้วยชุด DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) แล้วเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยใช้ RAPD ไพรเมอร์ (BioDiesign) จากรายงานของ Virtanen (2007) แล้ววิเคราะห์รูปแบบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยเจลอิเล็คโตโฟรีสีส และถ่ายรูปเจลด้วย เครื่องมือ Gel Documentation วิเคราะห์ข้อมูลด้วย โปรแกรม Gel Analyser 2010 เพื่อหาขนาดของแต่ละแถบดีเอ็นเอ นำข้อมูลRAPD ที่ได้ไปสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor-Joining (NJ) นอกจากนี้ยังสุ่มเลือกมอสส์จาก 1 ใน 4 พื้นที่มาทำการทดลองอีกครั้ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลอง Positive Control PCR แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จาก 4 พื้นที่มีคุณภาพเหมือนกัน (รูปที่ 1 A) ส่วนการทดลอง RAPD PCR ทั้ง 10 ไพรเมอร์ พบว่ามอสส์ทั้ง 4 พื้นที่ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีรูปแบบต่างกัน (รูปที่ 2 B-F) การทดลอง RAPD PCR สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว โดยที่ไม่ต้องมีข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย และจากรูปแบบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ต่างกันนี้ แสดงให้เห็นว่า RAPD PCR สามารถใช้เพื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างมอสส์ที่ไม่มีข้อมูลพันธุกรรมได้ และในการทดลองสุ่มเลือกเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ 2 พบว่ามอสส์จากพื้นที่เดียวกันมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก RAPD PCR ที่คล้ายคลึงกัน และเมื่อศึกษา phylogenetic tree พบว่ามอสส์จากพื้นที่เดียวกันมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันที่สุด (รูปที่ 3)



รูปที่ 1 (A)แสดง Positive Control และ Negative Control ;M=Marker, 1=Area 1, 2=Area2, 3=Area3, 4=area4 และ N= Negative Control (B-F) แสดงแบนด์ RAPD primer แต่ละบริเวณ; M=Marker, R1=primer1, R2=primer2, R3=primer3, R4=primer4, R5=primer5, R6=primer6, R7=primer7, R8=primer8, R9=primer9 และ R10=primer10



รูปที่ 3 แสดง Phylogenetic trees ของมอสส์แต่ละพื้นที่ และระยะเวลาในการเกิดวิวัฒนาการ

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า มอสส์ในสปีชีส์เดียวกัน จากต่างพื้นที่ มีรูปแบบผลิตภัณฑ์ RAPD PCR ที่ต่างกัน มีความเป็นไปได้ที่จะใช้การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมอสส์ เพื่อแยกตัวอย่างจากต่างพื้นที่ และใช้ระบุพื้นที่ของมอสส์ ที่อาจพบจากร่างกายผู้ต้องสงสัยหรือวัตถุพยานอื่นเพื่อเชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยกับสถานที่เกิดเหตุ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

Eddy A., A Handbook of Malaysian Mosses Volume 1. Sphagnales to Dicranales. British Museum. London. 1988.

Gill P., Werrett D.J., Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. Forensic Sci. Int. 1987. 35: 145–148.

Hassel K., Gunnarsson U., The use of inter simple sequence repeats (ISSR) in bryophyte population studies. LINDBERGIA. 2003. 28: 152-157.

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L., Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA, Nature. 1985. 14: 67-73.

Korpelainen H. and VirtanenV., DNA fingerprinting of mosses. Journal of forensic sciences. 2003. 48: 804-807.

Marx J.L., DNA fingerprinting takes the witness stand. Science. 1988. 240: 1616–1618.

Mc Gourty C., New York State leads on genetic fingerprinting. Nature. 1989. 341: 90.

Mestel R., Murder trial features trees genetic fingerprint. New Sci. 1993. 138: 6.

Virtanen V., Korpelainen H. and Kostamo K., Forensic botany: Usability of bryophyte material in forensic studies. Forensic Science International. 2007. 172: 161-163.

Yoon C. K., Botanical witness for the prosecution. Science. 1993. 260: 894–895.