PROCEEDINGS

รายงานสืบเนื่องจากการประชุมทางวิชาการระดับชาติ

พะเยาวิจัย

PHAYAO RESEARCH CONFERENCE

๒๖-๒๗ มกราคม ๒๕๖๐

ณ หอประชุมพญางำเมือง มหาวิทยาลัยพะเยา

ISBN : 978-616-7820-46-0

การจำแนกสายพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหน้าวัวโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Cultivars identification and genetic relationship analysis of *Anthurium andreanum* using DNA barcodes

ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร[1*] แก้วตา สูตรสุวรรณ[1] เทียมจันทร์ สาระแสน[2] อลงกลด แทนออมทอง[2] กิตติศักดิ์ เฉนียง[1] และ ชลิตา ชูคันหอม[1]

Nattapong Srisamoot[1*], Kaewta Sootsuwan[1], Teamjun Sarasan[2], Alonklod Tanomtong[2], Kittisak Chanaeng[1], และ Chalita Chookanhom[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดสำหรับระบุสายพันธุ์หน้าวัว (*Anthurium andreanum*) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ของหน้าวัวสายพันธุ์มาตรฐาน 10 สายพันธุ์ และตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อสายพันธุ์ 1 ตัวอย่าง พบว่า ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer อยู่ในช่วง 578 – 693 คู่เบส และความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 638.1 คู่เบส การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.27 โดยมีค่าต่ำที่สุด ระหว่างสายพันธุ์แสงเทียน กับ ชมพูนพพร (0.13) และมีค่าสูงที่สุดระหว่างสายพันธุ์เปลวเทียนลำปาง กับ เชอรี่พิงค์ (0.36) แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบ่งหน้าวัวทั้ง 10 สายพันธุ์ออกเป็น 5 กลุ่ม ที่ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยกว่า 0.20 การทดสอบระบุสายพันธุ์หน้าวัวที่ไม่ทราบชื่อสามารถระบุได้จากตำแหน่งบนแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการว่าเป็นสายพันธุ์ชันเรด ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะและสีของจานรองดอก แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของหน้าวัวได้

คำสำคัญ: จำแนกสายพันธุ์ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม หน้าวัว ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trn*H–*psb*A intergenic spacer

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[1] Division of Biotechnology, Faculty of Agro-Industrial Technology, Kalasin University, Kalasin Province 46000

[2] Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen Province 40002

*Corresponding author e-mail: nattapongsri@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to establish DNA barcode for cultivars identification and study the genetic relationship of *Anthurium andreanum*. The nucleotide sequence of *trn*H–*psb*A intergenic spacer region of 10 standard cultivars and 1 unknown sample were used. The length of *trn*H–*psb*A intergenic spacer sequences from these cultivars ranged from 578 to 693 bp and the average length was 638.1 bp. The genetic relationship analysis indicated that the genetic distance has an average of 0.27. The lowest genetic distance value (0.13) was between Sang Tien and Chompoo Napon and the highest value (0.36) was between Plewtien Lampang and Cherry Pink. The UPGMA dendrogram showed that the 10 cultivars were divided into 5 groups as the genetic distance less than 0.20. Cultivars identification of unknown can be determined by the position on dendrogram as Sun Red cultivars which corresponds to the color of spathe. These results showed that the DNA barcode from *trn*H–*psb*A intergenic spacer sequence can be used to identify cultivars of *A. andreanum*.

Keywords: Cultivars identification, Genetic relationship, *Anthurium andreanum*, DNA barcodes, *trn*H–*psb*A intergenic spacer

บทนำ

หน้าวัว (*Anthurium andreanum* Hort.) เป็นพืชดอกในสกุล *Anthurium* วงศ์ Araceae (Arum family) เป็นไม้ตัดดอกที่มีสีสดใส และมีอายุการใช้งานที่ยาวนาน นิยมใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการตัดดอก การจัดสวน และการใช้เป็นไม้กระถาง [1] การปลูกหน้าวัวในประเทศไทยมีแนวโน้มขยายพื้นที่ปลูกมากขึ้น มีการปรับปรุงสายพันธุ์ในประเทศ ทั้งยังมีการนำสายพันธุ์ใหม่ๆ เข้ามาจากต่างประเทศ ทำให้เกิดความหลากหลายในรูปแบบ สีสัน และขนาดดอก [2] การพัฒนาปรับปรุงพันธุ์มาอย่างยาวนาน จึงเกิดความหลากหลายของสายพันธุ์เป็นอย่างมาก มีการตั้งชื่อสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้อย่างหลากหลาย ตามแต่ผู้พัฒนาสายพันธุ์ต้องการ ทำให้หากไม่ใช่เจ้าของหรือผู้พัฒนาสายพันธุ์จะไม่สามารถบอกได้ว่าหน้าวัวแต่ละต้นคือสายพันธุ์ใด [3] ในกรณีที่เกษตรกรหรือผู้มีความสนใจในการพัฒนาสายพันธุ์หน้าวัวจะคัดเลือกหน้าวัวต้นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีลักษณะตามที่ต้องการ และต้องการทราบชื่อของต้นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ดังกล่าว ผู้จำหน่ายก็ไม่สามารถให้ชื่อที่ถูกต้องได้ เนื่องจากเป็นการซื้อขายแบบรับต่อมายึกที ดังนั้นหากต้องการระบุสายพันธุ์หน้าวัวให้ถูกต้องจำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญเกี่ยวกับหน้าวัวโดยเฉพาะซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีบุคคลหรือองค์กรใดที่สามารถจัดการเรื่องดังกล่าวได้

การระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcode) มีแนวคิดมาจากการทำบาร์โค้ดในสินค้าต่างๆ แล้วนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดและจำแนกสิ่งมีชีวิตเพื่อลดความผิดพลาด มีความรวดเร็วในการจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดสูงแต่มีความต่างระหว่างชนิดเดียวกันต่ำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดในการจำแนกสิ่งมีชีวิต [4] ในปี ค.ศ. 2007 Chase และคณะ [5] ได้เสนอให้มีการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนและบริเวณที่ไม่ถอดรหัสของพืช 3 บริเวณต่อพืช 1 ชนิด โดยเสนอทางเลือกเป็น 2 แนวทาง คือ *rpo*C1, *mat*K และ *trn*H–*psb*A intergenic spacer หรือ *mat*K, *rpo*B และ *rpo*C1 ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 Hollingsworth และคณะ [6] ได้เสนอบริเวณมาตรฐาน 2 บริเวณ คือ *rbc*L และ *mat*K เป็น core barcode regions ในการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืช จากนั้นจึงมีการนำเทคนิคการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของพืช

ระดับสปีชีส์เป็นส่วนใหญ่ [3] อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยบางส่วนที่นำไปใช้จำแนกระดับสายพันธุ์ (cultivars) เช่น การจำแนกสายพันธุ์ของงุ่น [7] ฝ้าย [8] ละหุ่ง [9] ส้มโอ [10] และหน้าวัว [3] เป็นต้น

*trn*H–*psb*A intergenic spacer เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณหนึ่งในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast genome) ของพืชดอกที่มีความแปรผันมาก จึงนิยมนำมาศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรพืชและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับสายพันธุ์และได้รับการเสนอให้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืช ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ประกอบด้วยดีเอ็นเอจากสองส่วนที่มีวิวัฒนาการแตกต่างกัน คือ ส่วนของยีน *psb*A ที่มีการอนุรักษ์สูง ยีนนี้ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนดี 1 (D1 protein) ที่เป็นองค์ประกอบหลักของระบบแสง II (photo system II) กับส่วนของยีน *trn*H ที่มีความแปรผันสูงในพืชชั้นสูง โดยยีนนี้ควบคุมการสังเคราะห์ tRNA ของกรดอะมิโนฮิสทิดีน (histidine) [11] ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ซึ่งองค์กร The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) แนะนำให้ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืช เนื่องจากมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการเพียงพอที่จะทำให้เกิดความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วยให้จำแนกพืชคนละชนิดออกจากกันได้ [4] ซึ่งดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดนี้จะใช้ระบุสายพันธุ์หน้าวัวให้ถูกต้องรวดเร็วและรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของหน้าวัวต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การรวบรวมสายพันธ์หน้าวัวและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างหน้าวัวสายพันธุ์ต่างๆ 10 สายพันธุ์ (**ตารางที่ 1**) และตัวอย่างหน้าวัวที่ไม่ทราบชื่อสายพันธุ์ 1 ตัวอย่าง ทำการสกัดดีเอ็นจากตัวอย่างใบอ่อนหน้าวัว ตามวิธีของ Doyle and Doyle [12] โดยนำใบพืชมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ บดใบพืชที่หั่นแล้วประมาณ 0.2 กรัม ในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด จากนั้นเติม Extraction buffer (0.1 M Tris – HCl, 0.05 M EDTA, 0.1 M NaCl, 0.5% SDS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม Isopropanol ที่แช่เย็นจัด 500 ไมโครลิตร ปล่อยให้ดีเอ็นเอตกตะกอนที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 500 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งในโถดูดความชื้น 15 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 40 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ul ประกอบด้วย 1xPCR buffer, 0.4 mM dNTP, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.5 uM primer, 0.5 unit *Taq* polymerase (Vivantis) และดีเอ็นเอต้นแบบ 20 นาโนกรัม โดยคู่ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer คือ 5'–G TTATGCATGAACGTAATGCTC–3' และ 5'–CGCGCATGGTGGATT CACAATCC–3' [13] แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง PCR ซึ่งโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ pre-denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส (1 นาที) 1 รอบ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส (30 วินาที) annealing 50 องศาเซลเซียส (20 วินาที) และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส (50 วินาที) เป็นจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส (5 นาที) 1 รอบ ตรวจสอบผล

ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (amplification product) โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

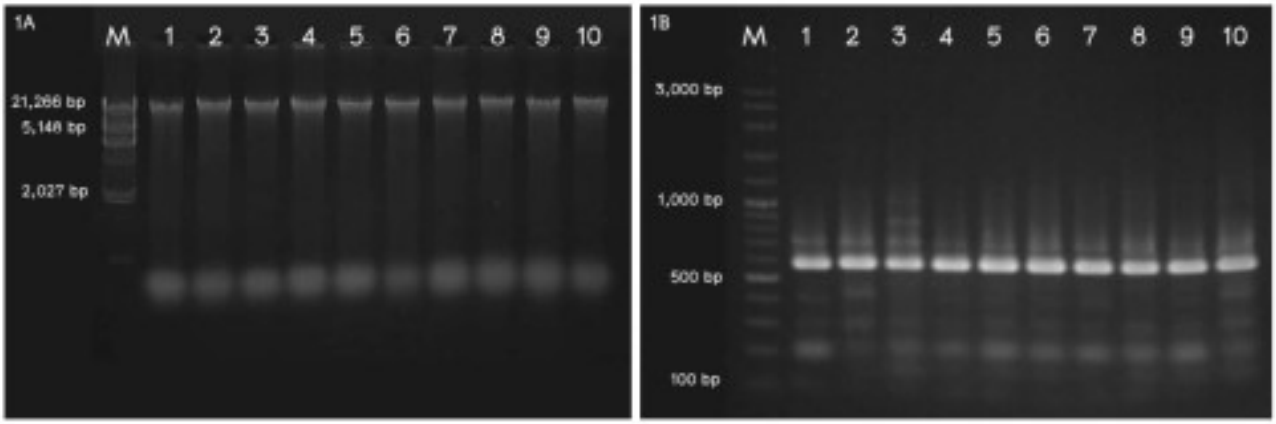
วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer โดยตัดวุ้นอะกาโรสบริเวณแถบดีเอ็นเอของผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสส่งบริษัทตัวแทน (Gibthai Co., Ltd.) ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ในหน้าวัวแต่ละสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 [14] แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี p–distance method และสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)

การทดสอบการระบุสายพันธุ์หน้าวัวด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

นำตัวอย่างหน้าวัวที่ไม่ทราบชื่อสายพันธุ์จากแหล่งจำหน่าย จำนวน 1 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับหน้าวัวสายพันธุ์มาตรฐานที่สร้างไว้ เพื่อระบุว่าตัวอย่างหน้าวัวนั้น คือหน้าวัวสายพันธุ์ใด โดยพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาประกอบด้วย

ผลการศึกษา

การสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Dolye and Dolye [12] พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีแถบของจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) ขนาดใหญ่ที่ชัดเจน (ภาพที่ 1A) สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ต่อไปได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากการนำผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปริมาณ 5 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของชิ้น DNA กับ 1kb DNA ladder marker (Vivantis) และย้อมด้วย ethidium bromide ถ่ายภาพแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ พบว่าผลผลิตที่ได้มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (ภาพที่ 1B) และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ของหน้าวัวแต่ละสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 พบว่า ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer อยู่ในช่วง 578 – 693 คู่เบส และความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 638.1 คู่เบส (ตารางที่ 1)



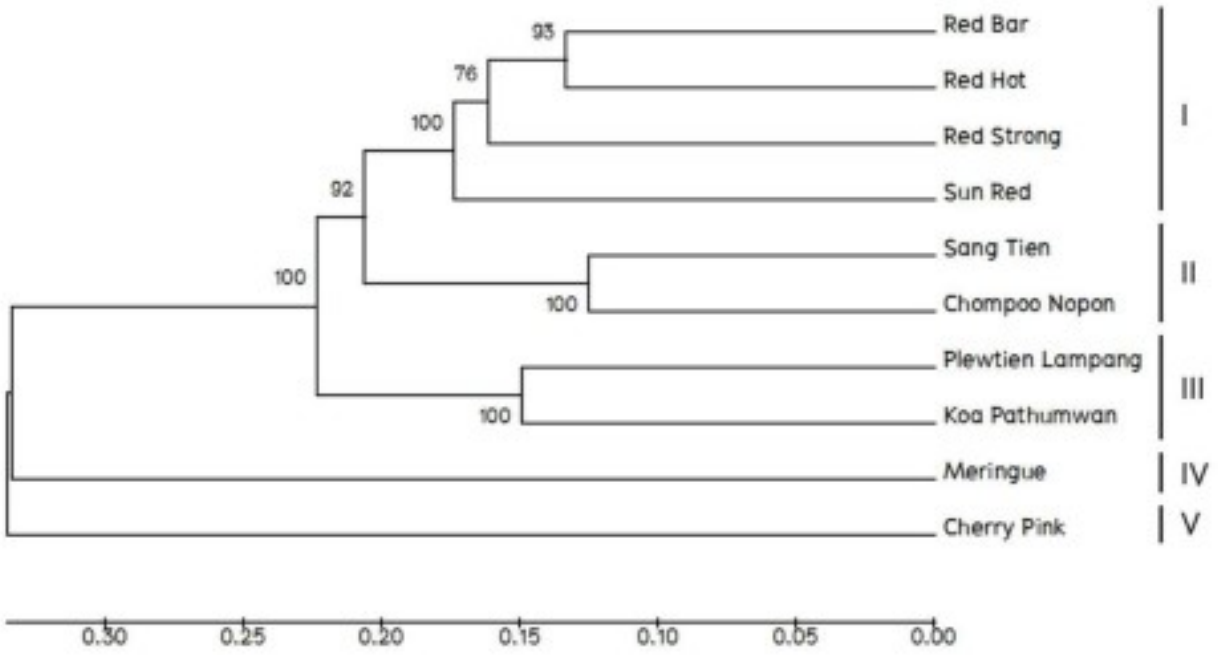
ภาพที่ 1 ผลการสกัดดีเอ็นเอของหน้าวัวสายพันธุ์ต่างๆ ตามวิธีของ Dolye and Dolye [12] เปรียบเทียบกับ lambda/*Hin*DIII marker (A) และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer เปรียบเทียบกับ 1kb Plus DNA ladder marker (Vivantis) (B) หมายเลขสายพันธุ์ 1–10 ตามรายชื่อที่แสดงในตารางที่ 1

ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างหน้าวัวทั้ง 10 สายพันธุ์จากวิธี p–distance method มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.27 โดยมีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 0.13 ระหว่างสายพันธุ์แสงเทียน กับ ชมพูนพพร และมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 0.36 ระหว่างสายพันธุ์เปลวเทียนลำปาง กับ เชอรี่พิงค์ (ตารางที่ 1)

แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่า หน้าวัวทั้ง 10 สายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ด้วยค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยกว่า 0.20 หรือ มีความใกล้ชิดกันมากกว่า 80% คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์เรดบาร์ เรดฮอท เรดสตรอง และซันเรด กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์แสงเทียน และชมพูนพพร กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสายพันธุ์เปลวเทียนลำปาง และขาวปทุมวัน ส่วนกลุ่มที่ 4 และ 5 ประกอบด้วยกลุ่มละ 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์เมอร์ริงเก้ และเชอรี่พิงค์ ตามลำดับ โดยการจัดกลุ่มดังกล่าวเป็นการจัดกลุ่มตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer

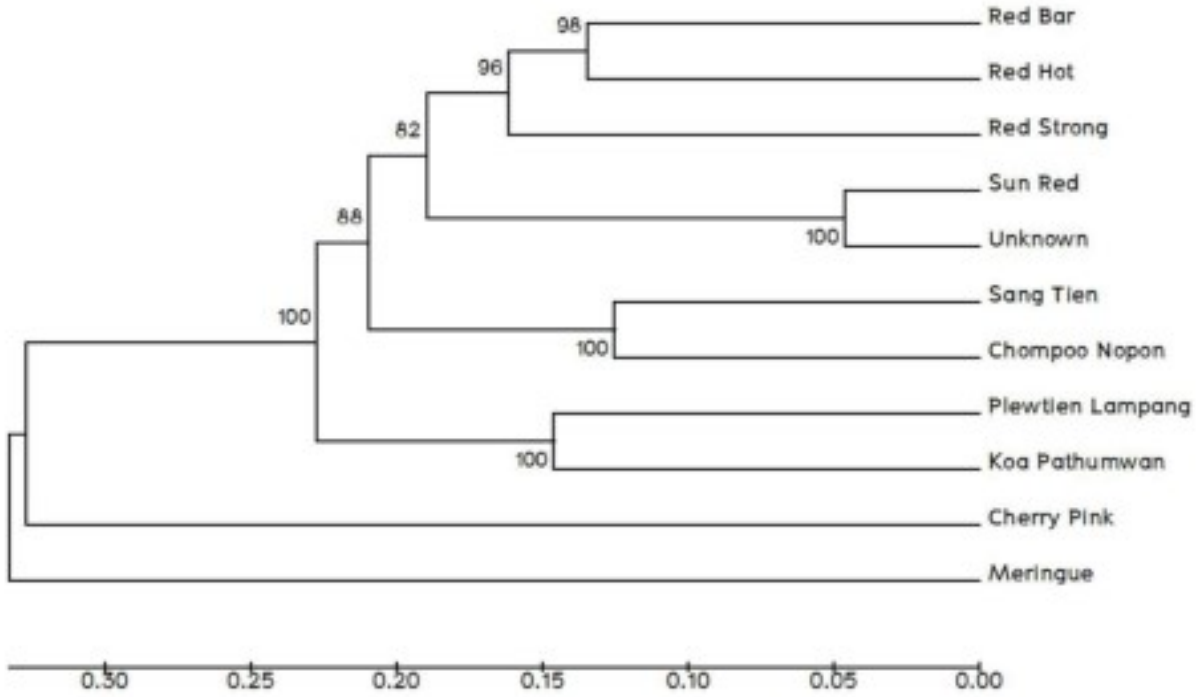
ตารางที่ 1 แสดงชื่อสายพันธุ์หน้าวัว ความยาว เบสองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer และความแตกต่างทางพันธุกรรมของหน้าวัว 10 สายพันธ์จากวิธี p–distance method

No.	Taxon	Thai name	Sequences Length (bp)	Genetic distance									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	Sang Tien	แสงเทียน	675	0.00									
2.	Plewtien Lampang	เปลวเทียนลำปาง	679	0.21	0.00								
3.	Chompoo Napan	ชมพูนพพร	678	**0.13**	0.20	0.00							
4.	Koa Pathumwan	ขาวปทุมวัน	693	0.24	0.15	0.23	0.00						
5.	Red Bar	เรดบาร์	615	0.20	0.22	0.20	0.23	0.00					
6.	Red Strong	เรดสตรอง	598	0.20	0.22	0.21	0.24	0.16	0.00				
7.	Red Hot	เรดฮอท	602	0.20	0.21	0.21	0.23	0.13	0.16	0.00			
8.	Sun Red	ซันเรด	578	0.21	0.22	0.23	0.24	0.20	0.17	0.15	0.00		
9.	Cherry Pink	เชอรี่พิงค์	585	0.33	**0.36**	0.33	0.35	0.34	0.33	0.33	0.31	0.00	
10.	Meringue	เมอร์ริงเก้	678	0.35	0.34	0.35	0.32	0.34	0.35	0.34	0.29	0.34	0.00
	Average		638.1					0.27					



ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของหน้าวัวทั้ง 10 สายพันธุ์ จากวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 [14]

การทดสอบการระบุสายพันธุ์หน้าวัวที่ไม่ทราบชื่อสายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดที่สร้างขึ้นนี้ พบว่า ตัวอย่างดังกว่าวถูกจัดอยู่ใกล้ชิดกับหน้าวัวสายพันธุ์ชันเรดบนแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ด้วยค่า Bootstrap 100% (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การทดสอบการระบุสายพันธุ์หน้าวัวโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานที่สร้างไว้

วิจารณ์และสรุปผล

การสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Doyle and Doyle (1987) [12] โดยใช้สารละลายที่มีส่วนผสมของ CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) ที่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีนและสารโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งสามารถช่วยในการกำจัดสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณมากในพืชออกไปได้ [15] จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของพืชหลายชนิด [16] จีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของหน้าวัวที่สกัดได้มีขนาดใหญ่เห็นชัดเจน เทียบเท่ากับขนาดจีโนมิคดีเอ็นเอของ Lambda /*Hin*DIII marker แต่มีเศษของอาร์เอ็นเอ (RNA) เจือปนบ้างเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม เศษอาร์เอ็นเอนี้ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ของหน้าวัวแต่ละสายพันธุ์มีความยาวไม่เท่ากัน ถึงแม้จะเห็นผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสบนวุ้นอะกาโรสอยู่ในตำแหน่งเดียวกันก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว ไม่ใช่ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของบริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ของหน้าวัวแต่ละสายพันธุ์ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากพืชต่างชนิดกัน [13] ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เฉลี่ยที่ยาวประมาณ 600 คู่เบสนี้แตกต่างจากการศึกษาในกล้วยไม้ [17] ที่พบว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบ 13 พันธุ์ มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส นอกจากนี้ยังมีความแปรผันของความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ในพืชแต่ละชนิดมากซึ่งพบว่ามีความยาวตั้งแต่ 200 จนถึงมากกว่า 1,000 คู่เบส [18] ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้ไพรเมอร์คนละชนิดหรือเป็นลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ที่มีการปรากฏของชิ้นดีเอ็นเอประเภท inversion ที่ยาว 25–27 คู่เบส แทรกอยู่ โดยพืชชนิดเดียวกันอาจมีชิ้น inversion ที่มีโครงรูป (configuration) ต่างกัน กล่าวคือ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชิ้น inversion ต่างกัน ลักษณะเช่นนี้เรียกว่า intraspecific inversion ของลำดับนิวคลีโอไทด์ [19] ที่ทำให้เครื่องอ่านลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หยุดอ่านหรือให้สายนิวคลีโอไทด์คุณภาพไม่ดี [20] อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ยังคงได้รับความนิยมค่อนข้างมากในการนำมาใช้แยกและระบุชนิดของพืช เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานบริเวณอื่นเนื่องจากมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูงเพียงพอ และมีส่วนปลายของสายนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้านที่เป็นบริเวณอนุรักษ์สูง (ความยาวประมาณ 75 คู่เบส) จึงสามารถพัฒนาไพรเมอร์ที่เป็น universal primers ที่ใช้ศึกษากับพืชได้หลายกลุ่ม [21]

ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์แสงเทียน กับ ชมพูนพพร ที่มีความใกล้ชิดกันมาก ไม่สอดคล้องกับลักษณะของสีจานรองดอก โดยสายพันธุ์แสงเทียนมีจานรองดอกสีขาวตอนแรกแล้วเปลี่ยนเป็นสีเขียวตอนดอกแก่ ในขณะที่สายพันธุ์ชมพูนพพรมีจานรองดอกสีชมพูเข้ม ซึ่งแตกต่างกันอย่างชัดเจน ทั้งนี้เพราะการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนี้ ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer เพียงบริเวณเดียว ไม่ครอบคลุมทั้งจีโนมจึงไม่ใช่ลักษณะทางพันธุกรรมทั้งหมด และไม่มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะของสีจานรองดอก ต่างจากการศึกษาของณัฐพงษ์ และคณะ [22] ซึ่งใช้เทคนิคลายพิมพ์เอเอฟแอลพีในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหน้าวัว โดยพบว่าการจัดกลุ่มของหน้าวัว 33 สายพันธ์ ในแต่ละกลุ่มจะมีสีของจานรองดอกที่คล้ายคลึงกัน แต่จะแตกต่างกันในส่วนของสีปสี และลักษณะการเปลี่ยนสีของทั้งปสีและจานรองดอกเมื่ออายุมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิคลายพิมพ์เอเอฟแอลพีเป็นการใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดในจีโนม อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหน้าวัว จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer นี้ เป็นการศึกษาขั้นต้นเพื่อหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันของหน้าวัวแต่ละสายพันธุ์

เพื่อใช้สำหรับการจำแนกสายพันธุ์หน้าวัวเป็นหลัก นอกจากนี้ เป็นการศึกษาในหน้าวัวเพียง 10 สายพันธุ์ซึ่งยังไม่ครอบคลุมกับหน้าวัวสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

การทดสอบการระบุสายพันธุ์หน้าวัวที่ไม่ทราบชื่อด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดที่สร้างขึ้นนี้ พบว่าตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อที่มีสีของจานรองดอกเป็นสีแดงสด และเปลี่ยนเป็นสีแดงปนเขียวเมื่ออายุมากขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความคล้ายคลึงกับหน้าวัวสายพันธุ์ชันเรด ถูกจัดอยู่ใกล้ชิดกับหน้าวัวสายพันธุ์ชันเรดบนแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ด้วยค่า Bootstrap 100% ซึ่งค่า Bootstrap มีความสัมพันธ์กับความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยค่า Bootstrap 85–100% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับสูง ค่า Bootstrap 71–84% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับปานกลาง ค่า Bootstrap 50–70% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับต่ำของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้ [23] นอกจากนี้ ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer ระหว่างหน้าวัวสายพันธุ์ชันเรดกับตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อยังมีค่าต่ำที่สุดอีกด้วย (0.04, ไม่ได้แสดงข้อมูล) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อในงานวิจัยนี้ คือ หน้าวัวสายพันธุ์ชันเรด จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*H–*psb*A intergenic spacer สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดมาตรฐานสำหรับการใช้ระบุสายพันธุ์หน้าวัวให้ถูกต้องได้ แต่อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดที่สร้างขึ้นนี้ยังไม่ครอบคลุมกับหน้าวัวสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ที่เอื้อเฟื้ออาคารสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Nowbuth P, Khittoo J, Bahorun T, Venkatasamy S. Assessing genetic diversity of some *Anthurium andraeanum* Hort. cut-flower cultivars using RAPD markers. *Afr. J. Biotechnol*, 2005; 4(10), 1189–1194.
2. พฤกษทล. *หน้าวัว*. กรุงเทพฯ. ไทยควอลิตี้บุ๊ค; 2550.
3. ณัฐพงษ์ ศรีสมทุร, กิตติศักดิ์ เฉนียง และอลงกลด แทนออมทอง. การระบุสายพันธุ์หน้าวัวโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด. *แก่นเกษตร*, 44 (ฉบับพิเศษ 1), 2559, 838–843.
4. พรรษา มนต์แข็ง, อรุณรัตน์ ฉวีราช, ธวัดชัย ธานี, และรุ่งลาวัลย์ สุดมูล. ดีดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุลขี้เหล็ก (Senna). *วารสารวิจัย มข. (บศ.)*, 2556; 13(2), 532–543.
5. Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, Van den Berg C, S. Madrinan S, Petersen G. *et al.* New trends in plant systematics: a proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. *Taxon*, 2007; 56(2), 295–299.
6. Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, Van der Bank M. *et al.* A DNA barcode for land plants. *PNAS*, 2009; 106(31), 12794–12797.
7. Galbács Z, Halász G, Kozma P, Hoffmann S, Kovác L, Veres A. *et al.* Identification of grapevine cultivars using microsatellite-based DNA barcodes. *Vitis*, 2009; 48(1), 17–24.
8. Zhao L, Cai C, Mei HX, Guo WZ. Screening of microsatellite loci for identifying genome barcoding of cotton cultivars. *Acta. Agron. Sin*, 2012; 38(10):1810–1817.

9. Enan M, Fawzi N, Al-Deeb M, Amiri K. DNA barcoding of *Ricinus communis* from different geographical origin by using chloroplast *mat*K and internal transcribed spacers. *Am. J. Plant. Sci*, 3, 2012; 1304-1310.
10. Wu B, Zhong G, Yue J, Yang R, Li C, Li Y. *et al.* Identification of pummelo cultivars by using a panel of 25 selected SNPs and 12 DNA segments. *PLoS ONE*, 2014; 9(4), e94506.
11. Štorchová H, Olson S. The architecture of the chloroplast *psb*A-*trn*H non-coding region in angiosperms. Plant Systematics and Evolution, 2007; 268(1), 235-256.
12. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 1987; 19,11-15.
13. Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, 1997; 84(9), 1120-1136.
14. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013; 30(12), 2725-2729.
15. ธนากร วงษศา, อภินันท์ ลิ้มมงคล, และอนุพันธ์ กงบังเกิด. การเปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2551; 5(2), 165-175.
16. กิตติศักดิ์ เฉนียง, แก้วตา สูตรสุวรรณ, อลงกลด แทนออมทอง, และ ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหน้าวัวโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L. การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 8. (หน้า 341-347). 30-31 พฤษภาคม 2559. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา. จังหวัดพะเยา; 2559.
17. นฤมล ธนานันต์, วริสรา แทนสง่า, และธีระชัย ธนานันต์. การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 22 (ฉบับพิเศษ 5), 2557; 664-673.
18. Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. PNAS, 102(23), 2005; 8369-8374.
19. วุฒิพงศ์ มหาคำ. DNA barcodes ของพืช: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย, 2554; 3(1), 1-30.
20. Spooner DM. DNA barcoding will frequently fail in complicated groups: an example in wild potatoes. American Journal of Botany, 2009; 96(6), 1177-1189.
21. Taberlet P, Gielly L, Bouvet J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology, 17(5), 1105-1109.
22. ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร, ประพัฒน์ศรี พันธ์ศรี, และปุณิกา ฉายเสมแสง. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหน้าวัวจากเทคนิคลายพิมพ์เอเอฟแอลพี. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19 เรื่อง พันธุศาสตร์และจีโนมิกส์: จากการศึกษาระดับโมเลกุลสู่การประยุกต์. (หน้า 150-157). 15 - 17 กรกฎาคม 2558. โรงแรมเซ็นทาราแอนคอนเวนชันเซนเตอร์ขอนแก่น, จังหวัดขอนแก่น; 2558.
23. ดวงกลม ทองอร่าม, วุฒิพงศ์ มหาคำ, และคทาวุธ นามดี. การจำแนกพืชสกุล *Caulokaempferia* K. Larsen (วงศ์ขิง) โดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล. วารสารวิจัย มข, 2548; 10(1), 5-12.