การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชตระกูลถั่วพันธุ์พื้นบ้าน 4 ชนิด โดยใช้เทคนิค ISSR

DNA Fingerprinting of 4 Indigenous Leguminosae species using ISSR technique

ศิริลักษณ์ อินทะวงศ์[1/] รัชนก ทองเวียง[1/] ฐิตามินทร์ คงสำราญ[1/]

Siriluck Inthawong[1/] Ratchanok Thongwiang[1/] Thitamin Khongsumraan[1/]

Abstract

Four indigenous Leguminosae species: *Vigna* spp., *Dolichos lablab* L., *Clitoria ternatea* L., and *Indigofera tinetoria* L., which collected their germplasm in Genebankof Biotechnology Research and Development Office, Patumthani, Thailand. Their DNA fingerprints were done by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) technique using 20 ISSR primers during October 2012 - September 2013 at molecular biology laboratory of Genebank Research and Development Group, Biotechnology Research and Development Office (Bang-Khen, Bangkok, Thailand). The number of ISSR primers which provided clear reproducible and scorable bands in DNA fingerprint of *Vigna* spp., *D. lablab* L., *C. ternatea* L., and *I. tinetoria* L. were 8, 7, 7 and 4, respectively. However, the polymorphism was found only in *Vigna* spp.

Key-words: Leguminosae, ISSR technique, DNA fingerprinting

บทคัดย่อ

พืชพื้นเมืองตระกูลถั่ว 4 ชนิด ได้แก่ ถั่วปี (*Vigna* spp.) ถั่วแปบ (*Dolichos lablab* Linn.) อัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) และคราม (*Indigofera tinetoria* L.) ที่ได้เก็บเชื้อพันธุกรรมไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี ประเทศไทย ถูกนำมาจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) โดยใช้ ISSR ไพรเมอร์ จำนวน 20 ชนิด

[1/] กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 50 ถ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร. 02-5614672

ระหว่างเดือน ตุลาคม ปี พ.ศ. 2555 - กันยายน ปี พ.ศ. 2556 ที่ห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุล กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (บางเขน) กรุงเทพฯ ประเทศไทย พบว่า มี ISSR ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและตรวจนับได้ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ ถั่วปี ถั่วแปบ อัญชัน และ คราม จำนวน 8, 7, 7 และ 4 ชนิด ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วปีเท่านั้น

คำสำคัญ: พืชตระกูลถั่ว เทคนิค ISSR การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

คำนำ

ประเทศไทยถือว่าเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ด้านทรัพยากรธรรมชาติแห่งหนึ่งของโลกเนื่องจากตั้งอยู่ในแถบศูนย์สูตร ซึ่งเป็นบริเวณที่มีสภาพภูมิประเทศ และภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการอยู่อาศัย และการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต แต่เป็นที่น่าวิตกว่าในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา ป่าธรรมชาติดั้งเดิมได้ถูกทำลายลงไปมาก ทำให้ถิ่นที่อยู่ของพรรณพืชหลายชนิดถูกทำลาย หรือเปลี่ยนสภาพไป เป็นเหตุให้พืชพรรณนานาชนิดอันเป็นทรัพยากรของประเทศหลายชนิดที่อาจมีศักยภาพทางเศรษฐกิจและเป็นประโยชน์ต่อมนุษยชาติในอนาคตเสี่ยงต่อการถูกทำลาย และสูญพันธุ์ไปจากโลกหรือจากประเทศก่อนที่จะได้นำมาใช้ประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจ โดยเฉพาะพรรณพืชที่มีสถานภาพเป็นพืชท้องถิ่น (domestic plant) และพืชพื้นบ้าน (indigenous plant) (สุรพล, 2554)

การอนุรักษ์พันธุ์พืชพื้นบ้านและพืชท้องถิ่นนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง ทำให้พืชพื้นบ้านและพืชท้องถิ่นบางชนิดถูกทำลายและสูญหายในที่สุด ดังนั้น วิทยาการในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชจึงมีบทบาทสำคัญที่จะดำรงทรัพยากรนี้ให้ยั่งยืน ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จึงได้มีนโยบายในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช โดยการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ของพืชพื้นบ้าน/พืชท้องถิ่นจากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช เพื่อป้องกันการสูญหายของเชื้อพันธุกรรมพืชดังกล่าว ซึ่งในปีงบประมาณ 2554 (ต.ค. 53 - ก.ย. 54) ได้มีการสำรวจรวบรวมเมล็ดพันธุ์พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่นได้มากกว่า 200 ชนิด โดยเป็นพืชตระกูลถั่ว 10 ชนิด และส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย เรื่อง การศึกษา สำรวจ และประเมินเชื้อพันธุกรรมพืช (พืชพื้นเมือง/พืชท้องถิ่น) ของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ก็ได้นำพืชตระกูลถั่ว 4 ชนิดที่มีเมล็ดพันธุ์มากพอมาทำการศึกษาพันธุกรรม และลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อเป็นฐานข้อมูล และการใช้ประโยชน์ในอนาคต เพราะเป็นขั้นตอนสำคัญอีกขั้นตอนหนึ่งของการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช

อย่างไรก็ตาม การศึกษาพันธุกรรมพืชและการจำแนกกลุ่มพืช สามารถทำได้โดยอาศัย

ความแตกต่างของสัณฐานวิทยาที่ปรากฏแต่ก็ยังมีข้อจำกัดมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าพืชเหล่านั้นมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะที่ใกล้เคียงกัน การใช้เทคนิคทางด้านอณูชีวโมเลกุลจึงเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาดังกล่าว เทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) เป็นหนึ่งในเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช ซึ่งเทคนิค ISSR มีวิธีการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่ให้ผลแม่นยำและสามารถทำซ้ำได้ (Bornet and Branchard, 2001) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มพืช รวมไปถึงการใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการจำแนกพืชเพื่อจัดทำฐานพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์พืชต่อไป จะทำให้การประเมินลักษณะพันธุกรรมของพืชมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พืชทดลอง

พืชที่ใช้ในการทดลองเป็นพืชพื้นเมืองตระกูลถั่ว 4 ชนิด จำนวน 10 สายพันธุ์ จากธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ. ปทุมธานี ได้แก่

1. ถั่วปี (*Vigna* spp.) หมายเลขลงทะเบียนเมล็ดพันธุ์ R476, R650, R651 และ R940

2. ถั่วแปบ (*Dolichos lablab* Linn.) หมายเลขลงทะเบียนเมล็ดพันธุ์ R396 และ R874

3. อัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) หมายเลขลงทะเบียนเมล็ดพันธุ์ R23 และ R37)

4. คราม (*Indigofera tinetoria* L.) หมายเลขลงทะเบียนเมล็ดพันธุ์ R394 และ R702

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช

นำใบอ่อนของพืชทดลองทุกสายพันธุ์มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNAzol ES reagent (Molecular Research Center, Inc., USA) จากนั้นปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้เป็น 12 ng/l นำไปผสมใน reaction mixture ที่ประกอบด้วย 1 PCR buffer, 2mM $MgCl_2$, 200M dNTPs, 0.5M primer, 1.5 unit i-Taq™ DNA polymerase (iNtRON Biotechnology, Korea) และ น้ำกลั่นปริมาตรรวม 25 µl/ 1 ตัวอย่าง

3. การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำ reaction mixture ที่ได้จากข้อ 2 ไปเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) ดังนี้ อุณหภูมิ 94 °ซ 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย อุณหภูมิ 92 °ซ 1 นาที 45-60 °ซ 2 นาที และ 72 °ซ 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ อุณหภูมิ 72 °ซ 5 นาที จำนวน 1 รอบ โดยใช้ ISSR primer จำนวน 20 ชนิด ที่มีอุณหภูมิในช่วง annealing แตกต่างกัน (Table 1) นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis ใน 1 TBE buffer ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์

Table 1 List of 20 ISSR primers and their sequence which were categorized by annealing temperature

Annealing temperature (°C)	No.	Primer sequence
45	1	$(CAC)_3GC$
	2	$(GAG)_3GC$
49	1	$(CA)_6AC$
	2	$(CA)_6GT$
52	1	$(AG)_7AA$
	2	$(GA)_6CC$
53	UBC807	$(AG)_8T$
	UBC808	$(AG)_8C$
	UBC809	$(AG)_8G$
	UBC811	$(GA)_8C$
	UBC825	$(AC)_8T$
	UBC826	$(AC)_8C$
	UBC864	$(ATG)_6$
	UBC866	$(CTC)_6$
	I2	$A(CA)_8T$
	I4	$A(CA)_8G$
55	1	$(AG)_7AAC$
	2	$(AG)_7AAG$
58	1	$(AG)_8C$
	2	$(CA)_9A$

จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วนำไปบันทึกภาพภายใต้แสง UV โดยใช้ Gel documentation (BioRad Gel Doc 2000 model S75S/01120, Bio-Rad Laboration, USA) เพื่อตรวจดูลักษณะและความคมชัดของแถบดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชแต่ละชนิดที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์

ผลการทดลองและวิจารณ์

การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชพื้นเมืองตระกูลถั่ว 4 ชนิด โดยใช้เทคนิค Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) จากการใช้ ISSR ไพรเมอร์ จำนวน 20 ชนิด พบว่า มี ISSR ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและตรวจนับได้ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ ถั่วปี

ถั่วแปบ อัญชัน และ คราม จำนวน 8, 7, 7 และ 4 ชนิด ตามลำดับ (Table 2) โดยในถั่วปี ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จำนวนแถบได้มากที่สุด คือ I4 ที่มีลำดับเบสคือ $A(CA)_8T$ (Figure 1C) โดยสังเคราะห์ได้ 18 แถบ ที่มีขนาด 150-1500 คู่เบส แต่ไพรเมอร์ที่พบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างถั่วปีทั้ง 4 หมายเลข สูงที่สุดคือ UBC826 ที่มีลำดับเบสคือ $(AC)_8C$ ซึ่งสังเคราะห์จำนวนแถบ

Table 2 Details of ISSR banding pattern of 4 indigenous Leguminosae species: *Vigna* spp., *Dolichos lablab* Linn., *Clitoria ternatea* L., and *Indigofera tinetoria* L.

	ISSR primer sequence	Range of amplicons (bp)	Total no. of bands	No. of monomorphic bands	No. of polymorphic bands	Percent of polymorphism (%)
Vigna spp.	$(AG)_7AA$	800-180	11	5	6	54.55
	$(AG)_7AAG$	1000-150	12	2	10	83.33
	$(CA)_9A$	1250-200	15	3	12	80
	$(AG)_8G$	1250-200	11	4	7	63.64
	$(AC)_8C$	800-150	10	-	10	100
	$(ATG)_6$	1250-200	9	7	2	22.22
	$(CTC)_6$	1250-150	12	5	7	58.33
	$A(CA)_8T$	1500-150	18	6	12	66.67
Dolichos	$(GA)_6CC$	1500-150	8	8	-	0
lablab Linn.	$(AG)_7AAC$	1100-290	9	9	-	0
	$(AG)_7AAG$	1100-130	8	8	-	0
	$(CA)_9A$	1250-190	9	9	-	0
	$(AG)_8G$	990-250	7	7	-	0
	$(ATG)_6$	850-190	9	9	-	0
	$A(CA)_8T$	1000-130	8	8	-	0
Clitoria	$(CAC)_3GC$	1500-200	8	8	-	0
ternatea L.	$(CA)_6GT$	1000-380	5	5	-	0
	$(GA)_6CC$	850-150	6	6	-	0
	$(AG)_7AAG$	500-250	4	4	-	0
	$(CA)_9A$	1100-200	9	9	-	0
	$(AC)_8C$	850-190	9	9	-	0
	$(ATG)_6$	800-250	8	8	-	0
Indigofera	$(AG)_7AAC$	700-200	6	6	-	0
tinetoria L.	$(AG)_8G$	900-220	5	5	-	0
	$(AC)_8C$	750-400	4	4	-	0
	$(ATG)_6$	1100-250	7	7	-	0

ได้ 10 แถบ ที่มีขนาด 150-800 คู่เบส โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic band) ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wang *et al.* (2009) และ Lu *et al.* (2011) ที่ได้รายงานว่าไพรเมอร์ UBC826 สามารถสังเคราะห์ polymorphic band ได้ 100% ในกล้วยไม้ *Dendrobium* spp. และ *Cymbidium sinense* ตามลำดับ

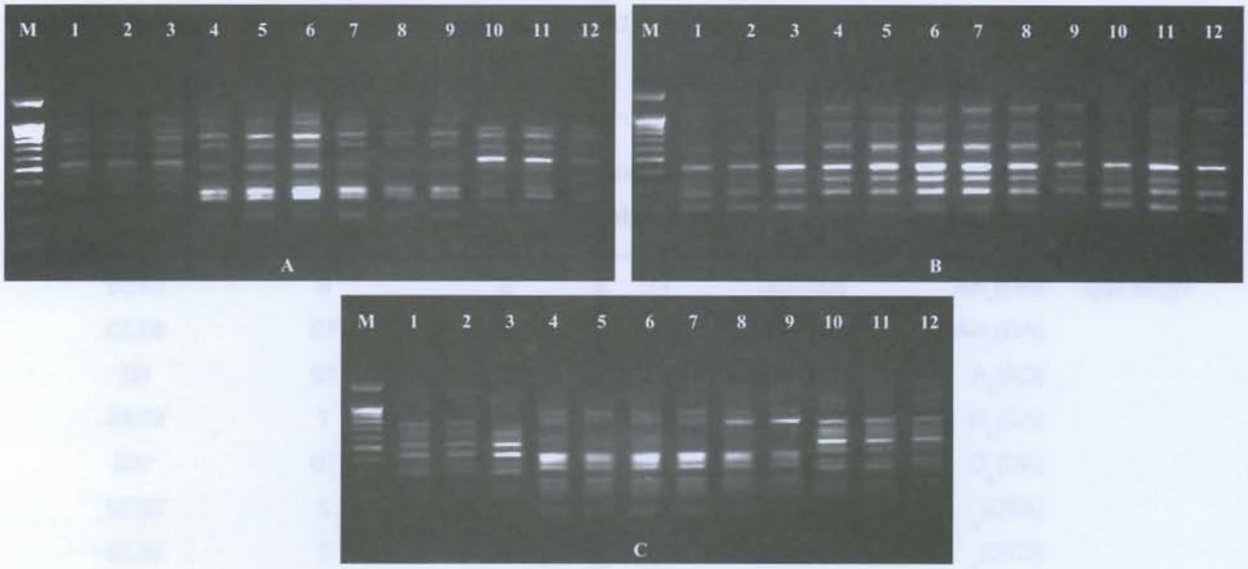

Figure 1 DNA patterns of 4 seed registeration number of *Vigna* spp.; M: 100 bp Ladder DNA marker; 1-3: R650; 4-6: R940; 7-9: R476 and 10-12: R651, synthesized from 3 ISSR primers; $(CA)_9A$ (A); $(ATG)_6$ (B) and $A(CA)_8T$. (C)

ในถั่วแปบ มีไพรเมอร์จำนวน 3 ชนิด ที่สังเคราะห์จำนวนแถบได้มากที่สุด คือ $(AG)_7$ AAC (Figure 2A), $(CA)_9A$ และ UBC864 มีลำดับเบสคือ $(ATG)_6$ (Figure 2C) โดยสังเคราะห์ได้ 9 แถบ ที่มีขนาด 290-1100 คู่เบส, 190-1250 คู่เบส และ 190-850 คู่เบส ตามลำดับ ส่วนในอัญชัน มีไพรเมอร์จำนวน 2 ชนิด ที่สังเคราะห์จำนวนแถบได้มากที่สุด คือ $(CA)_9A$ และ UBC826 โดยสังเคราะห์ได้ 9 แถบ มีขนาด 200-1100 คู่เบส และ 190-850 คู่เบส ตามลำดับ (Figure 3) สำหรับในคราม มีไพรเมอร์จำนวน 1 ชนิด ที่สังเคราะห์จำนวนแถบได้มากที่สุด คือ UBC864 โดยสังเคราะห์ได้ 7 แถบ ที่มีขนาด 250-1100 คู่เบส (Figure 4)

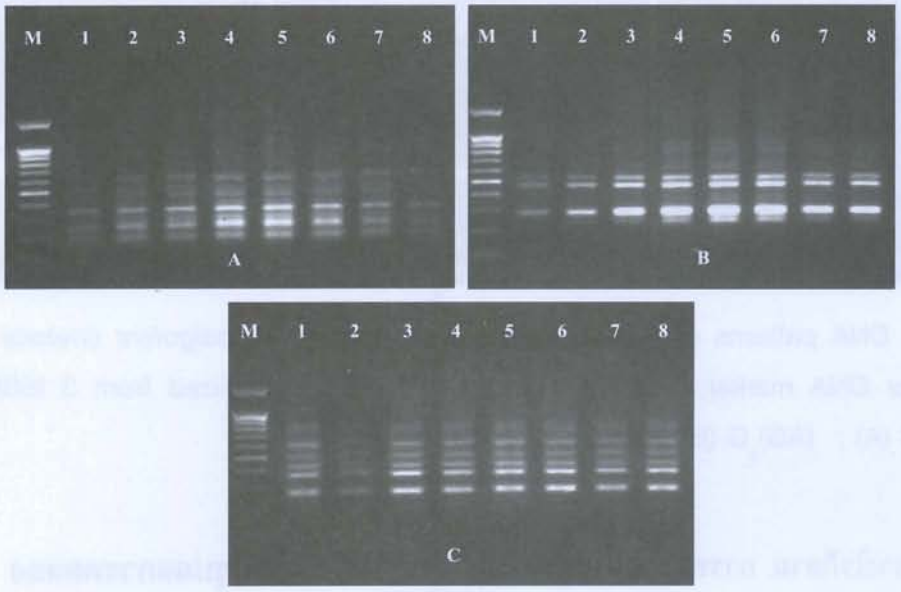

Figure 2 DNA patterns of 2 seed registeration number of *Dolichos lablab* Linn.; M: 100 bp Ladder DNA marker; 1-4: R874 and 5-8: R396, synthesized from 3 ISSR primers; $(AG)_7AAC$; (A): $(AG)_8G$ (B) and : $(ATG)_6$.(C)

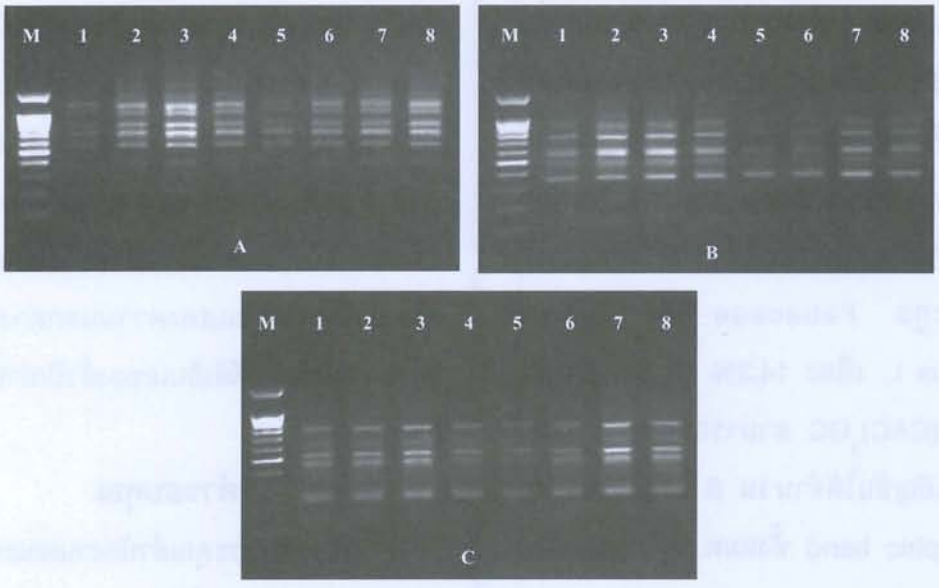

Figure 3 DNA patterns of 2 seed registeration number of *Clitoria ternatea* L.; M: 100 bp Ladder DNA marker; 1-4: R23 and 5-8: R37, synthesized from 3 ISSR primers; : $(CAC)_3GC$ (A); $(CA)_6GT$ (B) and $(GA)_6CC$. (C)

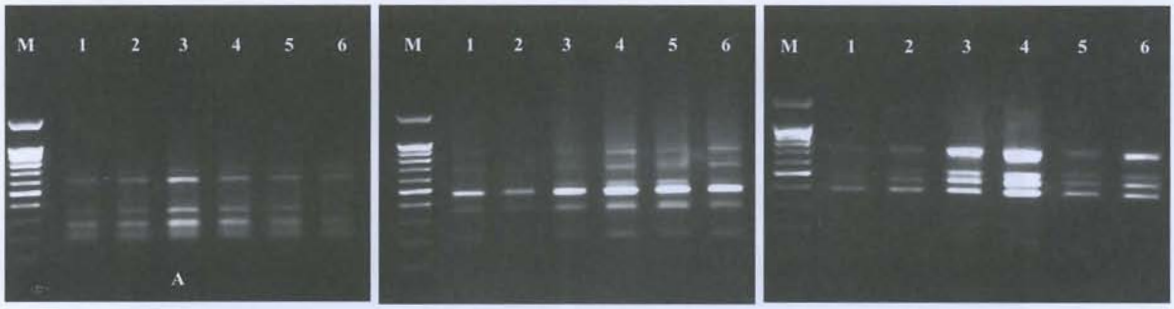

Figure 4 DNA patterns of 4 seed registeration number of *Indigofera tinetoria* L.; M: 100 bp Ladder DNA marker; 1-3: R394 and 4-6: R702, synthesized from 3 ISSR primers;: $(AG)_7$AAC (A) : $(AG)_8$G (B) and $(AC)_8$C. (C)

อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วแปบ อัญชัน และคราม ที่นำมาทดลองได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Bisoyi *et al.* (2010) ที่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในพืชตระกูล Leguminosae คือ *Sesbania* spp. จำนวน 6 ชนิด จากการใช้เทคนิค ISSR แม้จะสามารถจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ก็ตาม ส่วน Mathur *et al.* (2013) ก็พบ polymorphic band จากการใช้เทคนิค ISSR ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในพืชตระกูล Fabaceae คือ *Abrus precatorius* L. เพียง 14.3% เท่านั้น สำหรับไพรเมอร์ $(CAC)_3$GC สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอในอัญชันได้จำนวน 8 แถบ และเป็น monomorphic band ทั้งหมด ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการทดลองของ George *et al.* (2009) ที่พบว่าไพรเมอร์นี้สามารถแสดง polymorphism ในประชากรของ *Piperia yadonii* ได้ถึง 99%

สรุปผลการทดลอง

การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอพืชพื้นเมืองตระกูลถั่ว 4 ชนิด ได้แก่ ถั่วปี ถั่วแปบ อัญชัน และ คราม ที่เก็บเชื้อพันธุกรรมไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี ประเทศไทย โดยใช้เทคนิค ISSR และใช้ ISSR ไพรเมอร์ จำนวน 20 ชนิด พบว่ามี ISSR ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และตรวจนับได้ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วปี ถั่วแปบ อัญชัน และ คราม จำนวน 8, 7, 7 และ 4 ชนิด ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วปีเท่านั้น

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้สนับสนุนงบประมาณในการทำงานวิจัย และขอขอบพระคุณกลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนา

เทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์พืชทั้งหมดที่ใช้ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สุรพล แสนสุข. 2554. พืชถิ่นเดียวและพืชหายากของวงศ์ขิง-ข่าในประเทศไทย. *วารสารวิจัย มข.* 16(3): 306-330.

Bisoyi, M.K., Acharya, L., Mukherjee, A.K. and P.C. Panda. 2010. Study of inter-specific relationship in six species of *Sesbania* Scop. (Leguminosae) through RAPD and ISSR markers. *International J. of Plant Physiol. and Biotechnol.* 2(2): 11-17.

Bornet, B. and M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant molecular biology reporter* 19: 209-215.

George, S., Sharma, J. and V.L. Yadon. 2009. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *American J. of Botany* 96(1): 2022-2030.

Lu, J., Hu, X., Liu, J. and Wang, H. 2011. Genetic diversity and population structure of 151 *Cymbidium sinense* cultivars. *J. of Hort. and Fores.* 3(4): 104-114.

Mathur, P., Habibi, N., Chittora, M. and S.D. Purohit. 2013. Molecular analysis of variability among genotypes of Abrus precatorius L. with different seed coat colours using RAPD and ISSR markers. *Indian J. of Biotechnol.* 12: 273-276.

Wang, H.Z., Feng, S.G., Lu, J.J., Shi, N.N. and J.J. Liu. 2009. Phylogenetic study and molecular identification of 31 Dendrobium species using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Sci. Hort.* 122(3): 440-447.