

3. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วหรั่ง

จากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 20 คู่ พบว่ามีคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้ดีจำนวน 16 คู่ เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจากขั้นตอน selective amplification มาแยกขนาดด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel แล้วย้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท จนปรากฏเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ทั้ง 16 คู่ (ตารางที่ 13) พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ จำนวนทั้งหมด 867 แถบ โดยเฉลี่ยเท่ากับ 54 แถบดีเอ็นเอต่อคู่ไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันจำนวน 716 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลิมอร์ฟิซึมจำนวน 151 แถบ โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่าง 5 ถึง 19 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ ซึ่งเห็นได้ว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ย 12 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 17.4 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า ในสายพันธุ์ถั่วหรั่งที่นำมาวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้มีความหลากหลายไม่มากนัก เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ntundu *et al.* (2004) ซึ่งใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีเพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายในสายพันธุ์ถั่วหรั่งที่เก็บรวมได้ในประเทศ Tanzania โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ให้จำนวนโพลิมอร์ฟิซึมเพียง 4.5 เปอร์เซ็นต์จากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จึงชี้ให้เห็นว่า สายพันธุ์ถั่วหรั่งที่ใช้ในการทดสอบมีความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่มาก และสามารถนำข้อมูลความหลากหลายไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์ถั่วหรั่งต่อไปในอนาคตได้ โดยสามารถใช้เป็นแหล่งของเชื้อพันธุกรรม (germplasm) สำหรับการปลูกคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้าม สุกทัศน์ (2539) กล่าวว่า การเลือกใช้สายพันธุ์พ่อแม่หรือเชื้อพันธุกรรมนั้นมีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะดี มีฐานทางพันธุกรรมกว้าง ควรเลือกใช้สายพันธุ์พ่อแม่ที่มีความแปรปรวนสูง ทำนองเดียวกับ กฤษณา (2544) ที่กล่าวว่า การสร้างพันธุ์ลูกผสมเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง พันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ควรมีความแตกต่างทางพันธุกรรม

จากความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากเทคนิคเอเอฟแอลพี ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างที่เกิดขึ้นระหว่างสายพันธุ์ถั่วหรั่งที่นำมาทดสอบ อาจเกิดขึ้นจากการขาดหายของเบสที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น การเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของดีเอ็นเอ การเกิดตำแหน่งจดจำเพิ่มขึ้น หรือมีการจัดเรียงตัวใหม่ภายในตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ มีผลทำให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เปลี่ยนแปลงไป (Kokotovic *et al.*, 1999; Saliba *et al.*, 2000)

สำหรับการใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วหรั่ง พบว่าสามารถบอกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน แสดงถึงประสิทธิภาพของเทคนิคเอเอฟแอลพีในการตรวจสอบความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้ จึงเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยม

นิยมสูงโดยมีรายงานการศึกษาในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น การศึกษาปรสิตในสกุล *Fellomyces* (Lopandic *et al.*, 2005) เชื้อราในสกุล *Aspergillus* (Perrone *et al.*, 2006) hookworm (*Necator americanus*) (De Gruijter *et al.*, 2006) และกุ้ง (*Penaeus japonicus* Bate) (Li *et al.*, 2006) เป็นต้น

ตารางที่ 9 แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพีในดีเอ็นเอของถั่วหรั่ง (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) 40 สายพันธุ์

ไพรเมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอที่ แตกต่าง	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอที่ เหมือนกัน	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ ทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ โพลิมอร์ฟิซึม
1. E-TAC/M-CTA	5	52	57	8.77
2. E-TCG/M-CTA	5	18	23	21.74
3. E-AAA/M-GTC	8	45	53	15.09
4. E-ACA/M-TAC	8	71	79	10.13
5. E-ACC/M-TGA	8	49	57	14.04
6. E-ACT/M-GTA	8	57	65	12.31
7. E-AAA/M-ACG	9	53	62	14.52
8. E-ACT/M-GTC	9	48	57	15.79
9. E-ACT/M-TAC	9	31	40	22.5
10. E-AGG/M-GTC	9	37	46	19.57
11. E-ACC/M-GTA	10	49	59	16.95
12. E-TAC/M-CAG	10	60	70	14.29
13. E-TAC/M-AAC	11	20	31	35.48
14. E-TAC/M-CAT	11	52	63	17.46
15. E-ACT/M-TGA	12	44	56	21.43
16. E-ACC/M-AGG	19	30	49	38.76
รวม	151	716	867	

4. การวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคเอฟแอลพีด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อคำนวณค่าดัชนีความเหมือนด้วยวิธี UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) จัดกลุ่มตัวอย่างและแสดงผลในรูปของ dendrogram จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ เอฟแอลพี จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ใช้ในการคำนวณทั้งสิ้น 6,040 แถบ มีดัชนีความเหมือน (similarity index) ดังแสดงในตารางที่ 14 และ dendrogram ดังแสดงในภาพที่ 4 พบว่าที่ค่า สหสัมพันธ์ความคล้ายคลึง (similarity coefficient) 0.75 สามารถจำแนกสายพันธุ์ชั่วคราวได้เป็น 9 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ TVSu-1, TVSu-2, TVSu-4, TVSu-5 และ TVSu-6 ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.689-0.881

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 13 สายพันธุ์ และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 2A ประกอบด้วย 7 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ TVSu-11, TVSu-16, TVSu-17, TVSu-23, TVSu-25, TVSu-38 และ TVSu-13 ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.748-0.874 และกลุ่มที่ 2B ประกอบด้วย 6 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ TVSu-84, TVSu-86, TVSu-88, TVSu-89, TVSu-110 และ TVSu-129 ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.755- 0.861

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 8 สายพันธุ์และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 3A ประกอบด้วย 1 สายพันธุ์ คือ TVSu-85 และกลุ่มที่ 3B ประกอบด้วย 7 สายพันธุ์ได้แก่ TVSu-134, TVSu-141, TVSu-158, TVSu-148, TVSu-138, TVSu-142 และ TVSu-164 ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.752-0.894

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ TVSu-10 และ TVSu-165 มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.755

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ TVSu-182 และ TVSu-189 มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.801

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย 6 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ TVSu-755, TVSu-881, TVSu-913, TVSu-1596, TVSu-912 และ TVSu-922 (พันธุ์สงขลา 1) ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.745-0.858

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ TVSu-12 และ TVSu-14 มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.800

กลุ่มที่ 8 และ 9 เป็นกลุ่มที่แยกออกจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน แต่ละกลุ่มมีเพียง 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ TVSu-171 และ TVSu-170 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนภายในกลุ่ม พบว่า แต่ละกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนค่อนข้างสูง แม้ว่าจะสามารถบอกความแตกต่างของถั่วหรั่งที่นำมาทดสอบได้ แต่ค่าดัชนีความเหมือนที่สูงนี้แสดงถึงความแตกต่างภายในกลุ่มตัวอย่างที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย ในทางตรงข้ามกัน สายพันธุ์ TVSu-171 (กลุ่มที่ 8) และสายพันธุ์ TVSu-170 (กลุ่มที่ 9) แยกจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน แสดงว่าทั้งสองสายพันธุ์แตกต่างจากสายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบอย่างชัดเจน