

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

เทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยา PCR โดยอาศัยการจับของ primer แบบสุ่ม เพื่อเพิ่มขยาย DNA ให้มีปริมาณมาก จากนั้นนำ DNA ที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของ DNA ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบสู่ขั้วบวกผ่านตัวกลางคือ agarose gel ซึ่งจะสามารถแยกขนาดของ DNA ตามขนาดโมเลกุล จึงปรากฏแถบ DNA ในตำแหน่งที่ต่างกันตามขนาดความยาวโมเลกุล (อาภัสสรา, 2537; วาสนา, 2539) จากรายงานการใช้เทคนิค RAPD สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์สตรอเบอรี่ได้เช่น Hancock and Callow (1994) ทำการตรวจสอบพันธุ์สตรอเบอรี่จากโครงการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 8 สายพันธุ์โดยใช้เทคนิค RAPD ด้วยการใส่ primer ขนาด 10 mers จำนวน 43 primers พบว่ามากกว่า 60% ของ primer ที่ใช้สามารถสร้าง polymorphism band หรือ amplification profile ได้ และสามารถให้ความแตกต่างมากจนสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของสตรอเบอรี่ทั้ง 8 สายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ Chemda *et al.* (1998) ได้ใช้เทคนิค RAPD ตรวจสอบและแยกสายพันธุ์ ลูกผสมสตรอเบอรี่ 41 สายพันธุ์ที่ได้จาก *Fragaria x ananassa* ที่ปลูกในอเมริกาและแคนาดา มาหาความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอที่แสดงออกมาเป็นความแปรปรวนของขนาดโมเลกุล (Polymorphisms) โดยอาศัย primer ที่มีจำนวน base pair จำนวน 10 mers (GC > 50%) ในชุดของ 10 mer primer จะให้ fragments ที่มีขนาดต่างกัน 15 ตำแหน่ง โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) อยู่ในช่วง 450 – 1,200 bp ซึ่ง fragment ทั้ง 15 ตำแหน่งเพียงพอที่จะนำมาใช้แยกพันธุ์สตรอเบอรี่ทั้งหมดที่นำมาทดสอบ ในครั้งนี้พบว่ามี 7 primers จากทั้งหมด 10 primers สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์สตรอเบอรี่ได้จริง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ primer 4 ชนิดคือ A13, B07, B14 และ C06 ซึ่งการเลือกใช้ primers 4 ชนิดนี้ ได้ข้อมูลเบื้องต้นมากจากการทดลองของ ทศพร (2545) ใช้ primers เหล่านี้จัดจำแนกความสัมพันธ์ของลูกผสมสตรอเบอรี่พันธุ์ต่างๆ พบว่าสามารถทำปฏิกิริยา PCR ได้ และให้ PCR product ได้ดี เกิด polymorphic band มาก การทดลองนี้ได้นำมาใช้ทดลองต่อ โดยมีการศึกษา การใช้ primers เหล่านี้ 3 แบบ คือ ใช้ single primers ใช้ combination primers 2 primers และ combination primers 3 primers ทั้งนี้ ในการใช้การรวมกันของ primers เพื่อต้องการดูความสามารถในการจัดจำแนกสายพันธุ์สตรอเบอรี่ ได้แตกต่างกันอย่างไร

จากการทดลอง พบว่าการใช้ single primer ทุก primer สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา PCR ได้ทุก primer และสามารถจำแนกพันธุ์สตรอเบอร์รี่ได้ ยกเว้น primer A13 ที่ไม่สามารถแยกพันธุ์ป่าผลสีแดงและพันธุ์ป่าผลสีเหลืองออกจากกันได้ แต่สามารถใช้จำแนกพันธุ์การค้า ทั้ง 8 สายพันธุ์ออกจากกันได้ ดังนั้นการใช้ primer เพียงชนิดเดียว จึงไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ของพันธุ์ได้ เนื่องจากไม่สามารถแยกพันธุ์ที่ใกล้ชิดกันมากๆ ได้ แต่ถ้าหากใช้ primers ร่วมกัน จะสามารถจำแนกพันธุ์ได้ดีขึ้น ดังจะเห็นข้อมูลจากการใช้ข้อมูลของ primers ทั้ง 4 รวมการวิเคราะห์ข้อมูลครั้งเดียว จะสามารถแยกพันธุ์ป่าผลสีแดง และพันธุ์ป่าผลสีเหลืองออกได้

การใช้ combination 2 primers สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา PCR ได้ทุก combination และทำให้เกิด polymorphic band ได้และเมื่อพิจารณาจากแต่ละ combination แล้วจะพบว่า combination ระหว่าง primer CO6 กับ A13 สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์สตรอเบอร์รี่ทั้ง 10 สายพันธุ์ออกเป็นกลุ่มๆ ได้ตามแหล่งกำเนิด คือ กลุ่มที่ 1 พันธุ์ป่าสีแดง และพันธุ์ป่าสีเหลือง ซึ่งมีถิ่นกำเนิดมาจากแถบเทือกเขาเอลป์ กลุ่มที่ 2 Cramarosa (Chemda *et al.*, 1998) พันธุ์พระราชทาน 50 ซึ่งมีถิ่นกำเนิดจากสหรัฐอเมริกา กลุ่มที่ 3 Selva และ Tioga มีถิ่นกำเนิดจากสหรัฐอเมริกา (Chemda *et al.*, 1998) กลุ่มที่ 4 Nyoho และ Toyonoka มีถิ่นกำเนิดจากญี่ปุ่น (ชูพงษ์, 2536) กลุ่มที่ 5 Seascape มีถิ่นกำเนิดจากสหรัฐอเมริกา (Chemda *et al.*, 1998) กลุ่มที่ 6 Questa มีถิ่นกำเนิดจากสหรัฐอเมริกา (Chemda *et al.*, 1998)

การใช้ combination 3 primers สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา PCR ได้ทุก combination และทำให้เกิด polymorphic band ได้และในการวิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยใช้ โปรแกรม Bio Profile[®] Image Analysis Software เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ โดยใช้ค่า Nei and Li (Dice)'s coefficient similarity และ Jaccard's coefficient similarity การใช้ค่า Nei and Li (Dice)'s coefficient similarity จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันสูงกว่าการใช้ค่าของ Jaccard's coefficient similarity

เมื่อสังเกต แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองพบว่า การใช้ single primer จะได้ ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 500 bp ถึง 2,800 bp และ การใช้ combination primers 2 ชนิด จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ น้อยกว่า 100 bp ไปจนถึง 2,600 bp และ การใช้ primers 3 ชนิด จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 100 bp ไปจนถึง 2,700 bp จากผลดังกล่าว การใช้ combination primers จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลหลากหลายกว่า การใช้ primer เพียงชนิดเดียว ตามหลักการของเทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยา PCR โดยอาศัยการจับของ primers แบบสุ่มกับดีเอ็นเอต้นแบบ ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีปริมาณมาก เช่นเดียวกัน ขบวนการ DNA replication ภายในเซลล์ จากนั้นนำ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมาแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) และนำแผ่น

gcl มาตรวจสอบความแตกต่างของแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (วัชร และมนตรี, 2536) ดังนั้นน่าจะอธิบายได้ว่า การใช้ combination primers 2 primers และ 3 primers เข้าทำปฏิกิริยา PCR จะเป็นการเพิ่มโอกาสให้ primers สุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ได้มากยิ่งขึ้น และถี่ยิ่งขึ้น ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอ มีช่วงขนาดโมเลกุลกว้างกว่าการใช้ primer ชนิดเดียวเข้าทำปฏิกิริยา

สำหรับความสัมพันธ์ที่ได้จาก Dendrogram ทุกภาพจะเห็นว่า สตรอเบอรี่พันธุ์ป่าทั้งสองชนิดจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันอย่างมาก เนื่องจากสตรอเบอรี่พันธุ์ป่าผลสีเหลืองได้กลายพันธุ์มาจากสตรอเบอรี่พันธุ์ป่าผลสีแดง (วิมาน ศรีเพ็ญ ติดต่อบุคคล) แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจึงมีลักษณะคล้ายกันมากมีเพียงบางแถบเท่านั้นที่แตกต่างกัน และมีลักษณะเป็นเอกลักษณ์ ต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสตรอเบอรี่อื่นๆ อีก 8 สายพันธุ์ การกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอของสตรอเบอรี่พันธุ์การค้า 8 สายพันธุ์ จะมีมากกว่า และมีจำนวนแถบมากกว่า เมื่อเทียบกับพันธุ์ป่าทั้งสองพันธุ์ ตรงกับข้อมูลทางเซลล์พันธุศาสตร์ของสตรอเบอรี่ คือ สตรอเบอรี่พันธุ์การค้าชนิดต่างๆ จะมีจำนวนโครโมโซม 8 ชุด (Octoploid : $2n = 8x = 56$) (ชูพงษ์, 2531) และพันธุ์ป่ามีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด (diploid : $2n = 2x = 14$) (ณรงค์ชัย, 2543)