# ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพาราจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *caffeate O-methyl-transferase*

# DNA Fingerprint of the Para Rubber Trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) Based on Partial Sequences of the *Caffeate O-Methyl-Transferase* Gene

**นิจรดา ย๊ะหมื่น และ ชูตา บุญภักดี***

Nitrada Yameun and Chuta Boonphakdee*

*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131*

*Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131*

**Corresponding author: chuta@buu.ac.th*

**บทคัดย่อ**

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย การคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์ยางพาราโดยวิธีการปลูกและติดตามผลในแปลงปลูกต้องใช้ระยะเวลานาน รวมทั้งการระบุสายพันธุ์จากลักษณะสัณฐานวิทยาจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ ในการศึกษาครั้งนี้หาลำดับ นิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *COMT* (*Caffeate O-Methyl-Transferase*) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อไม้ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพาราจำนวน 10 สายพันธุ์ คือ 1) PB 260, 2) RRIT 408, 3) RRIT 226, 4) PB 235, 5) BPM 24, 6) RRIM 600, 7) ฉะเชิงเทรา 50, 8) บางปิด, 9) PB 255 และ 10) สงขลา 36 ผลการเพิ่มจำนวนในบางส่วนของยีน *COMT* พบว่าผลผลิต PCR ของยางพาราแต่ละสายพันธุ์มีขนาด 1,569-1,573 คู่เบส เมื่อโคลนและอ่านลำดับเบสสามารถคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ 4 ชนิด คือ *Ban*I, *Bbs*I, *Btg*ZI and *Msp*I ปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งหมด 8 รูปแบบ คือ รูปแบบ A, B, C, D, E, F, G และ H โดยรูปแบบ E ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างยางพาราสายพันธุ์ PB 235, PB 255 และ PB 260 ได้

ABSTRACT

The Para rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) is an economically important plant of Thailand. Selective breeding of this species needs to monitor in the plantation crop where time is consuming. Moreover, the morphological characterization to identify the rubber tree variety requires specialists. In this study, the partial sequencing of *COMT* (*Caffeate O-Methyl-Transferase*) gene involved in lignin synthesis, an important component of wood, was undertaken. The PCR (Polymerase Chain Reaction) and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) techniques were used to generate DNA fingerprinting of 10 cultivars of the rubber tree;1) PB 260, 2) RRIT 408, 3) RRIT 226, 4) PB 235, 5) BPM 24, 6) RRIM 600, 7) CHACHOENGSAO (CCO) 50, 8) BANGPID (BP), 9) PB 255 and 10) SONGKHLA (SKA)36. The result showed that the *COMT* amplified fragments of each rubber tree sample varied from 1,569 to 1,573 bp in length. The cloned *COMT* amplicons were sequenced and 4 restriction enzymes (*Ban*I, *Bbs*I, *Btg*ZI and *Msp*I) were subsequently selected. Eight different endonuclease digest patterns (A, B, C, D, E, F, G and H) were able to discriminate among those varieties. However, DNA pattern E was not able to distinguish between the rubber tree cultivars PB 235, PB 255 and PB 260.

**คำสำคัญ**: ยางพารา, *caffeate O-methyl-transferase*, DNA fingerprint, PCR-RFLP

**Keywords**: rubber tree, *caffeate O-methyl-transferase,* DNA fingerprint, PCR-RFLP

## บทนำ

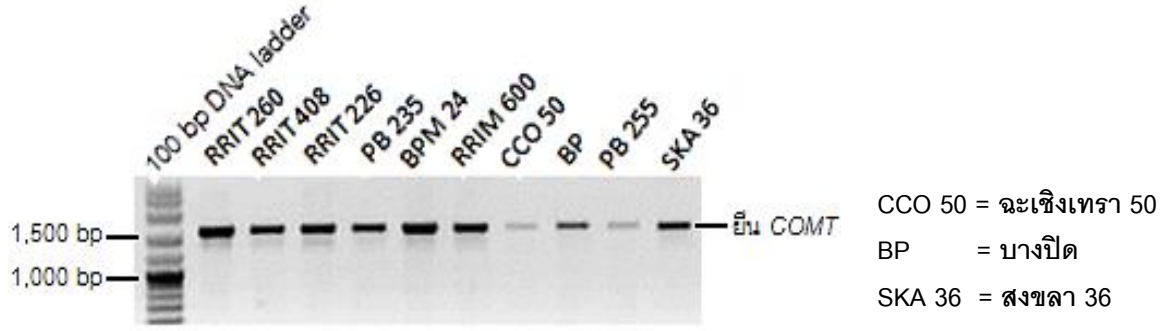
ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทำรายได้เข้าประเทศปีละมากกว่าสองแสนล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547) ในการปรับปรุงพันธุ์ยางพารามีการดำเนินการมาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการคัดเลือกพ่อ-แม่พันธุ์ในปัจจุบันมักพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาและต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญดังนั้นเทคนิคทางชีวเชิงโมเลกุลจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชแล้วหลายชนิด (งามชื่น รันตดิลก,2536; Kress*et al*., 2012) โดยเฉพาะการศึกษาถึงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจัดทำเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีเอกลักษณ์ของแต่ละสายพันธุ์ซึ่งสามารถคัดเลือกสายพันธุ์และนำไปพัฒนาปรับปรุงได้ถูกต้องและรวดเร็วยิ่งขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพาราจากส่วนของยีน *COMT* (*Caffeate O-Methyl-Transferase*) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) ที่สามารถทำการทดลองซ้ำได้ง่ายและมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีชีวเชิงโมเลกุลอื่นๆ

## อุปกรณ์และวิธีการ

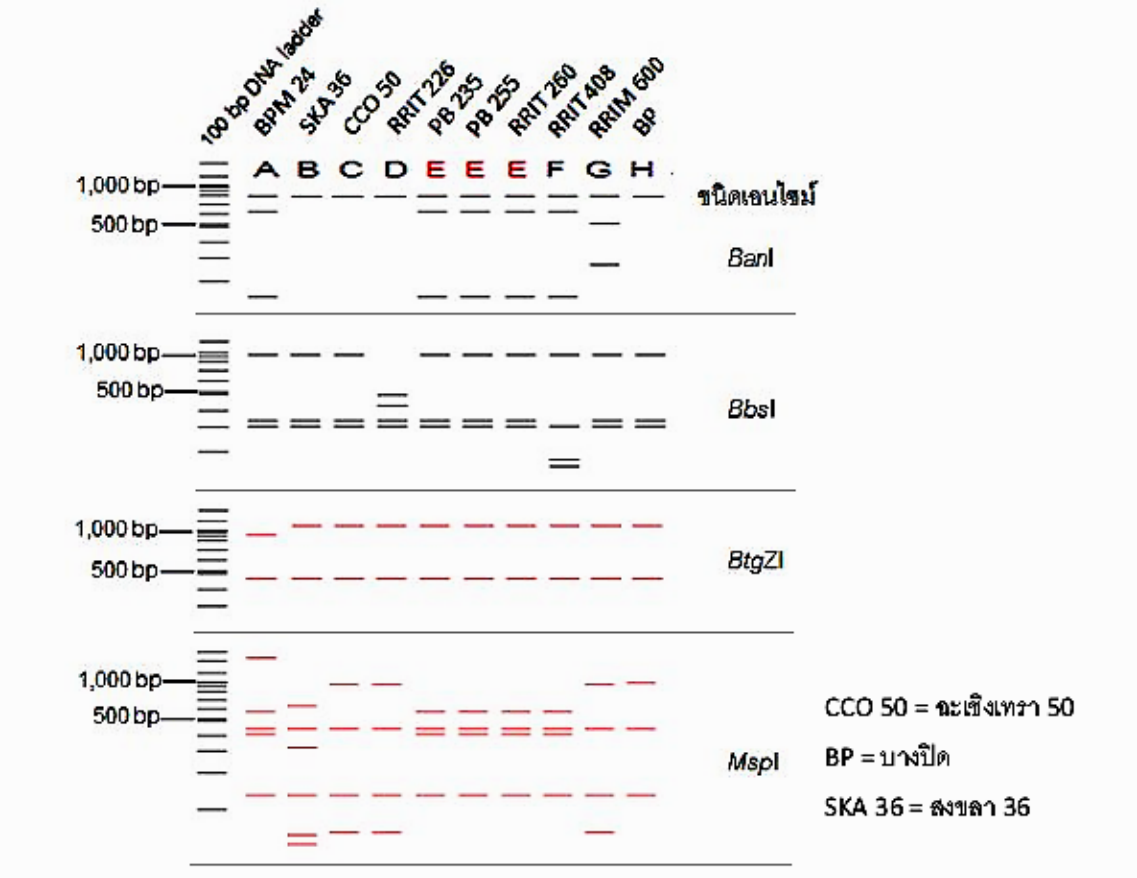
นำตัวอย่างใบอ่อนของยางพาราจากศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทราจำนวน 10 สายพันธุ์ คือ PB 260, RRIT 408, RRIT 226, PB 235, BPM 24, RRIM 600, ฉะเชิงเทรา 50 (CCO 50), บางปิด (BP), PB 255 และ สงขลา 36 (SKA 36) มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด SP Plant DNA Kit ตามวิธีของบริษัท Omega Bio-Tek (USA) แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *COMT* ด้วยเทคนิค PCR โดยมีขั้นตอน pre-denaturation ที่ 94ºC, 2 นาที denaturation ที่ 94ºC, 45 วินาที annealing ที่ 52ºC, 30 วินาที extention ที่ 72ºC, 90 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extention ที่ 72ºC, 7 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ใน TBE buffer ทำอิเล็กโทรโฟริซีสที่ความต่างศักย์100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที บันทึกภาพภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แล้วอ่านลำดับเบสจากพลาสมิดสายผสมผ่านวิธีการโคลนโดยใช้พลาสมิด pGEM®-T easy vector (promega, USA)

## ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลผลิต PCR ในส่วนของยีน *COMT* ของยางพาราแต่ละสายพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนได้มีขนาด1,561-1,573 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์ สามารถคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดผลผลิต PCR แล้วปรากฏชิ้นดีเอ็นเอย่อยที่แตกต่างกันได้ 4 ชนิด คือ *Ban*I, *Bbs*I, *Btg*ZI และ *Msp*I โดยปรากฏรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมด 8 รูปแบบ ที่เป็นเอกลักษณ์สำหรับยางพารา 7 สายพันธุ์ คือ รูปแบบ A, B, C, D, F, G และ H ในสายพันธุ์ BPM 24, RRIT 226, RRIT 408, RRIM 600, สงขลา 36, ฉะเชิงเทรา 50 และบางปิด ตามลำดับ โดยรูปแบบ E ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างยางพารา 3 สายพันธุ์ คือ PB 235, PB 255 และ PB 260 ออกจากกันได้ (รูปที่ 2) เมื่อวิเคราะห์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้มาจากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COMT* ที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.0006 (ไม่ได้แสดงในผลการทดลอง) ในยางพาราสายพันธุ์ PB 235, PB 255 และ PB 260 ทั้งนี้เป็นเพราะทั้งสามสายพันธุ์นี้มีแม่พันธุ์ PB 5/51 เดียวกัน ดังนั้นการที่จะสร้างลายพิมพ์เอกลักษณ์ของยางพาราในสายพันธุ์ทั้งสามนี้ควรต้องพิจารณาเลือกยีนหรือบริเวณอื่นที่มีความแปรปรวนมากกว่ายีน *COMT* เช่นยีนบนคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ *trnH-psbA*, *rbcL* และ *matK* และบริเวณ ITS (internal transcribed spacer) ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอที่มีรายงานการศึกษาแล้วในพืชบกหลายชนิด (Shneer, 2009; Fazekas *et al*., 2012) เป็นต้น




**รูปที่** 1 ผลผลิต PCR ในส่วนของยีน *COMT* ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ของยางพารา 10 สายพันธุ์ ตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสที่เจลความเข้มข้น 0.8% ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)




**รูปที่** 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพารา 10 สายพันธุ์ ในส่วนของยีน *COMT* ที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ตัดด้วยเอนไซม์ *Ban*I, *Bbs*I, *Btg*ZI และ *Msp*I หลังทำอิเล็กโทรโฟริซีส บนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

## สรุปผลการทดลอง

สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพาราจำนวน 10 สายพันธุ์ จากส่วนของยีน *COMT* โดยเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ขนาด 1,569-1,573 คู่เบส และตัดด้วยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิดคือ *Ban*I, *Bbs*I, *Btg*ZI และ *Msp*I ปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างทั้งหมด 8 รูปแบบ ที่สามารถระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราได้จำนวน 7 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ BPM 24, RRIT 226, RRIT 408, RRIM 600, สงขลา 36, ฉะเชิงเทรา 50 และบางปิด แต่ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างยางพาราสายพันธุ์ PB 235, PB 255 และ PB 260 ออกจากกันได้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทราที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ยางพาราในการวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

งามชื่น รัตนดิลก. เทคนิคการใช้ดัชนีในการเลือกคัดพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอโมเลกุล RFLP markers ในฝ้าย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2536;36,153-159.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. สถานการณ์ยางพารา ปี 2547. 2547. วันที่ค้นข้อมูล 27 ธันวาคม 2555, เข้าถึงได้จาก http://www.oae.go.th/news/newsDetails.php.

Fazekas AJ, Kuzmina ML, Newmaster SG, Hollongsworth PM. DNA barcoding methods for land plants. Methods Mol Bio. 2012; 858: 223-52.

Kress JW, Ida CL, David LE. DNA barcoding methods for land plants. Methods Mol Biol. 2012;858:441-58.

Shneer VS. DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants. *Genetika*. 2009;45(11):1436-48.