ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันฝรั่ง13สายพันธุ์โดยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD

RAPD Fingerprinting of 13 Potato Clones by Random Amplified Polymorphic DNA Markers

ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์[1*] และ เรือนแก้ว ประพฤติ[2]

Siriporn Pongsupasamit[1*] and Reunkeaw Praprute[2]

Abstract

DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers was employed to identify genetic diversity of 13 potato clones/cvs namely AT179, AT192, AT431, KB154, KB165, KB211, SP51, RB80 1008, Atlantic Kennebec, Russet Burbank and Spunta. Seven out of 20 primers namely OPN-03, OPN-05, OPN-07, OPN-12, OPN-13, OPN-14 and OPN-15 were found to amplify DNA fragments of 13 potato cultivars. A total of 102 bands were amplified of which 88 bands were polymorphic and able to distinguish 13 potato clones from each other. However, only 3 primers namely OPN -03, OPN-15 and OPN-07 were appropriate to use 13 potato clones for clearly distinguish.

Keywords: potato, DNA finger printing, RAPD markers

บทคัดย่อ

ทำการจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันฝรั่ง 13 สายพันธุ์ประกอบด้วย สายพันธุ์ AT192, AT431, KB154, KB211, AT179, KB154, KB165, SP51, RB801008, Atlantic, Kennebec, Russet, Burbank และ Spunta โดยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD (Random amplified polymorphic DNA markers) ซึ่งพบว่า มี 7 ไพรเมอร์จาก 20 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPN-03, OPN-05, OPN-07, OPN-12, OPN-13, OPN1-4 และ OPN-15 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันฝรั่งทั้ง 13 สายพันธุ์ โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 102 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 88 แถบซึ่งเพียงพอในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันฝรั่งทั้ง 13 สายพันธุ์แต่สามารถใช้เพียง 3 ไพรเมอร์ คือ OPN-03, OPN-05 และ OPN-07 ในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันฝรั่งทั้ง 13 สายพันธุ์ออกจากกัน

---

[1] คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สันทราย เชียงใหม่ 50290
Faculty of Agric. Prod. Mae Jo University, Chiangmai 50290

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290
Biotechnology Center , Mae Jo University, Chiangmai 50290

รับเรื่อง : สิงหาคม 2557

* Corresponding Author : sirisamit@gmail.com

คำนำ

มันฝรั่งเป็นพืชที่ปลูกกันมากในเขตภาคเหนือและภาคอีสานของประเทศไทย ปัจจัยหลักที่สำคัญในการผลิตมันฝรั่งของประเทศไทยประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ 1) หัวพันธุ์ 2) พันธุ์ปลูก เมื่อพิจารณาถึงปัญหาของหัวพันธุ์พบว่า หัวพันธุ์เกือบทั้งหมดต้องนำเข้าจากต่างประเทศทุกปีตามระบบโควตาที่ได้รับ เนื่องจากประเทศไทยยังไม่มีระบบการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง ให้เพียงพอต่อความต้องการ จึงมีการนำเข้าหัวพันธุ์จากต่างประเทศ เช่น ประเทศแคนาดาและออสเตรเลียเป็นประจำทุกปี โดยเกษตรกรจะซื้อหัวพันธุ์จากบริษัทในราคากิโลกรัมละ 35 บาทจากที่บริษัทนำเข้ามาราคากิโลกรัมละ 25 บาท [DOAE, 2010] ในปี พ.ศ.2555-2557 สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตรได้สำรวจการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งพันธุ์โรงงานพบว่ามีปริมาณรวมเท่ากับ 4,385.28 ตัน และหัวพันธุ์มันฝรั่งพันธุ์บริโภคปริมาณรวมเท่ากับ 237.70 ตัน (OAE, 2013) สำหรับแนวทางแก้ไขทางด้านหัวพันธุ์มันฝรั่งสามารถทำได้ โดยการพัฒนารูปแบบการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งแบบบูรณาการเพื่อการพาณิชย์ขึ้นมาใช้เอง ภายในประเทศ โดยต้องมีการประสานงานเพื่อสร้างความร่วมมือในการนำเทคโนโลยี ในการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งทุกๆ แบบที่ได้วิจัยทดลองสำเร็จแล้ว จากหน่วยงานทั้งภาครัฐ เอกชน และเกษตรกรผู้ปลูกมันฝรั่งชำนาญการของประเทศไทยไปสู่ขั้นตอนภาคปฏิบัติอย่างครบวงจร

ปัญหาทางด้านพันธุ์ปลูกของมันฝรั่ง พบว่า พันธุ์ปลูกเพื่อการค้ามี 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ Atlantic และพันธุ์ Kennebec สำหรับส่งโรงงานแปรรูป ทั้งสองพันธุ์มีต้นกำเนิดในประเทศสหรัฐอเมริกา (Thornton and Sieczka, 1980) และพันธุ์ Spunta สำหรับบริโภคสดเป็นพันธุ์นำเข้าจากประเทศฮอลแลนด์ ทั้ง 3 พันธุ์ล้วนเป็นพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศมานานกว่า 20 ปี แม้ว่ากลุ่มสหกรณ์ฯและบริษัทฯจะนำพันธุ์ใหม่ๆ เข้ามาทดลองปลูกเพิ่มขึ้น ปัญหาเหล่านี้ก็จะไม่ถูกแก้ไข เพราะประเทศไทยก็ยังคงต้องสั่งซื้อหัวพันธุ์ของพันธุ์นั้น ๆ เข้ามาปลูกเหมือนเดิมเนื่องจากหัวพันธุ์มันฝรั่งไม่สามารถนำไปปลูกแล้วเก็บผลผลิตบางส่วนไว้ใช้ปลูกในฤดูถัดไป ได้เหมือนพืชอื่นที่ขยายพันธุ์โดยเมล็ดได้ เช่น ข้าว ถั่วเหลือง ฯ แนวทางแก้ไขที่ดีที่สุดคือ การสร้างพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูง คุณภาพดี และเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยขึ้นมาเองจากต้นพันธุ์ปลอดโรคที่มีอยู่ และเมื่อได้พันธุ์ใหม่ที่ปรับปรุงหรือสร้างได้แล้วก็สามารถนำต้นพันธุ์ปลอดโรคที่เก็บรักษาไว้ในสภาพปลอดเชื้อออกมาผลิตเป็นหัวพันธุ์เพื่อใช้ปลูกเป็นการค้าได้ตลอดไป ซึ่งหัวพันธุ์ที่สั่งนำเข้าจากต่างประเทศ เช่น ออสเตรเลีย และ สหรัฐอเมริกา เนเธอร์แลนด์ ทุกประเทศมีโปรแกรมการผลิตหัวพันธุ์ที่เริ่มต้นจากต้นพันธุ์ปลอดเชื้อ ที่เก็บรักษาไว้เช่นกัน (Loatherdpong and Dananan, 1985) ซึ่งวิธีการและขั้นตอนต่างๆ ในโปรแกรมการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งได้มีการศึกษาวิจัยแล้ว และสามารถทำได้ในประเทศไทย (Pongsupasamit, 1991; Pongsupasamit and Pongsupasamit, 1999, 2001) สิ่งที่ควรดำเนินการต่อไปคือการนำเอาเทคโนโลยีต่างๆ ที่มีอยู่เหล่านั้นไปสู่การปฏิบัติได้จริงในเชิงพาณิชย์ในประเทศไทย

การจำแนกพันธุ์พืชและจัดกลุ่มพันธุ์พืช โดยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD ได้มีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น หอม (Wilkie *et al*., 1993) ข้าว (Ray *et al*., 2001) ถั่วเหลือง (Li and Nelson, 2002) ถั่วลิสง (Pongsupasamit *et al*., 2008) และมันฝรั่ง (Denmeke *et al*., 1996; McGregor *et al*., 2000; Chakrabarti *et al*., 2001) การเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันฝรั่งพันธุ์ปลูกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD ได้มีรายงานจากผู้วิจัยหลายกลุ่มโดย McGregor *et al.* (2000) ได้ใช้ ไพรเมอร์แบบสุ่ม 21 ไพรเมอร์ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันฝรั่งพันธุ์ปลูก 39 พันธุ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD และพบว่า ไพรเมอร์ OPH-10 สามารถแยกความแตกต่างของจีโนไทป์มันฝรั่งได้ถึง 38 พันธุ์ และ Chakrabarti *et al.* (2001) ได้ใช้ ไพรเมอร์แบบสุ่ม 10 ไพรเมอร์ในการจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันฝรั่งพันธุ์ปลูก 20 พันธุ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD และพบว่ามี 5 ไพรเมอร์ได้แก่ OPA-03, OPB-04, 0PC-03, 0PC-04 และ 0PE-20 ที่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันฝรั่งทั้ง 20 พันธุ์ได้

ในการทดลองครั้งนี้ได้นำมันฝรั่งสายพันธุ์ใหม่ 4 สายพันธุ์ไปจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD เพื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เดิมที่ใช้สร้างประชากรโซมาโคลนและสายพันธุ์โซมาโคลนอื่นอีก 9 สายพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

สำหรับการทดลองวิจัยในครั้งนี้ได้นำหัวพันธุ์ชั่วที่ 2 (G2) ของสายพันธุ์โซมาโคลนที่คัดเลือกได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์มันฝรั่งเพื่อการแปรรูปโดยวิธี somacloning (Pongsupasamit, 1995) ซึ่งเริ่มต้นจากการสร้างประชากรโซมาโคลนชั่วที่ 1 (SC_1) จากมันฝรั่ง 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ Atlantic พันธุ์ Kennebec พันธุ์ Russet Burbank และพันธุ์ Spunta ซึ่ง 3 พันธุ์แรกเป็นพันธุ์แปรรูปส่งโรงงานทำมันฝรั่งแผ่น (chip) และมันฝรั่งแท่ง (french-fry) ส่วนพันธุ์ Spunta เป็นพันธุ์สำหรับบริโภคสด (Pongsupasamit, 1995) และได้ดำเนินการวิจัยทดลองโดยลำดับในชั่วที่ 1 (SC_1) (Pongsupasamit *et al.,* 2002) และชั่วที่ 2 ถึงชั่วที่ 7 ในชั่วที่ 7 ได้คัดเลือกสายพันธุ์โซมาโคลนที่ดีกว่าพันธุ์เดิมได้ 10 โซมาโคลน (Pong supasamit and Pongsupasamit, 1998, 1999) ซึ่งทางโครงการฯได้ทำการตัดขยายต้นพืชปลอดโรคของทั้ง 10 โซมาโคลนรวบรวมไว้ในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 จนถึง พ ศ 2553 โดยทำการเปลี่ยนอาหารปีละหนึ่งครั้งเพื่อเก็บรักษาสายพันธุ์ต่อมาในปี พ.ศ. 2554-2556 ทางโครงการปรับปรุงพันธุ์มันฝรั่ง เพื่อการแปรรูปในเชิงพาณิชย์ได้ทำการผลิตหัวพันธุ์ชั่วที่หนึ่ง (G1) จากต้นพืชปักชำปลอดโรคของมันฝรั่ง 12 สายพันธุ์ ประกอบด้วย สายพันธุ์โซมาโคลน 9 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ AT18, AT179, AT192, AT431, KB154, KB165, KB211, SP51 และ RB80 และ พันธุ์การค้า 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ Atlantic, Kennebec และ Russet Burbank ในโรงเรือนทดลอง โดยใช้ต้นพืชปลอดเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นต้นแม่ ในการผลิตต้นปักชำของแต่ละสายพันธุ์และได้นำหัวพันธุ์ชั่วที่ 1 ที่ผลิตได้ ไปปลูกขยายและทดสอบผลผลิตซ้ำอีกครั้งในสภาพไร่เพื่อผลิตหัวพันธุ์ชั่วที่ 2 (G2) พบว่า มี 4 สายพันธุ์โซมาโคลน ได้แก่สายพันธุ์ AT192, AT431, KB154 และ KB 211 ที่ผ่านการคัดเลือกเป็นสายพันธุ์ใหม่ (Pongsupasamit and Pongsupasamit, 2012, 2013 ;Pongsupasamit and Praprute,2014) ซึ่งสายพันธุ์ใหม่ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ต้องทำการพิสูจน์ว่าเป็นพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างแท้จริงกับพันธุ์เดิมที่ใช้สร้างประชากรโซมาโคลน ดังนั้นการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อใช้ประกอบในการแนะนำและส่งเสริมสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้

มันฝรั่ง 13 สายพันธุ์(พันธุ์)ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ประกอบด้วย พันธุ์การค้าที่ใช้ในการสร้างโซมาโคลน 4 พันธุ์ ได้แก่ 1) พันธุ์ Atlantic 2) พันธุ์ Spunta 3) พันธุ์ Kennebec และ 4) พันธุ์ Russet Burbank สายพันธุ์นำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย 1 พันธุ์ คือ 1) พันธุ์ 1008 และสายพันธุ์โซมาโคลนที่ได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์มันฝรั่งเพื่อการแปรรูปในเชิงพาณิชย์โดยPongsupasamit *et al.* (2012, 2013)จำนวน 8 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ 1)KB211 2)KB154 3) AT192 4) AT431 และ สายพันธุ์โซมาโคลนอื่นอีก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ 1)KB165 2) AT179 3)SP 51 และ 4)RB 80

การจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD

<u>การสกัดจีโนมิก ดีเอ็นเอ</u>

เพาะหัวพันธุ์มันฝรั่ง 13 สายพันธุ์ในกระถางบรรจุทรายที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อในโรงเรือนกันแมลง เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 2 สัปดาห์ เก็บใบอ่อนของแต่ละสายพันธุ์แยกกันแล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยประยุกต์วิธีจาก Doyle and Doyle (1987) ดังนี้

บดใบอ่อนมันฝรั่งในโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียดเป็นผงแยกแต่ละตัวอย่าง นำผงละเอียดน้ำหนักประมาณ 70-100 มิลลิกรัมใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 2 X CTAB (2% cetyltrimethy ammonium bromide,1.4 M NaCl, 100 mM Tris HCL pH 8.0 , 1% PVP) buffer จำนวน 700 ไมโครลิตร เติม

proteinase K14 ไมโครลิตรและ mercaptoethanol 14 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดที่ได้ไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีนาน 2 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่เติม ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1 v/v) 700 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็น suspension 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบน 500 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่เติมคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1 v/v) ปริมาตร 500ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ดูดเก็บสารละลายส่วนบน 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม 10% CTAB (ใน 0.7 M NaCl) 50 ไมโครลิตรเขย่าผสมให้เข้ากัน เติมคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1 v/v) 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นาน 2 นาทีนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ใช้เวลา 5 นาที ดูดเก็บสารละลายชั้นบน 300 ไมโครลิตร เติมไอโซพรอบพานอล 300 ไมโครลิตรนำไปบ่มที่ –20 °ซ นาน 30 นาที นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 8 นาทีเทส่วนของเหลวทิ้ง เหลือตะกอนดีเอ็นเออยู่ก้นหลอด ปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติม 70% เอทานอล 1 มิลลิลิตร นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 8 นาที ปั่นล้างครั้งที่ 2 ด้วย 90% เอทานอล 1 มิลลิลิตรดูดสารละลายออกให้มากที่สุด เหลือตะกอนดีเอ็นเอ เปิดฝาหลอดไว้ประมาณ 10-15 นาที เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง เติม TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)ลงไปหลอดละ 50-80 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอเติม RNase (10mg/ml) 5 ไมโครลิตรต่อหลอด นำหลอดไปบ่มที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบคุณภาพโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสใน 0.8% อกาโรสเจลที่ความต่างศักย์ 50 โวลท์ นาน 30 นาที แล้วย้อมด้วย 10µg/mlethidium bromide 10 นาที ส่องดูด้วย UV transluminator และบันทึกภาพ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันฝรั่งโดยเทคนิคพีซีอาร์

ใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 20 หมายเลข ได้แก่ OPN-01 (CTCACGTTGG)OPN-02 (ACCAGGGGCA) OPN-03(GGTACTCCCC) OPN-04 (GACCGACCCA) OPN-05 (ACTGAACGCC) OPN-06 (GAGACGCACA) OPN-07 (CAGCCCAGAG) OPN-08 (ACCTCAGCTC) OPN-09 (TGCCGGCTTG) OPN-10 (ACAACTGGGG) OPN-11 (TCGCCGCAAA) OPN-12 (CACAGACACC) OPN-13 (AGCGTCACTC) OPN-14 (TCGTGCGGGT) OPN-15 (CAGCGACTGT) OPN-16 (AAGCGACCTG) OPN-17 (CATTGGGGAG) OPN-18(GGTGAGGTCA) OPN-19 (GTCCGTACTG)และ OPN-20 (GGTGCTCCGT) กับสารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (ตารางที่ 1)

นำหลอดปฏิกิริยาเข้าเครื่องพีซีอาร์ (Perkin Elmer 2400) ที่อุณหภูมิ 94°ซ 2 นาที จำนวน 1 รอบแล้วตามด้วยสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 3 ระดับ คือ 94 °ซ 1 นาที 36 °ซ 1 นาที 72 °ซ 1 นาที จำนวน 39 รอบและปรับปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 °ซ 5 นาที จำนวน 1 รอบ นำหลอดที่ได้จากการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาแยกดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสบนอกาโรสเจล 1.5% ที่ความต่างศักย์ 100 โวลท์ นำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide (10µl /TBE 100 ml) นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 5 นาที บันทึกภาพภายใต้แสง UV transluminator ด้วยเครื่อง Gel document system (Gene Genius Bio Image) พร้อมระบบ Thermal printer

การวิเคราะห์ข้อมูล

จากภาพถ่ายแถบดีเอ็นเอ พิจารณาเลือกเฉพาะแถบที่ชัดเจนเท่านั้น ให้คะแนนความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการปรากฏของแถบให้คะแนนเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบให้คะแนน 0 ในตำแหน่งเดียวกัน นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc (Numerical taxonomy and multivariate analysis system) version 2.02h (Rohlf, 1998)

ตารางที่ 1 สารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สารที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้/ (1X)	ความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentration)
10X PCR buffer pH 8.4 (Invitrogen)	2 µl	1 x
50 mM $MgCl_2$	0.76 µl	1.9 mM
10 mMdNTPs(Promega)	0.1 µl	0.05 mM
Taq polymerase(5u /µl)	0.1µl	0.5unit
ดีเอ็นเอไพรเมอร์10 µM(Operon Tech)	1µl	10 picomole
ดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง(80 ng/µl)	2 µl	160 ng
น้ำกลั่น	14.04 µl	-
ปริมาตรรวม	20µl	

และจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Unweightedpair-group method cluster analysis (UPGMA) และ คำนวณค่าดัชนีความเหมือน (Similarity coefficient) โดยโปรแกรม NTSYSpc

ผลและวิจารณ์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันฝรั่ง 13 สายพันธุ์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์สุ่มความยาว 10 นิวคลีโอไทด์จำนวน 20 หมายเลขในการทดลองครั้งนี้ พบว่า ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่จำแนกความแตกต่างของมันฝรั่งทั้ง 13 สายพันธุ์ได้มีจำนวน 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPN-03, OPN-05 OPN-07, OPN-12, OPN-13, OPN-14 และ OPN-15 โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 102 แถบเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน(polymer phism) ทั้งหมด 88 แถบคิดเป็น 86.27% แถบดีเอ็นเอมีขนาดตั้งแต่ 206-3,319bp ค่าเฉลี่ยของการเกิดแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 12.5 แถบต่อ ไพรเมอร์ ความสำเร็จในการจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันฝรั่ง โดยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD ได้ถูกรายงานโดยผู้วิจัยหลายกลุ่มโดย McGregor *et al.* (2000) ได้ทำการวิจัยทดลองใช้ RAPD ไพรเมอร์ จำนวน 21ไพรเมอร์ในการจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันฝรั่งพันธุ์ปลูก 39 พันธุ์ และพบว่าไพรเมอร์ OPH-10 สามารถจำแนกความแตกต่างของจีโนไทป์มันฝรั่งได้ถึง 38 พันธุ์ เช่นเดียวกับ Chakrabarti *et al.* (2001) ที่รายงานว่า RAPD ไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ จาก 10 ไพรเมอร์ประกอบด้วย OPA-03, OPB-04, 0PC-03, 0PC-04 และ 0PE-20 ที่ใช้ในการจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันฝรั่งพันธุ์ปลูก 20 พันธุ์ด้วยวิธี RAPD สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันฝรั่งพันธุ์ปลูกทั้ง 20 พันธุ์ได้

จากการทดลองในครั้งนี้ยังพบว่าในจำนวน 7 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอ ที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันฝรั่งทั้ง 13 สายพันธุ์นั้น สามารถใช้เพียง 3 ไพรเมอร์ คือ OPN-03, OPN-05 และ OPN-07 ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันฝรั่ง แต่ละสายพันธุ์ออกจากกันได้ครบทั้ง 13 สายพันธุ์ โดยไพรเมอร์ OPN-03 (รูปที่ 1 A) จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์ 1008 (2 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 524bp และ 2551bp) ออกจาก 4 สายพันธุ์ในกลุ่ม Kennebec ได้แก่ สายพันธุ์ใหม่ KB154 (4 แถบดีเอ็นเอขนาด 524bp 708bp 854bp และ 2551bp) สายพันธุ์ KB165 (4 แถบดีเอ็นเอขนาด 524bp 854bp 1224bp และ 2551bp) สายพันธุ์ใหม่ KB211 (5 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 524bp 750bp 854bp

1224bp และ 2551bp) และพันธุ์ Kennebec (5 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 524bp 750bp 854bp 1224bp และ 2551bp) ซึ่งพันธุ์ 1008 จัดอยู่ในกลุ่ม Kennebec และไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแยกพันธุ์ 1008 ออกจาก 4 สายพันธุ์ในกลุ่ม Kennebec ได้ เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนหรือคล้ายคลึงกัน (Pongsupasamit and Praprute, 2014)

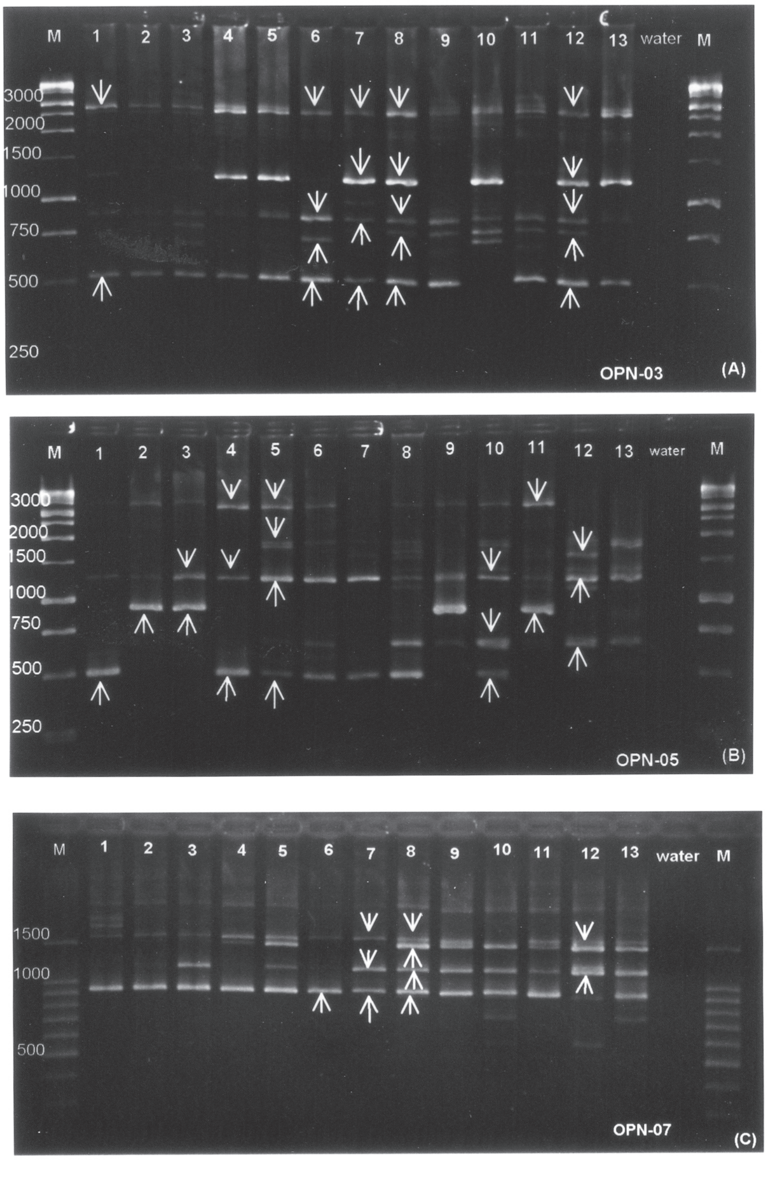
สำหรับไพรเมอร์ OPN-05 (รูปที่ 1 B) สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์การค้าทั้ง 5 พันธุ์ คือ พันธุ์ Atlantic (1แถบ ขนาด 510bp) พันธุ์ Kennebec (3 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 655bp 1260bp และ 1560bp) พันธุ์ Russet Burbank (2 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 923bp และ 3187bp) พันธุ์Spunta (3 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 510bp 655bp และ 1260bp) และ พันธุ์1008 (1 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 510bp) และไพรเมอร์ OPN-05 ยังสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของ 4 สายพันธุ์ในกลุ่ม Atlantic ออกจากกันได้ คือพันธุ์ Atlantic (1 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 923bp) สายพันธุ์ AT179 (2 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 923bp และ 1260bp) สายพันธุ์ใหม่ AT192 (3 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 510bp 1260bp และ 3187bp) และสายพันธุ์ใหม่ AT431 (4 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 510bp 1260bp 1825bp และ 3187bp)

ส่วนไพรเมอร์ OPN-07 (รูปที่ 1 C) สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของ 4 สายพันธุ์ในกลุ่ม Kennebec (KB) คือ สายพันธุ์ใหม่ KB154 (1 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 938bp) สายพันธุ์ (โซมาโคลน) KB165 (3 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 938bp 1193bp และ 1596bp) สายพันธุ์ใหม่ KB211 (4 แถบดีเอ็นเอ ขนาด 938bp 1193bp 1500bp และ 1596bp) และพันธุ์ Kennebec (2 แถบดีเอ็นเอ ขนาด1193bp และ 1500bp) ออกจากกันได้

ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม ซึ่งได้จากการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันพบว่า มันฝรั่งทั้ง 13 สายพันธุ์มีค่าพิสัยความเหมือนทางพันธุกรรม ระหว่าง 0.21-0.83 ซึ่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่าในกลุ่ม 4 สายพันธุ์ใหม่ซึ่งมีพิสัยค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่าง 0.36-0.71 (ตารางที่ 2) และจากแขนงการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA มันฝรั่งทั้ง 13 สายพันธุ์สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่มใหญ่ดังนี้ กลุ่มที่ 1 จำนวน1 พันธุ์คือพันธุ์ 1008 ซึ่งเป็นพันธุ์นำเข้าจากรัฐวิคตอเรีย ประเทศออสเตรเลียและ กลุ่มที่ 2 จำนวน 12 สายพันธุ์ ซึ่งแบ่งได้อีก 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 2.1 จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Russet Burbank สายพันธุ์ SP51 สายพันธุ์ AT179 พันธุ์ Atlantic และกลุ่ม 2.2 จำนวน 8 สายพันธุ์ ซึ่งแบ่งได้อีก 2 กลุ่มคือ กลุ่ม 2.2.1 จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Kennebec สายพันธุ์ KB211 สายพันธุ์ KB165 และ กลุ่ม 2.2.2 จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ KB154 พันธุ์ Spunta สายพันธุ์ RB80 สายพันธุ์ AT431 และสายพันธุ์ AT 192 (รูปที่ 2) ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ใหม่ KB211 (กลุ่ม2.2.1)และ KB154 (กลุ่ม 2.2.2) ซึ่งเป็นโซมาโคลนของพันธุ์ Kennebec ถึงจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับพันธุ์ Kennebec (กลุ่ม 2.2.1) แต่ก็ยังคงอยู่ในกลุ่มใหญ่เดียวกับพันธุ์ Kennebec (กลุ่มใหญ่ 2.2) (รูปที่ 2) แต่สายพันธุ์ใหม่ AT431 และ AT 192 (กลุ่มย่อย2.2.2และกลุ่มใหญ่ 2.2) ซึ่งเป็นโซมาโคลนของพันธุ์ Atlantic พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับพันธุ์ Atlantic (กลุ่มย่อย 2.1.1 และกลุ่มใหญ่ 2.1) และจากแขนงความสัมพันธ์พบว่า ไม่ได้อยู่ในกลุ่มใหญ่เดียวกับพันธุ์ Atlantic (รูปที่ 2) แสดงว่า สายพันธุ์ใหม่(โซมาโคลน) AT431 และ AT 192 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากพันธุ์ Atlantic มากกว่า สายพันธุ์ใหม่ KB211 และ สายพันธุ์ใหม่ KB154 กับพันธุ์ Kennebec ความผันแปรทางพันธุกรรมที่พบในสายพันธุ์โซมาโคลนใหม่ทั้ง 4 สายพันธุ์จากพันธุ์เดิมที่ใช้สร้างประชากร คงเป็นผลจากขบวนการ somaclonal variation ที่เกิดขึ้นในประชากรโซมาโคลนที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปล้องของมันฝรั่ง (Pongsupasamit, 1995 ; Pongsupasamit *et al*., 2002) ซึ่งความผันแปรทางด้านพันธุกรรมที่เกิดขึ้น ในประชากรโซมาโคลน ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนพืช (somaclonal variation) พบว่า มีได้หลายสาเหตุตั้งแต่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม จนถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนในเซลล์ ที่เพาะเลี้ยง ซึ่งอาจเกิดจากเนื้อเยื่อที่ใช้เพาะเลี้ยงเองหรือการกระตุ้นของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เช่น ฮอร์โมนหรือจากความไม่คงตัวของยีนในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (Karp and Bright, 1985)

สรุป

จากการทดลองวิจัยในครั้งนี้ สรุปได้ว่าสามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันฝรั่งทั้ง 13 สายพันธุ์ได้ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD จาก 7 ไพรเมอร์แต่สามารถใช้เพียง 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPN-03, OPN-05 และ OPN-07. ในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันฝรั่งทั้ง 13 สายพันธุ์ได้และสายพันธุ์ใหม่ 4 สายพันธุ์ ที่ผ่านการคัดเลือกจากโครงการวิจัยปรับปรุงพันธุ์มันฝรั่ง เพื่อการแปรรูปในเชิงพาณิชย์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ในกลุ่ม Atlantic จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) สายพันธุ์ AT192 และ 2) สายพันธุ์ AT431 และ สายพันธุ์ในกลุ่ม Kennebec จำนวน 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ KB211 และ สายพันธุ์ KB154 มีพันธุกรรมที่แตกต่างจากพันธุ์เดิมที่ใช้ในการสร้างโซมาโคลน โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทั้ง 4 สายพันธุ์มีความแตกต่างจากพันธุ์เดิมที่ใช้ในการสร้างโซมาโคลนและสายพันธุ์อื่นอย่างชัดเจน

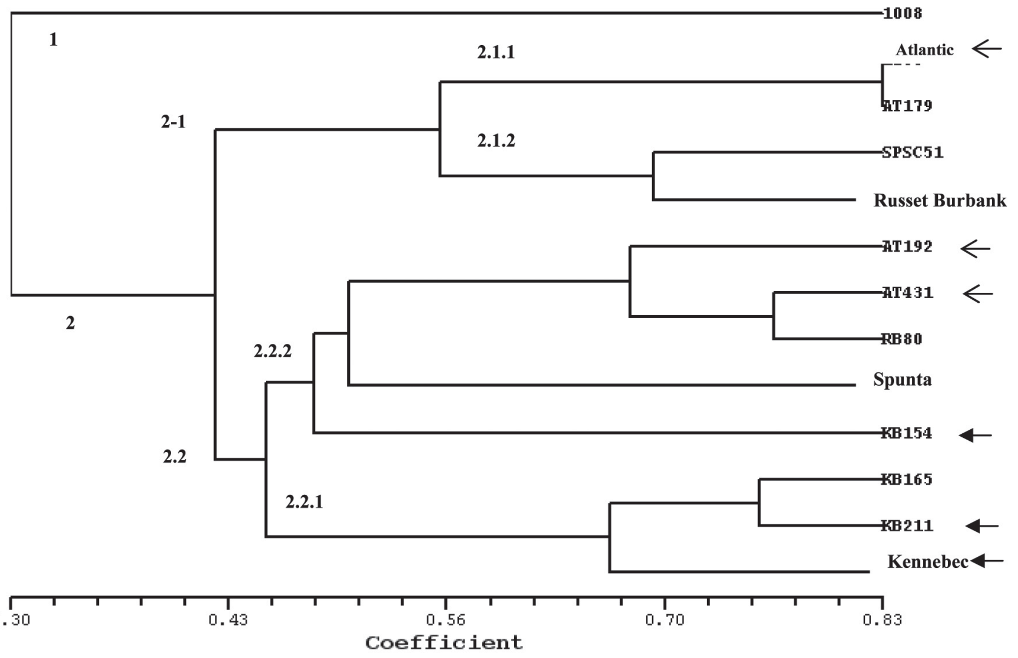


รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ OPN-03 (A) OPN-05 (B) และOPN-07 (C) ของมันฝรั่ง 13 สายพันธุ์ ได้แก่ 1=1008, 2= Atlantic, 3=AT179, 4= AT192, 5= AT431, 6=KB154, 7=KB165, 8= KB211, 9= SP51, 10=Spunta, 11=Russet Burbank, 12= Kennebec, 13= RB80

ตารางที่ 2 ค่า similarity coefficient ของแถบดีเอ็นเอ ของ มันฝรั่ง 13 สายพันธุ์

สายพันธุ์	1008	AT_0	AT179	AT192	AT431	KB154	KB165	KB211	SP51	SP_0	RB_0	KB_0	RB80
1008	1.00												
AT_0	0.34	1.00											
AT179	0.31	0.83	1.00										
AT192	0.35	0.43	0.45	1.00									
AT431	0.34	0.42	0.42	0.71	1.00								
KB154	0.44	0.41	0.36	0.42	0.58	1.00							
KB165	0.26	0.33	0.30	0.36	0.51	0.43	1.00						
KB211	0.23	0.35	0.30	0.36	0.58	0.42	0.75	1.00					
SP51	0.31	0.54	0.54	0.52	0.65	0.51	0.48	0.56	1.00				
SP_0	0.28	0.30	0.34	0.42	0.56	0.44	0.45	0.54	0.47	1.00			
RB_0	0.26	0.55	0.61	0.45	0.51	0.37	0.37	0.45	0.69	0.47	1.00		
KB_0	0.21	0.33	0.31	0.32	0.53	0.44	0.61	0.72	0.53	0.52	0.44	1.00	
RB80	0.27	0.31	0.35	0.64	0.76	0.48	0.40	0.45	0.58	0.54	0.46	0.51	1.00

หมายเหตุ : AT_0=พันธุ์ Atlantic, SP_0=พันธุ์Spunta, RB_0=พันธุ์ Russet Burbank, KB_0=พันธุ์ Kennebec



รูปที่ 2 การจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (dendrogram) ของมันฝรั่ง 13 สายพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

DOAE . 2010. Five years statistics of potato production. [on line]. Available . http://www.agriinfo.doae.go.th/5year/vegetation/vegetation.php (9March2553).(in Thai)

Chakrabarti, S.K., D.Pattanayak and P.S. Naik . 2001. Fingerprinting Indian potato cultivars byrandom amplified polymorphic DNA (RAPD)markers. Potato Res. 44: 375-387.

Denmeke, T.,D.R. Lynch, L.M. Kawchuk, G.C. Kozub and J.D. Armstrong.1996. Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. Plant Cell Rep. 15:662-667.

Doyle, J.J. and J. I. Doyle .1987 .A rapid DNA isolation procedure or small quantities of freshleaf tissue.Phytochem. Bull. 19: 11-15.

Karp, A. andS.W.J. Bright.1985. On the causes and origins of somaclonal variation. pp. 199-234. *In*B.J. Miflin (*ed.*) Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology II .Oxford Univ. Press, London.

McGregor, C.E., C. A. Lambert,M. M. Greyling, J.H. Louw and L. Warnich. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD , ISSR, AFLP, and SSR) in tetraploid potato (*Solanumtuberosum L.*) germplasm. Euphytica113 : 135-144.

Li, Zang and R.L. Nelson . 2002. RAPD marker diversity among cultivated and wild soybean accessions from four Chinese provinces. Crop Sci.(online) 42:1737-1744. Available http://crop.scijournals.org/cgi/reprint/42/5/1737 (23 September 2005)

OAE. 2013. Potato production forecast.[on line]. Available.http://www.oae.go.th/mis/FORECAST/09_MAR2556/Thai/situation/sit_t_14.pdf (1May2556). (in Thai)

Pongsupasamit, S. 1991. The development of a modified seed potato production scheme in Thailand. Proc. Symposium on the Role of Novel and Traditional Seed Potato Production Techniques in Asia. Asian Potato Assoc. June 17-18, 1991, Bundung, Indonesia.p. 78-82.

Pongsupasamit, S. 1995. *In vitro* plant regeneration of four commercial potato cultivarsfrom internode explants. Thai J. Agric. Sci. 28(April): 137-145.

Pongsupasamit, S. and C. Pongsupasamit . 1999. Feasibility of using micro tuber seed in the modified seed potato production scheme in Thailand : comparative performance of potatoes from cuttings and microtubers. Thai J. of Agric. Sci. 32(4) : 475-480.

Pongsupasamit, S. and C. Pongsupasamit2001. Feasibility of using micro tuber seed in the modified seed potato production scheme in Thailand : Comparative performance of potatoes from cuttings and microtubers. p. 22-30.*In*Proc. of the International Workshop on Potato Late Blight " Solving a threat to global food security",October 15-19 , Pyongchang, Gawan, Korea.

Ray, C. P., S.Kohli, S. Mohapatra and R. P. Sharma . 2001 . Identification and classification of aromatic rice based on DNA fingerprinting. Euphytica 118:243-251.

Rohlf, F. J. 1998. NTSYSpc version 2.02h. Applied Biostatistics Inc., Exeter Software, 47 Route25A, Suite2, E.Setauket, NY11733-2870. Loatherdpong, S. and M.Dananan . 1985. Yield comparison of potatoes from cuttings. Agric. Res. J. & Ext. 2(3): 121-126. (in Thai)

Pongsupasamit, S. , A Krajangsaeng and C. Pongsupasamit. 2002. Morphological variation among potato somaclones derived from tissue culture. Agric.Sci. J. 33(6) : 229-241. (in Thai)

Pongsupasamit, S. and C. Pongsupasamit. 1998. Yield evaluation and disease resistance of SC6 potato somaclones. Res. Report, Potato Improvement Program Royal Project. Chiangmai. 12 p. (in Thai)

Pongsupasamit, S. and C.Pongsupasamit.1999. Advanced yield trail and disease resistance of SC7 potato somaclones. Res. Report, Potato Improvement Program. Royal Project. Chiangmai. 13 p. (in Thai)

Pongsupasamit, S. and C. Pongsupasamit. 2012. Seed potato production (G1) from disease-free plantlets.. Res. Report, Potato Improvement for commercial processing. Office of Agric. Extension. Chiangmai. 16 p. (in Thai)

Pongsupasamit, S. and C. Pongsupasamit. 2013. Yield evaluation of G1 tuber seed of new potato clones. Res. Report, Potato Improvement for commercial processing. Office of Agric. Extension. Mae Jo University. Chiangmai. 25 p. (in Thai)

Pongsupasamit, S. and R. Praprute. 2014. Yield and morphological comparison ofpotato clones. Res. Report, Potato improvement for commercial processing . Office of Agric. Extension. Mae Jo University. Chiangmai. 50p. (in Thai)

Thornton, E. R. and J.B. Sieczka . 1980. Commercial potato production in North Africa. Am. Potato J. Suppl. 57:11.

Wilkie,S. E.,P. G. Isaac, and R. J. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in Allium. Theor. Appl. Genet. 86: 497-504.