ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม่อน *(Morus* spp.*)* จำแนกโดยใช้ AP– PCR markers

Genetic Diversity of Mulberry *(Morus* spp.*)* Germplasms Based on AP– PCR Markers

บุษรา ระวินู[1] อำนวย คำตื้อ[1] และปรียา พวงสำลี หวังสมนึก[2]

Butsara Rawinoo[1], Amnouy Kamtuo[1] and Preeya Poungsamlee Wangsomnuk[2]

Abstract

Mulberry is the best food for silkworm *(Bombyx mori).* Additionally, mulberry plant part can be used in various commodities. Classification of mulberry plants has not been well-established and caused the complexity in nomenclature. This study was set up to investigate the diversity of 53 mulberry accessions comprising 44 accessions as cultivated mulberry and 9 accessions as wild mulberry plants based on Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) fingerprint technique using 9 (17-20 bases) arbitrary primers. It was found that a total number of 140 bands were amplified, varying from 236 to 1,885 bp. The genetic similarity coefficient was in the range of 0.6286-0.9071. The mulberry accessions can be classified into 5 groups as group 1 comprising all cultivated mulberry accessions (divided into sub group as 1.1, 1.2 and 1.3); whereas group 2, 3, 4 and 5 comprising wild mulberry accessions from different origins. The result also showed that the wild mulberry accessions were clearly different from cultivated mulberry accessions.

Key words: Mulberry *(Morus* spp.*)*, AP-PCR, PCR, genetic diversity

บทคัดย่อ

หม่อน (*Morus* spp.) เป็นพืชอาหารที่ดีที่สุดของหนอนไหม (*Bombyx mori* L.) และยังจัดเป็นพืชสารพัดประโยชน์ที่สามารถนำทุกส่วนของต้นไปใช้ในด้านต่างๆ ได้ทั้งสิ้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังมีความสับสนเกี่ยวกับระบบการจัดจำแนกหม่อน และทำให้เกิดความยุ่งยากในการเรียกชื่อ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม่อน 53 สายต้น ซึ่งประกอบด้วยหม่อนพันธุ์ปลูก 44 สายต้นและหม่อนป่า 9 สายต้น ด้วยเทคนิค AP - PCR โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 9 ชนิด (ขนาด 17 - 20 เบส) พบว่า สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ทั้งสิ้น 140 แถบ ที่มีขนาดอยู่ในช่วงระหว่าง 236 - 1,885 คู่เบส การวิเคราะห์พันธุกรรมของหม่อน 53 สายต้นพบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.6286 - 0.9071

---

[1] สาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[2] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[1] Horticultural Section, Department of Plant Science and Agricultural resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002.

[2] Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002.

และจัดกลุ่มหม่อนออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยหม่อนพันธุ์ปลูกทั้งหมด (แยกเป็นกลุ่มย่อย 1.1, 1.2 และ 1.3) ส่วนกลุ่มที่ 2, 3, 4 และ 5 ประกอบด้วยหม่อนป่าที่มีแหล่งกำเนิดและที่มาของสายต้นแตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถแยกหม่อนป่าออกจากหม่อนพันธุ์ปลูกได้อย่างชัดเจน

คำสำคัญ: หม่อน (*Morus* spp.) AP- PCR PCR ความหลากหลายทางพันธุกรรม

บทนำ

หม่อน (Mulberry : *Morus* spp.) เป็นพืชอาหารที่ดีที่สุดของหนอนไหม (*Bombyx mori* L.) และเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งในประเทศที่มีการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมเพื่อผลิตเส้นไหม เช่น จีน อินเดีย ญี่ปุ่น และประเทศไทย นอกจากนี้หม่อนยังจัดเป็นพืชสารพัดประโยชน์ เนื่องจากส่วนต่างๆ ของหม่อนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งสิ้น ได้แก่ การนำใบหม่อนมาประกอบเป็นอาหารชนิดต่างๆ เนื่องจากใบหม่อนมีคุณค่าทางโภชนาการสูง การนำใบมาทำชาใบหม่อน ซึ่งเป็นเครื่องดื่มสมุนไพรเพื่อสุขภาพที่มีสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์หลายชนิดซึ่งมีสรรพคุณทางเภสัชศาสตร์ ในปัจจุบันชาหม่อนใบหม่อนและผลหม่อนยังได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ หรือใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นส่วนผสมของไอศกรีม ขนมคุกกี้ บะหมี่และเครื่องปรุงรส ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง มีการสกัดสารบางชนิดจากส่วนใบ กิ่ง และรากหม่อน เพื่อนำไปใช้เป็นส่วนผสมของครีมหน้าขาว (whitening cream) (วิโรจน์, 2545) เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกราก มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไธโรซิเนส (Tyrosinase inhibitor) ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างเม็ดสี (melanin) ที่ผิวหนังและสารสกัดจากใบหม่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ส่วนในอุตสาหกรรมยาได้มีการจดสิทธิบัตรยารักษาโรคเอดส์ ซึ่งประกอบด้วย คูวาโนน เฮช โมรูซิน และ morusin-4-glucoside ที่แยกจากเปลือกรากหม่อน (เอมอร, 2543) กิ่งหม่อนที่เหลือใช้จากการเลี้ยงไหมสามารถนำไปใช้ทำเชื้อเพลิง ใช้เป็นวัสดุเพาะเห็ด เปลือกของกิ่งนำไปทำกระดาษ เนื้อไม้นำไปผสมทำใยสังเคราะห์ (rayon) ส่วนกากใบหม่อนที่เหลือจากการเลี้ยงไหมมักจะใช้ทำปุ๋ยหมักและเลี้ยงปศุสัตว์ (สถาบันวิจัยหม่อนไหม, 2547) ในประเทศไทย ได้มีการวิจัยและคิดค้น วิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากหม่อนจนสำเร็จ เช่น การทำไวน์และน้ำผลไม้ การทำแยม ลูกอม เยลลี่และข้าวเกรียบจากผลหม่อน (วสันต์, 2546) ในประเทศอินเดียมีการนำเนื้อไม้ของหม่อนมาทำเครื่องเรือน งานฝีมือ อุปกรณ์กีฬา เช่น ไม้เทนนิส ไม้ฮอกกี้ นอกจากนี้ในเอเชีย ยุโรปตอนใต้และอเมริกาตอนใต้มีการนำต้นหม่อนมาใช้จัดสวนตามสถานที่ต่างๆ เช่น ในบ้านหรือบริเวณถนน (Tipton, 1994)

ในปัจจุบันหม่อนได้ถูกจำแนกออกแล้วเกือบ 65 ชนิด โดยนักพฤษศาสตร์ชาติต่างๆ ในอดีต โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก ส่วนหม่อนที่ปลูกในประเทศไทยก็มีมากมายหลากหลายสายต้น นอกจากนี้ยังมีหม่อนป่าที่เจริญเติบโตอยู่ตามธรรมชาติ หม่อนบางพันธุ์มีลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันมาก แต่มีการเรียกชื่อต่างกันหรือบางพันธุ์มีชื่อเรียกเดียวกัน แต่มีลักษณะสัณฐานภายนอกต่างกันหรือมาจากแหล่งต่างกัน ทำให้มีปัญหาในการจำแนกพันธุ์ นอกจากนี้หม่อนเป็นพืชผสมข้ามทั้งในระดับสปีชีส์และสายพันธุ์ สามารถถ่ายละอองเกสรระหว่างกันและกันจนเกิดเป็นลูกผสมที่สามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้อีก จึงทำให้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกันอย่างใกล้ชิด มีการกลายพันธุ์และทำให้เกิดความสงสัยเกี่ยวกับสปีชีส์ของหม่อน โดยที่การศึกษาทางอนุกรมวิธานก็ยังจำกัดอยู่เฉพาะในสปีชีส์ที่มีความสำคัญต่อการเลี้ยงไหม ส่วนสปีชีส์อื่นๆ ยังไม่มีข้อมูลเพียงพอ ทำให้ในปัจจุบันการจำแนกพืชใน *genus Morus* L. ยังคงเป็นที่ถกเถียงกันอย่างมากและเกิดความสับสนเกี่ยวกับมาตรฐานของระบบการจัดจำแนกหม่อน (Awasthi et al., 2004)

จากรายงานการใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม่อน เช่น เทคนิค RAPD (Randomly Amplified Polymorphism DNA) (Weiguo and Yile, 2004; Lou et al.,1998), เทคนิค RAPD ร่วมกับ DAMD (Direct Amplification of Minisatellite DNA) (Bhattacharya and Ranade, 2001), เทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (Vijayan and Chatterjee, 2003; Aggarwal et al., 2004; Vijayan et al., 2005; Weiguo et al., 2007), เทคนิค RAPD ร่วมกับ ISSR (Vijayan et al., 2004; Awasthi et al., 2004) และเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Sharma et al., 2000; Botton et al., 2005) เป็นต้น

เทคนิค AP - PCR (Arbitrary Primed Polymerase chain reaction) เป็นการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 - 34 เบสหรือมากกว่านั้น (Welsh and McClelland, 1991) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยา พีซีอาร์ ความแตกต่างของสารดีเอ็นเอเริ่มต้นได้ก่อให้เกิดความแตกต่างในความสามารถของการเกิดการจำลองตัวและขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกจำลองตัว เกิดผลเป็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอหลากหลายรูปแบบ เมื่อนำมาแยกขนาดบนแผ่นวุ้นอะกาโรส หรืออะคริลาไมด์ (acrylamide) โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟริสิส แล้วรวบรวมข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำนวนหนึ่ง ก็จะสามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์หรือระหว่างสายพันธุ์ได้ เทคนิคนี้ทำได้ง่ายรวดเร็ว มีประสิทธิภาพและประหยัด ต้องการใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (10 - 25 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา) จึงเหมาะสำหรับใช้ในกรณีที่มีดีเอ็นเออยู่จำกัดและเหมาะสมสำหรับใช้ในการจำแนกพันธุกรรมของพืช แต่มีข้อเสีย คือ เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่แสดงเฉพาะลักษณะเด่น (dominant markers) จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เป็น heterozygous ออก จาก homozygous ได้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค AP - PCR ที่ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกสายพันธุ์และตรวจสอบความเป็นพ่อ - แม่ ใช้ติดตามการคัดแยกประชากรที่เกิดจากการผสมข้าม, ใช้เป็นเครื่องหมาย (marker) ในการสร้างแผนที่ยีนและใช้ในการสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยเฉพาะในระดับสปีชีส์เดียวกัน (Welsh et al., 1991) ทั้งนี้ เทคนิค AP-PCR ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช รวมถึงสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ อีกมากมายแต่ยังไม่มีรายงานการใช้ในหม่อน ดังนั้น เทคนิค AP-PCR จึงน่าจะเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายต้นหม่อนในประเทศไทยได้

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างพืช

หม่อน (*Morus* spp.) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน 53 สายต้น (Table 1) ประกอบด้วยหม่อนพันธุ์ปลูก 44 สายต้นและหม่อนป่า 9 สายต้น โดย 52 สายต้นรวบรวมมาจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและอีก 1 สายต้นรวบรวมจากภาคเหนือของสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (สปป.ลาว) โดยโครงการวิจัยการปรับปรุงพันธุ์หม่อนผลสด ศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การสกัดดีเอ็นเอของหม่อน

สกัดดีเอ็นเอของหม่อนทั้ง 53 สายต้น (Table 1) ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) ร่วมกับวิธีที่ดัดแปลงจาก Tai and Tanskley (1990) โดยใช้ใบอ่อนน้ำหนัก 0.4 กรัม ทำให้เซลล์แตกโดยการบดใน Nuclei Lysis solution บ่มที่อุณหภูมิ 65 OC นาน 15 นาที กำจัดอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ RNaseA ทำให้โปรตีนตกตะกอนด้วย Protein Precipitation solution แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 - 16,000 รอบ/วินาที เพื่อแยกเศษเซลล์ออกไป ตกตะกอน ดีเอ็นเอด้วยแอมโมเนียมอะซิเตดแล้วเติมเอธานอล 70 % เพื่อละลายเกลือออกจากโมเลกุล

ของดีเอ็นเอ แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพโดยวิธีวัดการเรืองแสงร่วมกับสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในวุ้นอะกาโรสด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีส ก่อนนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา AP-PCR หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 OC

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AP-PCR

คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหม่อนได้จาก AP - PCR primer 11 ไพรเมอร์ (Table 2) โดยที่ไพรเมอร์แต่ละชนิดจะถูกนำมาใช้ทดสอบกับดีเอ็นเอหม่อนจำนวน 5 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มประกอบด้วยดีเอ็นเอของหม่อนจำนวน 9 หรือ 11 สายต้น เตรียมสารละลายเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตรในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 0.20 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10xPCR buffer ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 2 mM dNTPs (Fermentas) 2.5mM $MgCl_2$ (Fermentas) *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 U/μl (Fermentas) ไพรเมอร์ ความเข้มข้น 5 μM (Bio Basic Inc.) และดีเอ็นเอต้นแบบ 10 ng สังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (Corbett Research, Germany) โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ (1) pre denaturation ที่อุณหภูมิ 95 ˚ซ เป็นเวลานาน 3 นาที (2) denaturation ที่อุณหภูมิ 95 ˚ซ เป็นเวลานาน 30 วินาที (3) primer annealing ที่อุณหภูมิ 55 ˚ซ เป็นเวลานาน 40 วินาที (4) extension ที่อุณหภูมิ 72 ˚ซ เป็นเวลานาน 1 นาที 30 วินาที โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 - 4 จำนวน 45 รอบ และ (5) final extension ที่อุณหภูมิ 72 ˚ซ เป็นเวลานาน 5 นาที ตรวจสอบ ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค อิเล็กโทรโฟริซีสใน TBE buffer (ประกอบด้วย Tris base, EDTA และ Boric acid) ความเข้มข้น 0.5 เท่า โดยใช้วุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 % ที่เติมสารละลาย เอธิเดียมโบรไมด์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus) (Fermentas) นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายเจล คัดเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม (DNA polymorphism) ของหม่อน 53 สายต้นต่อไป

Table 1 ***Morus*** **spp. accessions and their collection locations used in this study.**

Accession No.	Accession name	Collection location	Accession No.	Accession name	Collection location
1	Bunrod	Chiang Mai	28	Saunjarin	Chiang Rai
2	Buntham	Chiang Mai[1/]	29	Phonsawan	Lao P.D.R.
3	Xing Ding	Chiang Mai[1/]	32	Numprom1	Chaiyapum
4	African1	Chiang Mai	33	Klongsai1[1/]	Nakhonratchasema
5	African1	Chiang Mai	34	Klongsai2[1/]	Nakhonratchasema
6	Khunklang1	Chiang Mai	35	Klongsai3[1/]	Nakhonratchasema
7	Khunklang2	Chiang Mai	36	Klongsai4[1/]	Nakhonratchasema
8	Khunklang3	Chiang Mai	37	Japan	Nakhonratchasema
9	Khunklang4	Chiang Mai	38	Vavee	Nakhonratchasema
10	Khunklang5	Chiang Mai	39	Nakhonratchasema	Nakhonratchasema
11	Khunklang6	Chiang Mai	40	wild hybrid1[1/]	Nakhonratchasema
12	Khunklang7	Chiang Mai	41	wild hybrid2[1/]	Nakhonratchasema
13	Khunwang1	Chiang Mai	42	wild hybrid3[1/]	Nakhonratchasema

Accession No.	Accession name	Collection location	Accession No.	Accession name	Collection location
14	Khunwang2	Chiang Mai	43	Sesaket 2802	Sesaket
15	Pagsam1	Chiang Mai	44	Kampangsan03	Sesaket
16	Pagsam2	Chiang Mai	45	Lunjeaw44	Nong Khai
17	Pagsam3	Chiang Mai	46	Chiang Mai	Udonthani
18	Pagsam4	Chiang Mai	47	Pikuntong	Udonthani
19	Pagsam5	Chiang Mai	48	Chumpron	Udonthani
20	Pagsam6	Chiang Mai	49	Burirum60	Khon Kaen
21	Pagsam7	Chiang Mai	50	SCR 6-50	Sesaket
22	Banpangklang	Chiang Mai	51	SCRM7003-175	Sesaket
23	Banthamawang	Chiang Mai	52	Sesaket33	Udonthani
24	Banmaesalong1	Chiang Rai	55	Sakonnakorn72	Sakonnakorn
25	Banmaesalong2	Chiang Rai	56	Waengpapao	Chiang Rai
26	Banmaesalongnai	Chiang Rai	57	Numprom2	Chaiyapum
27	Raibunrod	Chiang Rai			

[1/] wild mulberry

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของหม่อนโดยใช้ AP-PCR marker

ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของหม่อน โดยใช้ดีเอ็นเอของหม่อนทั้ง 53 สายต้นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ได้จากการคัดเลือกแล้วการเตรียมสารละลายเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ ในเครื่อง PCR และการตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอจะกระทำเช่นเดียวกับในขั้นตอนการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของหม่อน 53 สายต้น ได้ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นทำการวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้โปรแกรม Photocapt MW (Vilber Luormat, France)

การวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม่อน

เปรียบเทียบรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยา AP-PCR ในหม่อนแต่ละสายต้น โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 0 แล้วนำข้อมูลที่ได้มาประเมินหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.10p (Applied Biostatistics Inc.) คำนวณค่าสัมประสิทธ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity coefficient) ตามวิธี simple matching หลังจากนั้นนำค่า similarity matrix ที่ได้มาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยใช้วิธี UPGMA (Unweighted pair-group method on the basis of arithmetic average)

ผลการศึกษา

การคัดเลือก AP-PCR primer ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหม่อน

เมื่อใช้ดีเอ็นเอของหม่อน 53 สายต้นที่แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ ไพรเมอร์ที่มีขนาด 17 - 20 เบส จำนวน 11 ไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 9 ชนิดที่สามารถสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้

และทำให้เกิดรูปแบบที่แตกต่างกันโดยมีขนาดอยู่ระหว่าง 350 - 1,800 คู่เบส ซึ่งใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของหม่อนแต่ละกลุ่มได้ ในขณะที่ไพรเมอร์อีก 2 ชนิด (AP04 และ AP07) สามารถเป็นต้นแบบสำหรับสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้แต่ไม่สามารถแยกให้เห็นความแตกต่างของหม่อนแต่ละกลุ่ม (Table 2) ดังนั้น จึงคัดเลือกไพรเมอร์ทั้ง 9 ชนิดดังกล่าวไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของหม่อน 53 สายต้นต่อไป

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหม่อนโดยใช้ AP-PCR primers

จากผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ที่คัดเลือกมา 9 ชนิด สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ทั้งสิ้น 140 แถบ โดยมีขนาดแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วงประมาณ 236 - 1,885 คู่เบส โดยจัดเป็นแถบดีเอ็นเอแบบ monomorphic 2 แถบและเป็นแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic 138 แถบ คิดเป็น 98.57% polymorphism โดยที่ทุกไพรเมอร์ที่ใช้สามารถทำให้เกิดแถบ polymorphic ได้ โดยไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบ polymorphic มากที่สุด (27 แถบ) คือ AP01 (Fig. 1 A) ส่วนไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบ polymorphic น้อยที่สุด (7 แถบ) คือ AP11 (Table 3)

การใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทน์แตกต่างกันมาเป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหม่อน 53 สายต้น พบว่า รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันทั้งในด้านขนาดและจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้น (Table 3) โดยเฉพาะในไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดรูปแบบของดีเอ็นเอ ซึ่งจำเพาะต่อบางสายต้น เช่น ไพรเมอร์ AP01 (Fig. 1 A), AP03, AP05, AP06, AP08, AP09 (Fig. 1 B) และ AP10 (Table 4) ทั้งนี้ หากเกิดรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมาก โอกาสที่จีโนมของหม่อนจะมีความแตกต่างกันมากก็เป็นไปได้สูง ในขณะเดียวกันหากรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันน้อย จีโนมของหม่อนก็จะมีความคล้ายคลึงหรือความเหมือนกันมากยิ่งขึ้น ซึ่งเป็นสิ่งบ่งชี้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม่อน และแสดงให้เห็นว่าลำดับเบสในจีโนมของหม่อนมีความแตกต่างกัน ซึ่งลำดับเบสในจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ที่แตกต่างกันจะมีผลต่อฟีโนไทป์ (phenotype) ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (ปรียา และคณะ, 2549)

Table 2 Primer sequences with total amplified AP-PCR markers obtained for 6 groups of pool DNA in fifty-three accessions of mulberry Primer

Primer	Primer sequence 5' → 3'	Primer size (bp)	Annealing temperature (^{O}C)	Number of bands	Size of bands (bp)	Percent of polymorphism (%)
AP01	ACCAGGCGCCCTCATGAG	18	55	10	250-1450	100
AP03	CTCATCAACGCCACTGGGG	19	55	7	485-1520	85.71
AP04	ACTCCGCTGGCGCCGAGCC	19	55	2	400-825	0
AP05	GGTGGGGGCGCCGTCACCAA	20	55	5	430-1325	60
AP06	CCTCTCACGCATCCCAG	17	55	5	465-1140	100
AP07	GTGCTTCCGCTCACTCA	17	55	1	795	0
AP08	AACTGGAGGCCACTGAG	17	55	7	360-1850	71.43
AP09	AATCCACAGCTGGTGATC	18	55	5	340-1905	80
AP10	AGCTTAGAGCCACACCC	17	55	13	290-1725	92.31
AP11	GCCGTGCTGCCTCTCAC	17	55	7	450-1180	71.43
AP12	GACATGGAGATCCACGCC	18	55	7	400-1350	100

Table 3 Polymorphism exhibited by AP-PCR primers in fifty-three accessions of *Morus* spp.

Primer	Primer size(bp)	Annealing temperature (^{O}C)	Number of bands	Monomorphic bands	Polymorphic bands	Percent of polymorphism (%)	Size of bands (bp)
AP01	18	55	27	-	27	100	260-1843
AP03	19	55	18	-	18	100	303-1735
AP05	20	55	11	-	11	100	236-1423
AP06	17	55	13	-	13	100	594-1885
AP08	17	55	12	-	12	100	372-1853
AP09	18	55	16	1	15	93.75	359-1714
AP10	17	55	17	-	17	100	350-1626
AP11	17	55	7	-	7	100	370-1031
AP12	18	55	19	1	18	94.74	246-1359

Table 4 Accession-specific bands in 11 mulberry accessions produced from 7 AP-PCR primers.

Primer	Primer sequence 5' ⟶ 3'	Annealing temperature (^{O}C)	Accession No.	Size of Accession-specific bands (bp)
AP01	ACCAGGCGCCCTCATGAG	55	49	1843
AP03	CTCATCAACGCCACTGGGG	55	12	909
AP05	GGTGGGGGCGCCGTCACCAA	55	49	958
AP06	CCTCTCACGCATCCCAG	55	4, 29	862, 1269
AP08	AACTGGAGGCCACTGAG	55	36, 33	871,1710
AP09	AATCCACAGCTGGTGATC	55	2, 2, 18, 11, 32	441, 622, 850, 954, 1485
AP10	AGCTTAGAGCCACACCC	55	39	926

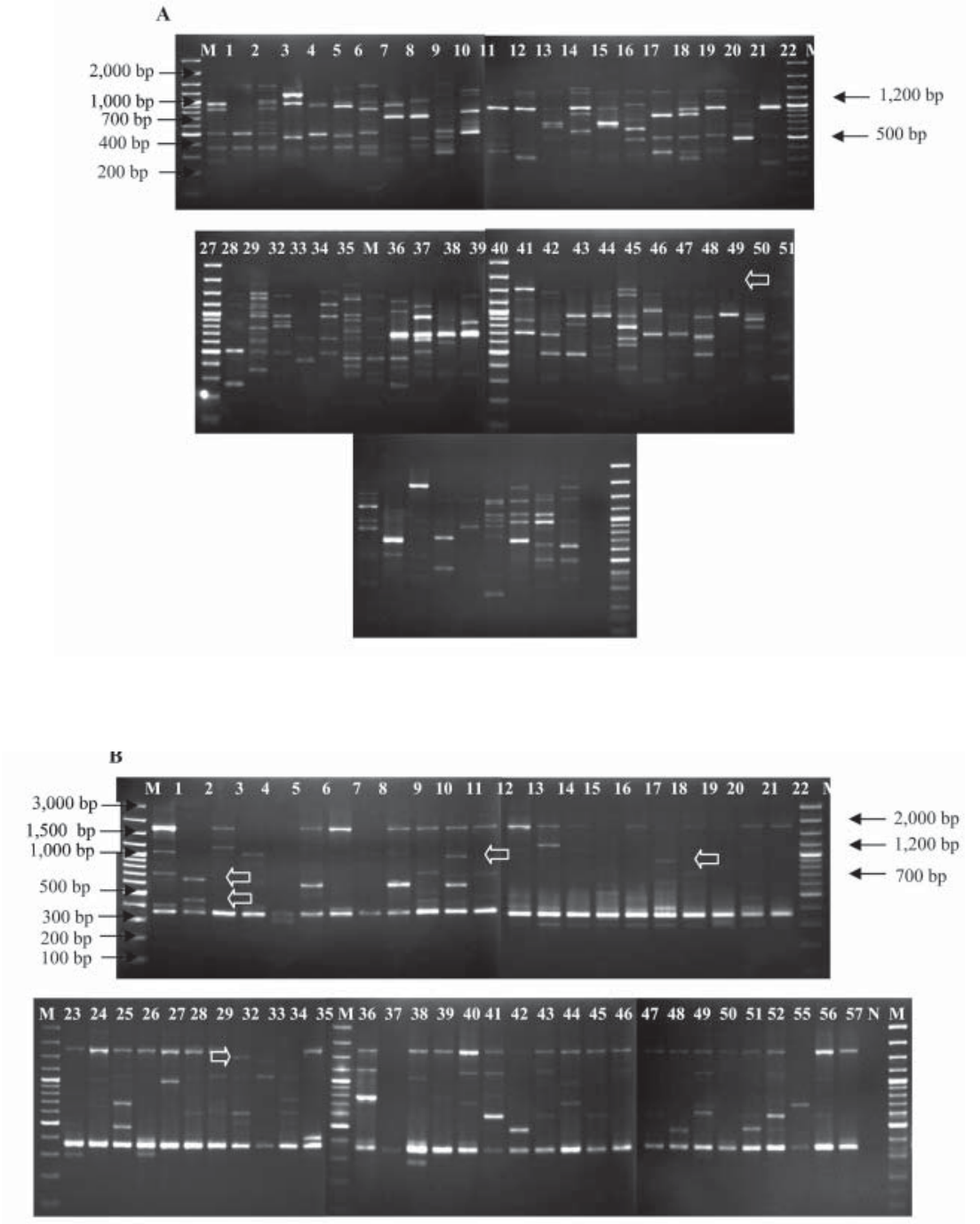

Fig. 1 Electrophoresis pattern obtained with AP-PCR markers. (A) Primer AP01 (B) Primer AP09 in fifty-three accessions. The number 1 - 57 present the number of each accession as listed in table 1, N is negative control and M is 100 bp DNA ladder plus (Fermentus). Allows present accession-specific bands.

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม่อน

เมื่อนำข้อมูลจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 140 แถบจากไพรเมอร์แต่ละชนิดที่ใช้ในเทคนิค AP-PCR มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.10p คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ ความเหมือนทางพันธุกรรม โดยวิธี simple matching coefficient พบว่า หม่อนทั้ง 53 สายต้นมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ในช่วง 0.6286 - 0.9071 โดยที่สายต้น No.10 กับ No.11 และ No.37 กับ No.38 มีค่า genetic similarity index (GSI) ใกล้เคียงกันมากที่สุด คือ 0.9071 ส่วน No.3 กับ No.34 และ No.24 กับ No.36 มีค่า GSI ห่างกันมากที่สุดคือ 0.6286 เมื่อนำค่า similarity matrix ที่ได้มาวิเคราะห์ เพื่อจัดกลุ่มสายต้นหม่อนโดยใช้วิธี UPGMA พบว่า สามารถแยกหม่อนป่าออกจากหม่อนพันธุ์ปลูกได้อย่างชัดเจน โดยจัดกลุ่มหม่อนออกได้เป็นกลุ่มใหญ่ 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 (Fig. 2) ได้แก่ **กลุ่มที่ 1** เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วยหม่อนพันธุ์ปลูกทั้งหมด 44 สายต้น โดยสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 3 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1.1 , 1.2 และ 1.3 โดยที่สายต้น No.10 กับ 11 และ 37 กับ 38 ในกลุ่มย่อยที่ 1.1 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมากที่สุด **กลุ่มที่ 2** ประกอบด้วยหม่อนป่าเพศเมีย 2 สายต้น (No. 33 และ 34) ที่นำมาจาก อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา **กลุ่มที่ 3** ประกอบด้วยหม่อนป่าเพศเมีย 2 สายต้น (No. 2 และ 3) ที่มีประวัติว่ามีผู้นำมาจากประเทศจีน **กลุ่มที่ 4** ประกอบด้วยหม่อนลูกผสมของหม่อนป่าจำนวน 3 สายต้น (No.40, 41 และ 42) **กลุ่มที่ 5** ประกอบด้วยหม่อนป่า 2 สายต้น ได้แก่ (No. 35 และ 36) ที่นำมาจาก อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

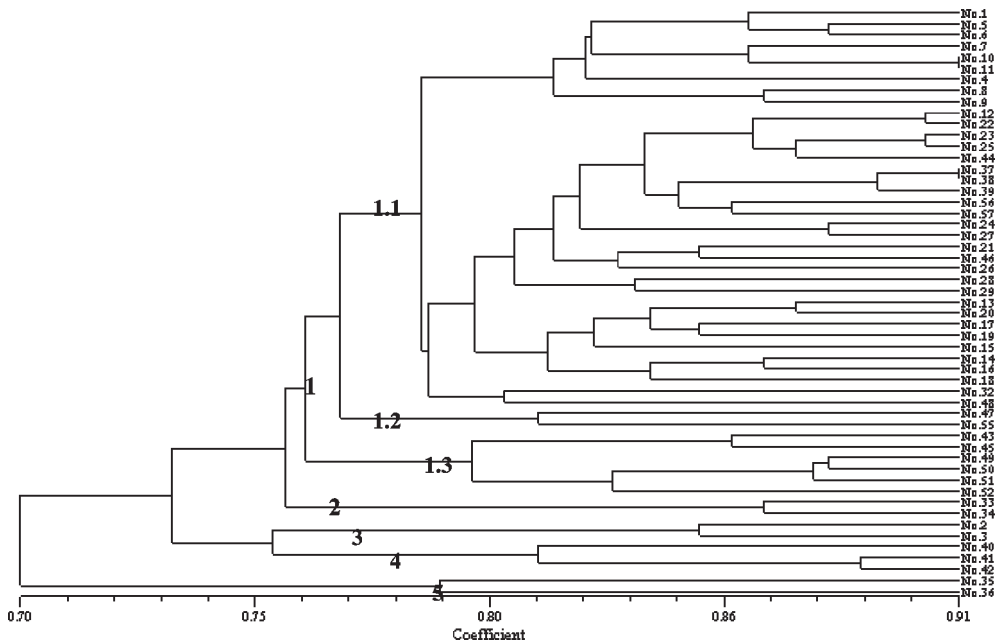

Fig. 2 Dendrogram showed the relationships among fifty-three mulberry accessions from AP-PCR fingerprint when using genetic similarity coefficient by simple matching method and cluster analysis by UPGMA.

วิจารณ์ผลการศึกษา

การใช้เทคนิค AP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 ชนิด ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม่อน 53 สายต้น พบว่า มีความแตกต่างของฐานพันธุกรรม ซึ่งอาจจะเป็นผลเนื่องมาจากหม่อนเหล่านี้บางสายต้นเกิดจากการผสมข้าม เดนโดรแกรมที่ได้สามารถแยกกลุ่มของหม่อนป่าออกจากหม่อนพันธุ์ปลูกได้อย่างชัดเจน ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการใช้เทคนิค AP-PCR ในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ป่ากับพันธุ์ปลูกของข้าว (Yi. et al., 1995) และทานตะวัน (Köhler and Friedt, 1999) ทั้งยังสอดคล้องกับผลการใช้เทคนิคอื่นๆ ในหม่อน เช่น ISSR และ RAPD (Awasthi et al., 2004) และ ISSR (Weiguo *et al.*, 2007) ซึ่งสามารถแยกกลุ่มของหม่อนป่าและหม่อนพันธุ์ปลูกออกจากกันได้อย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน

ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกสายต้นพ่อแม่ ที่จะใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์หม่อนต่อไปในอนาคต โดยการคัดเลือกเอาสายต้นที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมต่ำหรือมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงและมีลักษณะเด่นเฉพาะตัวบางประการมาใช้เป็นพ่อ-แม่พันธุ์ เพื่อสร้างลูกผสมที่มีลักษณะดีตรงตามความต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการวิจัยการปรับปรุงพันธุ์หม่อนผลสด ศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนงบประมาณในการจัดซื้ออุปกรณ์และสารเคมี และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ปรียา พวงสำลี-หวังสมนึก, สุดารัตน์ คำผา, สนั่น จอกลอย, พินิจ หวังสมนึก และ ยศินทร์ กิติจันทโรภาส. 2549. การวิเคราะห์จีโนมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) โดยใช้ ISSR markers. แก่นเกษตร 34(2): 124-138.

วสันต์ นุ้ยภิรมย์. 2546. หม่อนรับประทานผลและการแปรรูป. นันทกานต์กราฟฟิคการพิมพ์: กรุงเทพฯ.

วิโรจน์ แก้วเรือง. 2545. มีอะไรใหม่ใน...ชาหม่อน. การประชุมชมรมผลิตภัณฑ์แปรรูปหม่อนไหมประจำปี 2545. 28 - 29 พฤศจิกายน. กรมวิชาการเกษตร กรุงทพฯ. 4 หน้า (เอกสารประกอบการประชุม)

สถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. 100 ปีหม่อนไหม สายใยแผ่นดิน.โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย: กรุงเทพฯ.

เอมอร โสมนะพันธุ์. 2543. หม่อน White mulberry. จุลสารข้อมูลสมุนไพร 17(3) : 12 - 19.

Aggarwal, R.K., D. Udaykumar, P . S. Hendre, A. Sarkar and L.I. Singh. 2004. Isolation and characterization of six novel microsatellite markers for mulberry (*Morus indica*). Molecular Ecology Notes 4: 477 - 479.

Awasthi, A.K., G.M. Nagaraja, G.V. Naik, S. Kanginakudru, K Thangavelu and J. Nagaraju. 2004. Genetic diversity and relationships in mulberry (*genus Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. (cited 10 July 10, 2006) Available from: http://www. pubmedcen tral. nih.gov/ articlerender. fcgi?artid =343270

Bhattacharya, E.,and S.A. Ranade. 2001. Molecular distinction amongst varieties of Mulberry using RAPD and DAMD profiles. BMC Plant Biology 1(3). (cited November 14, 2005). Available from http://www. pubmedcentral.nih.gov/articlerender. fcgi?artid=64612

Botton, A., G. Barcaccia1, S. Cappellozza, R.D. Tos, C. Bonghi and A. Ramina. 2005. DNA fingerprinting sheds light on the origin of introduced mulberry (*Morus* spp.) accessions in Italy. Genetic Resources and Crop Evolution 52: 181-192.

Köhler, H. and W. Friedt. 1999. Genetic variability as identified by AP-PCR and reaction to mid-stem infection of *Sclerotinia sclerotiorum* among interspecific sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrid progenies. Crop Science 39:1456-1463.

Lou, C.F., Y.Z. Zhang and J.M. Zhou. 1998 Polymorphisms of genomic DNA in parents and their resulting hybrids in mulberry *Morus.* Sericologia 38:437-445.

Sharma, A., R. Sharma and H. Machii. 2000. Assessment of genetic diversity in a *Morus* germplasm collection using fluorescence-based AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 101:1049-1055.

Tai, Q. and C. Tanksley. 1990. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant. Plant Molecular Biology Report 8: 297-303.

Tipton, J. 1994. Relative drought resistance amoung selected southwestern landscap plants. Journal of Arboriculture 3: 151-155.

Vijayan, K. and S.N. Chatterjee. 2003. ISSR profiling of Indian cultivars of mulberry (*Morus* spp.) and its relevance to breeding programs. Euphytica 131: 53 - 63.

_____., C, Nair. And S, Chatterjee. 2005. Molecular characterization of mulberry genetic resources indigenous to India. Genetic Resources and Crop Evolution 52(1): 77-86. (Abstract)

_____., P.K. Kar, A. Tikader, P.P. Srivastava K.A.K.A wasthi, K. Thangavelu and B. Saratchandra. 2004. Molecular evaluation of genetic variability in wild populations of mulberry (*Morus serrata* Roxb.). Plant Breeding 123: 568 - 572.

Weiguo, Z. and P. Yile. 2004. Genetic diversity of Genus revealed by RAPD Markers. International Journal of Agriculture & Biology 6 (6) : 950 - 954.

Weiguo, Z. M. Xuexia, Z. H. Yong, W. Sibao, H. Jianhua, X. Hui, P. Yile and H. Yongping. 2007. A comparison of genetic variation among wild and cultivated *Morus* Species (Moraceae: *Morus*) as revealed by ISSR and SSR markers. Biodiversity and Conservation 16: 275 - 290.

Welsh, J. and M. McClelland. 1991.Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acids Research 19(19): 5275-5279.

_____., R.J. Honeycutt, M. McClelland and B. W.S. Sobral. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). Theoretical and Applied Genetics 82:473-476.

Yi, Q.M., W.G. Deng, Z.P. Xia and H.H. Pang. 1995. Polymorphism and genetic relatedness among wild and cultivated rice species determined by AP - PCR analysis. Hereditas 122: 135-141.