KHON KAEN AGR. J. 48 (3): 567-574 (2020)./doi:10.14456/kaj.2020.52.

การใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยาสูบ 9 สายพันธุ์

Application of ISSR Molecular Markers for Assessment of Genetic Diversity In Nine Tobacco *(Nicotiana tabacum* L.) Cultivars

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง[1*] และ สุมาลี พิมพันธุ์[1]

Surachest Aiumsumang[1*] and Sumalee Phimphan[1]

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยาสูบ 9 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ หรือ Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) จำนวนไพรเมอร์ 5 สายไพร์เมอร์ เพิ่มประมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 26 แถบ ให้แถบที่แตกต่างกัน 16 แถบ (59.34%) มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.45 ถึง 0.97 เมื่อวิเคราะห์จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc 2.1 ด้วยวิธี UPGMA สามารถจำแนกยาสูบได้ 2 กลุ่มอย่างชัดเจน คือพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์การค้า ซึ่งมีความสอดคล้องกับแหล่งที่มาของยาสูบ ข้อมูลด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์นี้มีประโยชน์อย่างมากสำหรับการอนุรักษ์พันธุกรรมและการระบุสายพันธุ์ และยังมีประโยชน์ต่อการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ยาสูบต่อไป

คำสำคัญ: ยาสูบ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุล ISSR

ABSTRACT: The objective of this study was to investigate the genetic diversity of nine tobacco cultivars. We select five ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) primers capable of detecting genetic polymorphism using PCR technique and identifying genetic diversity by IBM SPSS program. The five primers selected were used to amplify the genomic DNA of nine individuals and generated a total 26 DNA bands, of which 59.34% were polymorphic. The similarity index ranged from 0.45 to 0.97. Nine cultivars tobacco were use cluster analysis by NTSY-pc 2.1 program (UPGMA). The result from cluster analysis showed clearly two groups tobacco (commercial and local cultivars), which accordance to their geographical locations. These results will help in the formulation of appropriate strategies for variety improvement in tobacco, and ISSR marker of the genetic diversity will contribute to further study and improvement of tobacco.

Keywords: tobacco, genetic diversity, ISSR marker

Received July 22, 2019

Accepted November 20, 2019

[1] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ จ.เพชรบูรณ์ 67000

[1] Biology program, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun, 67000

* Corresponding author, E-mail: topthesun1978@gmail.com

บทนำ

ยาสูบ (tobacco) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nicotiana tabacum* L. เป็นพืชล้มลุกจัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปอเมริกา จัดเป็นไม้ล้มลุกที่มีอายุเพียงปีเดียว ลำต้นไม่แตกกิ่งก้านสาขา มีความสูงประมาณ 0.6-2 เมตร ตามลำต้นและยอดมีขนที่อ่อนนิ่มปกคลุมอยู่ และทุกส่วนของต้นมีต่อมน้ำยางเหนียว ต้นยาสูบเป็นพรรณไม้กลางแจ้งที่ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนซุยที่ต้องการความชื้นปานกลาง (โรงงานยาสูบ, 2554) ยาสูบมีความสำคัญอย่างมากต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย เพราะใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตบุหรี่มวน ยาเส้น และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากยาสูบเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของจังหวัดเพชรบูรณ์ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีการปลูกยาสูบมานานนับร้อยปี ยาสูบมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ เนื่องจากที่ผ่านมาเกิดการกระจายพันธุ์เพาะปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ ตามความสนใจของเกษตรกร เกิดการผสมข้ามพันธุ์ จึงทำให้จำแนกแหล่งที่มาทางพันธุกรรมค่อนข้างยาก บางครั้งก็มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาไปตามสภาพแวดล้อม มีการตั้งชื่อพันธุ์ใหม่ไปเรื่อย ๆ ตามถิ่นฐานที่อยู่หรือลักษณะที่เปลี่ยนไปและมักเกิดความสับสนในการเรียกชื่อพันธุ์ การขยายพันธุ์ และการผลิตเมล็ดพันธุ์ตามมา ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพของยาสูบที่ไม่ได้มาตรฐานตรงตามสายพันธุ์ (เศรษฐา และ ภาวิน, 2556)

จากปัญหาดังกล่าว ได้มีความพยายามศึกษาเพื่อหาวิธีการจำแนกพันธุกรรมของยาสูบด้วยวิธีการต่าง ๆ ซึ่งวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจคือ การใช้เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งเป็นวิธีการที่ศึกษาความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ มีหลายวิธีการโดยอาจเปรียบเทียบแบบสุ่ม หรือความจำเพาะเจาะจงจากตำแหน่งบนโครโมโซมหรือดีเอ็นเอ (Denduangboripant et al., 2010) และเนื่องจากดีเอ็นเอมีคุณสมบัติเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่มีความจำเพาะเจาะจงในแต่ละสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ สามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนที่ของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน จึงทำให้การศึกษาในระดับโมเลกุลสามารถจำแนกพันธุ์สิ่งมีชีวิตได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ในปัจจุบันเทคนิคระดับโมเลกุลมีหลากหลายวิธีได้แก่ อาร์เอพีดี (RAPD) เอเอฟแอลพี (AFLP) ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) ช่วยในการคัดเลือกเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ (Oliveira et al., 2010) และเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Inter-Simple Sequence Repeat: ISSR) ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมในปัจจุบัน เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดหนึ่งที่ต้องอาศัยหลักการของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ มีลักษณะเป็นเบสซ้ำเป็นชุด ซึ่งจะไปจับกับตำแหน่งที่มีลักษณะเป็นเบสซ้ำ ๆ เป็นเบสคู่สมกันบนจีโนมของสิ่งมีชีวิตบริเวณที่เรียกว่า Simple Sequence Repeat (SSR) หรือไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่งของ SSR จะกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมของสิ่งมีชีวิต ทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับตำแหน่งต่าง ๆ บนจีโนมได้หลายบริเวณที่แตกต่างกัน ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นเป็นบริเวณระหว่าง SSR สองบริเวณ เทคนิคนี้จึงมีชื่อเรียกว่า Inter-Simple Sequence Repeat ซึ่งโพลีมอร์ฟิซึมหรือความแตกต่างที่เกิดจากความแปรปรวน (variation) ของลำดับเบสภายในชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งในสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมาก ๆ จะมีแถบดีเอ็นเอหรือชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction ; PCR) มีขนาดใกล้เคียงกัน และจะมีความแตกต่างกันมากขึ้นเมื่อสิ่งมีชีวิตมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่ห่างกันออกไป เทคนิคนี้จะคล้ายกับเทคนิคอาร์เอพีดีในแง่ของหลักการทำงานคือ ไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบโดยการสุ่มตำแหน่งต่าง ๆ บนจีโนม แต่เทคนิคไอเอสเอสอาร์จะมีความจำเพาะสูงกว่า คือ ลำดับเบสของไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อบริเวณที่เข้าจับซึ่งจะเข้าจับกับบริเวณที่ติดกับยีน ชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยาพีซีอาร์จึงมีส่วนที่เป็นลำดับเบสของยีนที่มีความจำเพาะอยู่ระหว่าง SSR ทั้งสองบริเวณด้วย ซึ่งให้ความแม่นยำกว่าเทคนิคอาร์เอพีดีซึ่งมีลำดับเบสแบบสุ่มเท่านั้น จึงเป็นเทคนิคที่ทำซ้ำได้โดยเกิดความคลาดเคลื่อนค่อนข้างน้อย (Tsumura, Ohba and Strauss, 1996.) งานวิจัยที่ผ่านมาใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Inter- Simple Sequence Repeat ; ISSR) ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์ Caricaceae และการจำแนกเพศของมะละกอ (Costa et al., 2011) ข้อดีของเทคนิคนี้คือมีความจำเพาะของตำแหน่งไพรเมอร์ที่เข้าจับกับสายดีเอ็นเอมากกว่าเทคนิคอื่น เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรม (polymorphism) สูง ใช้เวลาในการตรวจสอบน้อย วิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน ข้อมูลเชื่อถือได้ ใช้งบประมาณไม่สูงมาก (สุทวัฒน์, 2557) ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสในจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่จะศึกษา (Godwin et al., 2001) วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้ง

นี้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกหมวดหมู่ของยาสูบที่รวบรวมได้จำนวน 9 สายพันธุ์เพื่อเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ยาสูบต่อไป

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างพืช

พันธุ์ยาสูบรวบรวมพันธุ์ได้จากแปลงเพาะปลูกของเกษตรในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์จำนวน 9 พันธุ์ปลูก โดยมีพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ พันธุ์อีเปอร์ (P) อีหยู้ (Y) วังขอน (Vk) บายศรี (Bs) อีเหลือง (R) อีเตี้ยกระเทิน (T) ยูเนีย (Un) และช้องดอกแดง (sdd) และพันธุ์การค้า ได้แก่ Ky14 โดยเก็บตัวอย่างใบอ่อนจากต้นกล้าอายุ 20 วัน จำนวน 3 ต้นต่อหนึ่งสายพันธุ์ ต้นละ 3 ใบ เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัด Genomic DNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป RBC Genomic DNA Extraction Kit ผลิตภัณฑ์ของ RBC Bioscience ประเทศไต้หวัน สกัดตามขั้นตอนและวิธีที่ทางผู้ผลิตแนะนำ โดยการชั่งใบยาสูบสดหรือใบพืชแช่แข็งที่อายุ 20 วัน นำตัวอย่างน้ำหนัก 100 mg โดยบดตัวอย่างร่วมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด แล้วเติมสารละลายตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือการใช้งานจนเสร็จสิ้นกระบวนการ จากนั้น ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบยาสูบมาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดย นำมาสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยเตรียมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x PCR buffer, 10 mM dNTP, 50 mM $MgCl_2$, 1µM Primer ประกอบด้วยไพรเมอร์ UBC807 (AG)8T, UBC808 (AG)8C, UBC823 (TC)8C, UBC827 (GA)8TC และ UBC847 (CA)8AC, 5 unit/µl *Taq* DNA polymerase และดีเอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัม สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction Machine ; PCR Machine) ดังนี้คือ ขั้นตอนที่ 1 Pre denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขั้นตอนที่ 2 Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่ 3 Annealing อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที ขั้นตอนที่ 4 Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที โดยทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ และขั้นสุดท้าย Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำผลผลิตดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1 x TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำเจลไปย้อมด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence dye) เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 5 นาที ตรวจสอบเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่องบันทึกภาพ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder และ 100 bp DNA ladder plus คัดเลือกไพรเมอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มปริมาณและให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างได้อย่างชัดเจน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมของยาสูบ ได้เปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยแถบดีเอ็นเอตำแหน่งเดียวกันที่ปรากฏ แทนค่าด้วย 1 และตำแหน่งเดียวกันที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แทนค่า เป็น 0 คำนวณหาค่าดัชนีความเหมือน (similarity index, S.I.) จากสูตร S.I. = 2 nab/(na+nb) (Lynch, 1991) เมื่อ na และ nb แทนจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในตัวอย่าง a และ b ตามลำดับ และ nab คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทั้ง 2 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) วิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากความเหมือนหรือความต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการทดลองโดยการจัดกลุ่มเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยาสูบทั้ง 9 สายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น2.1 (Rohlf, 1998)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยาสูบ 9 สาย

พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม พบว่ามีไพรเมอร์ 5 ไพรเมอร์สามารถใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ (**Table 1**) โดยสร้างแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 26 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันจำนวน 16 แถบหรือคิดเป็น 59.34%แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาด 400-1,300 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ P1 (AG)8T, P2 (AG)8C, P3 (TC)8C, P4 (GA)8TC และ P5 (CA)8AC มีลักษณะของแถบดีเอ็นเอ ดังแสดง **Figure 1-5** ตามลำดับ โดยไพรเมอร์ P2 (AG)8C มีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic bands) มากที่สุด คือ 7 แถบ มีขนาดประมาณ 500-1,200 คู่เบส (**Figure 2**) จากการวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ อีหยู้ (Y) และ Ky14 มีค่าต่ำที่สุด (0.45) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ อีเตี้ยกระเทิน (T) และ ยูเนีย (Un) มีค่าสูงที่สุด (0.97) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยาสูบด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (similarity coefficient) และสร้างแผนภาพ แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) ของยาสูบทั้ง 9 สายพันธุ์ สามารถจัดได้ 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 พันธุ์พื้นเมือง จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์อีเปอร์ พันธุ์ยูเนีย พันธุ์อีหยู้ พันธุ์อีเตี้ย พันธุ์บายศรี พันธุ์วังขอน พันธุ์ช้องดอกแดง และพันธุ์อีเหลือง กลุ่มที่ 2 พันธุ์นำเข้า ได้แก่ พันธุ์ Ky14

Table 1 Total number DNA and polymorphic bands of nine tobacco cultivars using 5 primers ISSR analysis

Primer	Sequence	T(°C)*	Number of DNA band			Size of PCR band
			total	polymorphic	Percentage (%)	(bp)
P1 (UBC807**)	$(AG)_8T$	50	4	2	50	400-1,000
P2 (UBC808**)**	$(AG)_8C$	50	7	7	100	600-1,200
P3 (UBC823****)	$(TC)_8C$	50	4	2	50	400-800
P4 (UBC827****)**	$(GA)_8TC$	50	6	1	16.67	700-1,400
P5 (UBC847****)	$(CA)_8AC$	50	5	4	80	1,000-1,300
Total			26	16	59.34 %	

*T(°C) = annealing temperature, ** (Wang, 2011)

จากการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยาสูบจำนวน 9 พันธุ์ สามารถจำแนกและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยาสูบจัดกลุ่มพันธุ์ยาสูบออกเป็น 2 กลุ่มคือ 1 กลุ่มพันธุ์พื้นเมือง และ 2 กลุ่มพันธุ์การค้า และมีค่าสัมประสิทธิ์ 0.63-1.00 ซึ่งผลการทดลอง กับงานวิจัยของ Denduangboripant et al. (2010) ที่ได้ศึกษาการจำแนกยาสูบพันธุ์พื้นเมืองจากสถานีวิจัยยาสูบแม่โจ้ จำนวน 53 สายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบไอเอสเอสอาร์จำนวน 5 เครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ยาสูบสามารถจำแนกกลุ่มยาสูบได้ 4 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่ม 1 ได้แก่ Chorlare1 และ Chorlare2 กลุ่ม 2 ได้แก่ Nison, Petkhangsink , E-Dum เป็นต้น กลุ่ม 3 ได้แก่ Nakhon si Thammarat เป็นต้น และกลุ่ม 4 ได้แก่ NC37NF (Virginia) และ Ky-10 (Burley) และงานวิจัยของเศรษฐา และ ภาวิน, (2556) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ยาสูบเบอร์เลย์ พันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ป่า 39 สายพันธุ์ โดยเทคนิคโมเลกุลเครื่องหมายเอสเอสอาร์ สามารถจำแนกยาสูบได้ 3 กลุ่มอย่างชัดเจน คือ (1) กลุ่มพันธุ์การค้า (commercial cultivars) (2) กลุ่มพันธุ์พื้นเมือง (local cultivars) และ (3) กลุ่มพันธุ์ป่า

(wild cultivars) พันธุ์ยาสูบในแต่ละกลุ่มยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย ได้อีก 2 กลุ่มย่อยตามความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม โดยค่า cophenetic correlation (r) = 0.94764 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการจัดกลุ่มที่ดี และให้ผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของยาสูบจำนวน 9 พันธุ์ครั้งนี้ โดยพิจารณาจากความสัมพันธ์ระหว่างค่า distance หรือ genetic similarity coefficient ที่ได้จากตัวอย่างแต่ละคู่ เปรียบเทียบกับคู่อื่น ๆ โดยการจัดพันธุ์เป็นกลุ่ม ๆ อย่างเป็นลำดับดังแสดงการจัดกลุ่มใน **Figure 6** ซึ่งโดยมากจะนิยมใช้การจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic averages) สามารถสร้างแผนภูมิต้นไม้จำลองโดยการหาคู่ตัวอย่างที่มี pairwise distance น้อยที่สุดจาก distance matrix จากนั้น จัดให้ตัวอย่างคู่นั้น รวมกันเป็นกลุ่ม (cluster) ในส่วนอื่น ๆ ของ matrix ที่ไม่เกี่ยวข้องกับกลุ่มดังกล่าวให้คงค่าเดิมไว้ จากนั้น ดำเนินการรอบใหม่ โดยเริ่มจากการหาคู่ตัวอย่างที่มี pairwise distance น้อยที่สุดเช่นเดิมแล้วจัดกลุ่ม ดำเนินการเช่นนี้ไปจนทุกตัวอย่างถูกจัดเข้าอยู่ในกลุ่ม (เศรษฐา ศิริพินทุ์ และภาวิน อิทธิรส, 2556) ผลการทดลองจัดกลุ่มโดยใช้ SAHN Clustering และสร้าง dendrogram โดยใช้วิธี UPGMA สามารถจำแนกยาสูบได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มพันธุ์การค้าและกลุ่มพันธุ์พื้นเมือง

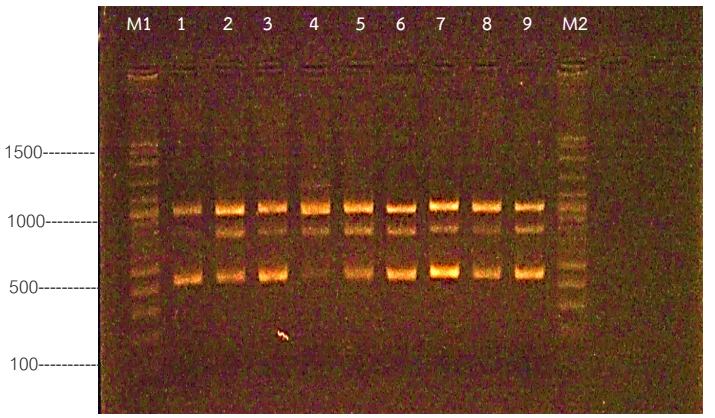

Figure 1 ISSR patterns of nine tobacco cultivars by P1 (AG)8T primer (Lane M1, 1kb DNA ladder plus; Lane 1-9, P, Ky 14, Y, VK, Bs, R, T, Un, sdd; Lane M2,100 bp DNA ladder plus)

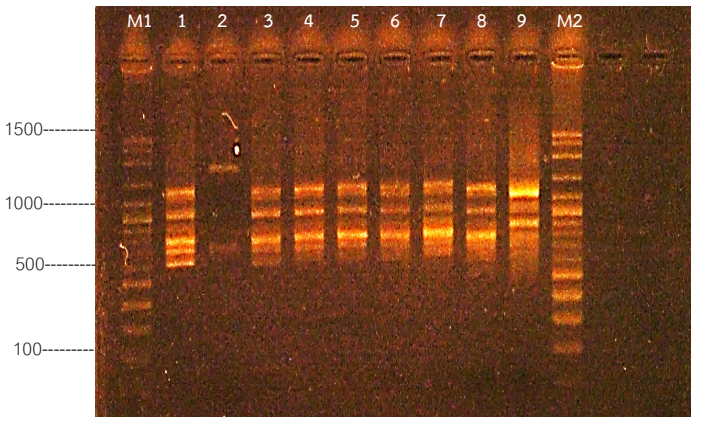

Figure 2 ISSR patterns of nine tobacco cultivars by P2 (AG)8C primer (Lane M1, 1kb DNA ladder plus; Lane 1-9, P, Ky 14, Y, VK, Bs, R, T, Un, sdd; Lane M2,100 bp DNA ladder plus)

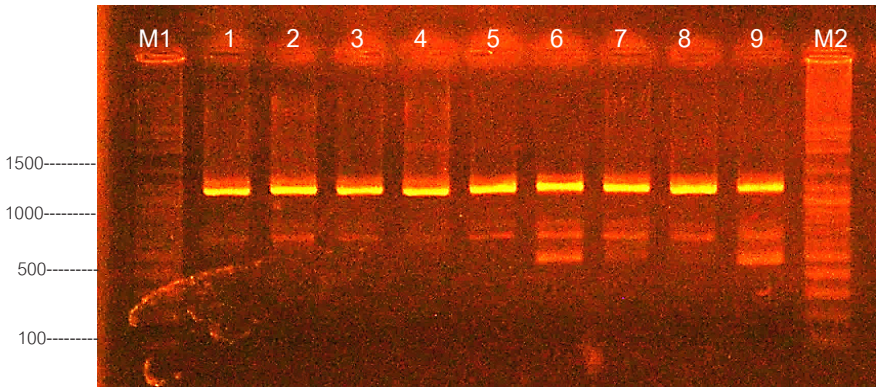

Figure 3 ISSR patterns of nine tobacco cultivars by P3 (TC)8C primer (Lane M1, 1kb DNA ladder plus; Lane 1-9, P, Ky 14, Y, VK, Bs, R, T, Un, sdd; Lane M2,100 bp DNA ladder plus)

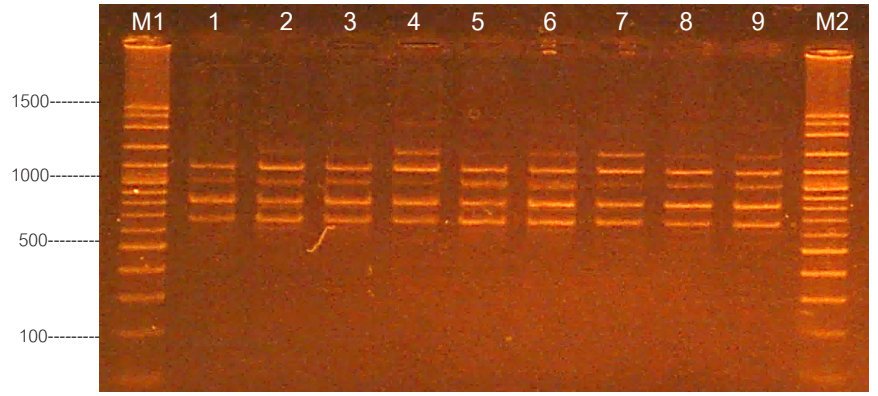

Figure 4 ISSR patterns of nine tobacco cultivars by P4 (GA)8TC primer (Lane M1, 1kb DNA ladder plus; Lane 1-9, P, Ky 14, Y, VK, Bs, R, T, Un, sdd; Lane M2,100 bp DNA ladder plus)

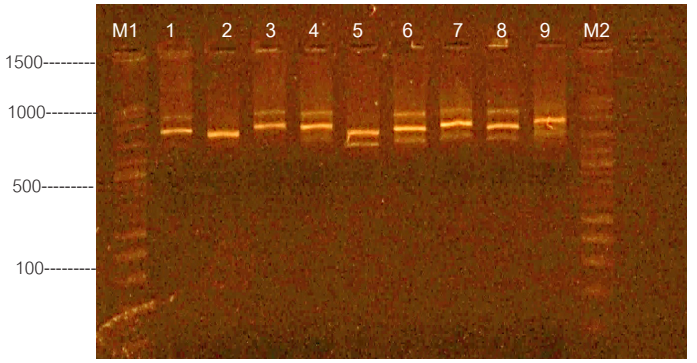

Figure 5 ISSR patterns of nine tobacco cultivars by P5 (CA)8AC primer (Lane M1, 1kb DNA ladder plus; Lane 1-9, P, Ky 14, Y, VK, Bs, R, T, Un, sdd; Lane M2,100 bp DNA ladder plus)

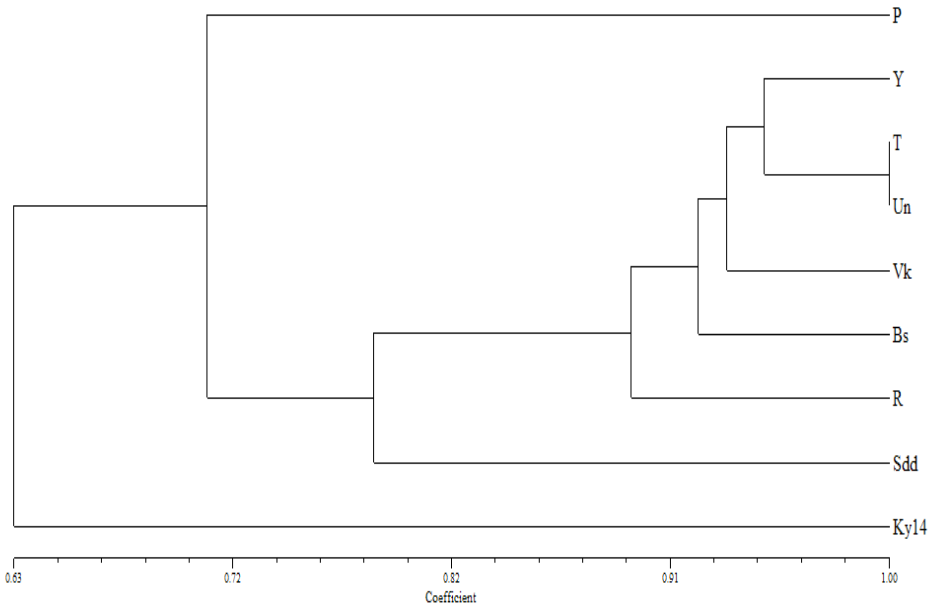

Figure 6 Dendrogram of nine tobacco cultivars based on ISSR data using 5 primers with UPGMA clusteranalysis; cultivated cultivars and local cultivars

สรุป

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยาสูบ 9 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ทั้งหมด 5 ไพรเมอร์ สามารถจำแนกพันธุ์ยาสูบจำนวน 9 สายพันธุ์ออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน มากนอกจากนี้ ยังพบว่าสามารถจำแนกยาสูบพันธุ์การค้า ออกจากยาสูบพันธุ์พื้นเมืองได้ จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า ยาสูบพันธุ์พื้นเมืองมีลักษณะทางพันธุกรรมที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งอาจมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกันหรือเกิดการผสมพันธุ์กันในกลุ่มจนเกิดสายพันธุ์ใหม่ ทั้งนี้ การแปรปรวนทางพันธุกรรมจะเกิดขึ้นน้อยกว่ายาสูบสายพันธุ์การค้าซึ่งมีการปรับปรุงทางพันธุกรรมมาแล้ว ซึ่งอาจมีการผสมพันธุ์กับยาสูบสายพันธุ์จากต่างภูมิภาคหรือไม่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม จึงเป็นผลให้ยาสูบสายพันธุ์การค้าถูกจัดกลุ่มแยกออกจากพันธุ์พื้นเมืองอย่างชัดเจน ซึ่งงานวิจัยนี้ยังแสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในการจำแนกสายพันธยาสูบได้เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น เช่น มะกอกน้ำมัน (Gomes et al., 2009) และ ชา (Lai et al., 2001) เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการประเมินสายพันธุ์ยาสูบ มาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะความใกล้ชิดทางพันธุ์กรรมมากหรือน้อยตามต้องการ เพื่อให้ได้พันธุ์ยาสูบที่มีคุณภาพดีและมีการพัฒนาสายพันธุ์ที่ดีต่อไป

เอกสารอ้างอิง

โรงงานยาสูบ. 2554. รายงานประจำปีโรงงานยาสูบ ปี พ.ศ.2554. โรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง กรุงเทพ.120 น.

เศรษฐา ศิริพินทุ์ และภาวิน อิทธิรส. 2556. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ยาสูบโดยเทคนิคโมเลกุลเครื่องหมายเอสเอสอาร์. ว. วิทย์. กษ. 44(พิเศษ): 357-360.

เศรษฐา ศิริพินทุ์ ภาวิน อิทธิรส และศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตและวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา. 2556. ความหลากหลายทาง

พันธุกรรมของพันธุ์ยาสูบเบอร์เลย์พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ป่า โดยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์. ใน: รายงานการประชุมวิชาการประจำปี 2556. ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่.

สุทวัฒน์ สินธีรโรจน์. 2557. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, ปทุมธานี.

Costa, F.R., N. S. P Telma, P. C. G. Ana, and G. P., Messias. 2011. NOTE ISSR markers for genetic relationships in Caricaceae and sex differentiation in papaya. Crop Breed. Appl. Biotechnol. 11: 352-357.

Denduangboripant, J., S. Setaphan, W. Suwanprasart, and S. Panha. 2010. Determination of Local Tobacco Cultivars Using ISSR Molecular Marker. Chiang Mai J. Sci. 37: 293-303.

Godwin, I. D., E. S. Mace, and Nurzuhairawaty. 2001. Genotyping Pacific Island Taro (*Colocasia esculenta* L.) Schott) Germplasm, P.109-128. In: R. J. Henry. Plant Genotyping the DNA Fingerprinting of Plants. The University of Queensland, Brisbane, QLD 4072, Australia.

Gomes, S., P.M. Lopes, J. Lopes, and H. Guedes-Pinto.2009. Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR. Plant Mol. Biol. Rep. 27: 365-373.

Lai, J.A., W. C. Yang, and J. Y. Hsiao. 2001. An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones andnative wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. Bot. Bull. Acad. Sin. 42: 93-100

Lynch, M. 1991. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting, DNA Fingerprinting: Approaches and Application, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.

Oliveira, E.J., A. Santos, F. M. Silva, L. F. Carvalho, J. L. Santos, V. B. Costa, A. Oliveira, and J. L. L. Dantas. 2010. Polymorphic microsatellite marker set for *Carica papaya* L. and its use in molecular- assisted selection. Euphytica 173: 279-287.

Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariat Analysis System, Version 3.2. 1st Edn., Exeter Software, New York.

Tsumura, Y., K. Ohba, and S. H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). Theor. Appl. Genet. 92: 40-45.

Wang, X. 2011. Inter-simple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating the genuine species of rhubarb. J. Medicinal Plants Res. 5: 758-764.