

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์

Assessing genetic diversity of *Nepenthes* species by SSR markers

เบญจมาศ สมวงศ์¹, ดวงแขทิตา กาญจนโสภา¹, ปาริชาติ นิลวิเชียร¹, สุรพล ฐิตินากุล¹
สรายุทธ อ่อนสนิท¹ และ เยาวพรรณ สนธิกุล^{1*}

Benjamas Somwong¹, Duangkhaetita Kanjanasopa¹, Parichart Ninwichian¹
Suraphon Thitithanakul¹, Sarayut Onsanit¹ and Yaowaphan Sontikun^{1*}

บทคัดย่อ: หม้อข้าวหม้อแกงลิงเป็นพืชกินแมลงที่มีสีสันสวยงามและมีความหลากหลายทางพันธุกรรม ส่งผลให้มีลูกผสมเกิดขึ้นจำนวนมากและมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาพัฒนาและคัดเลือกเครื่องหมาย SSR เพื่อใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยใช้เครื่องหมาย SSR ที่ออกแบบได้จาก nucleotide และ EST ของหม้อข้าวหม้อแกงลิงและพืชกินแมลง จำนวน 20 คู่ไพรเมอร์กับหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *N. mirabilis* พบว่าไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน สามารถใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงได้

คำสำคัญ: หม้อข้าวหม้อแกงลิง, เครื่องหมาย SSR, ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ABSTRACT: *Nepenthes* species as a carnivorous plant type, which is colorful pitcher and has a high genetic diversity. As a result, natural hybrids produce a diversity of pitcher character and some character is similar which cannot identify species by morphological characters. This study was to develop and select SSR marker for assessment of genetic diversity in *Nepenthes* species. Using primer designed from nucleotide and EST of *Nepenthaceae* and carnivorous plant (20 primers) with *N. mirabilis*. Only the 10 primers gave clear amplified products and these primers can be used to analyze all *Nepenthes* species.

Keywords: *Nepenthes* sp., SSR marker, Genetic diversity

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี 31 ม. 6 ต. มะขามเตี้ย - อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี 84000

Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, SuratThani Campus, - 31 Moo 6, Makham Tia, Muang, SuratThani, 84000

* Corresponding author: yaowaphan.s@psu.ac.th

บทนำ

หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes* spp.) มีชื่อสามัญว่า tropical pitcher plant หรือ monkey cup โดยส่วนใหญ่มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และกระจายพันธุ์ทางตะวันออกถึงทวีปออสเตรเลีย และทางตะวันตกถึงเกาะมาดากัสการ์ หม้อข้าวหม้อแกงลิงเป็นพืชมีลักษณะสีส้มสวยงาม เป็นพืชกินแมลงที่มีลักษณะโดดเด่นและเป็นพืชที่ได้รับความนิยมเป็นลำดับต้นๆ ในตลาดไม้ประดับทั้งในและต่างประเทศ ทำให้ถูกเก็บจากธรรมชาติเพื่อจำหน่ายเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้หม้อข้าวหม้อแกงลิงมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (พัชญ์สิตา และคณะ, 2554) และปัจจุบันมีลูกผสมเกิดขึ้นจำนวนมากและมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาช่วยในการศึกษาลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในประเทศไทย จึงมีความสำคัญในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงไว้

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular biology) เข้ามาช่วยในการศึกษาพันธุกรรมพืชกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ ได้รวดเร็วขึ้น เช่น วิธี Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้แสดงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลังการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ วิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นวิธีที่ใช้แสดงความแตกต่างจากขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในส่วนที่แสดงลักษณะเฉพาะ วิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นวิธีที่บ่งบอกความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์สายสั้นๆ ที่เข้าเกาะแบบสุ่มบนจีโนม (สุรินทร์, 2552) และวิธี Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ ไมโครแซทเทลไลท์ เป็นวิธีที่ใช้แสดงความแตกต่างโดยอาศัยจำนวนเบสซ้ำในจีโนมและการเพิ่มจำนวน

ด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากการใช้ไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณลำดับเบสจำเพาะที่อยู่บริเวณเบสซ้ำต่อเนื่อง (สุริพร, 2546; Powell et al., 1996) หากจำนวนเบสซ้ำมีการผันแปรจะทำให้เกิดการสร้างความแตกต่างได้มาก และสามารถทำซ้ำได้ (reproducibility) รวมทั้งมีการแสดงออกแบบ Co-dominant ที่มีเสถียรภาพ (stability) สูง (Heyden and Sharp, 2001) ด้วยคุณสมบัติเฉพาะตัวทำให้วิธี SSR กลายเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืชที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกันอย่างแพร่หลาย และสามารถใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี

ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาพัฒนาและคัดเลือกเครื่องหมาย SSR เพื่อใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิง

วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างพืช

นำใบอ่อนที่ยังไม่คลี่หม้อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *N. rabilis* ทำความสะอาดแล้วฉีกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นชั่งตัวอย่างปริมาณ 0.1 กรัม แล้วสกัดดีเอ็นเอทันทีโดยประยุกต์วิธีการของ Doyle and Doyle (1987)

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอและคุณภาพดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TBE ความเข้มข้น 1 เท่า เป็นเวลา 30 นาที บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Gel documentation จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Nano Drop Lite (Thermo Scientific, USA) โดยหาค่าดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร ตรงจุดหยดสารภายในเครื่อง บันทึกผลปริมาณดีเอ็นเอที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และตรวจ

สอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยบันทึกสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (Optical Density; OD 260/280 nm)

การออกแบบไพรเมอร์

ค้นหาลำดับเบส (nucleotide) ของหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (GenBank : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยสืบค้นจากฐานข้อมูล nucleotide และ Expressed Sequence Tag (EST) ของพืชในกลุ่มวงศ์หม้อข้าวหม้อแกงลิง (Nepenthaceae) ได้แก่ ชนิด *N. Baramesis*, *N. khasiana*, *N. vieillardii*, *N. alata*, *N. alba*, *N. ramispina*, *N. gracilis*, *N. masoalensis*, *N. benstonei*, *N. murudensis* และ *N. madagascariensis* รวมถึง nucleotide ของพืชกินแมลงกลุ่ม Sarraceniacae *S. purpurea* ซึ่งมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับหม้อข้าวหม้อแกงลิง แล้วนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมาวิเคราะห์หาตำแหน่ง SSR ในลำดับ nucleotide โดยใช้โปรแกรม Websat (<http://purl.oclc.org/NET/websat>) แล้วนำข้อมูลลำดับ nucleotide ที่มี SSR เป็นส่วนประกอบมาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 (http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm) จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสที่ครอบคลุมบริเวณส่วนหัวและท้ายของไมโครแซทเทลไลต์ และมีตำแหน่งห่างจากบริเวณที่เกิดชุดซ้ำออกไปประมาณ 50 เบสในแต่ละข้าง และมีขนาดของดีเอ็นเอหลังเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 150-350 เบส จำนวน 20 ไพรเมอร์ และนำไพรเมอร์ตรวจสอบการเกิดการจับกันเองของไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SSR โดยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* ที่มีค่าสัดส่วน OD 260/280 ระหว่าง 1.8-2.0 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ซึ่งมีองค์ประกอบ

ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 100 นาโนกรัม PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า dNTP mixture ความเข้มข้น 800 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ Forward Primer ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ Reverse Primer ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต และสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่อง PTC-100 ประกอบด้วย Pre-denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวนรอบ 1 รอบ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และทดสอบ Annealing ที่อุณหภูมิ 55 58 และ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวนรอบ 35 รอบ Final-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวนรอบ 1 รอบ และ Hold ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE ความเข้มข้น 1 เท่า ผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที นำไปบันทึกภาพแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยเครื่อง Gel documentation ภายใตแสงอัลตราไวโอเลต และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอแล้วคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

ผลการศึกษา

ผลการออกแบบไพรเมอร์ SSR

จากการออกแบบไพรเมอร์จากฐานข้อมูล nucleotide และ EST ของพืชในกลุ่ม Nepenthaceae รวมถึง nucleotide ของพืชกินแมลง กลุ่ม *S. purpurea* ซึ่งมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับหม้อข้าวหม้อแกงลิง พบว่าสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสที่ครอบคลุมบริเวณส่วนหัวและท้ายบริเวณตำแหน่ง SSR และมีตำแหน่งห่างจากบริเวณที่เกิดชุดซ้ำออกไปประมาณ 50 เบสในแต่ละข้าง และมีขนาดของดีเอ็นเอหลังเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 150-350 เบส ได้จำนวน 20 ไพร

เมอร์ โดยไพรเมอร์จำนวน 15 ไพรเมอร์ คือ Nep_SSR1, Nep_SSR2, Nep_SSR3, Nep_SSR4, Nep_SSR5, Nep_SSR6, Nep_SSR7, Nep_SSR8, Nep_SSR9, Nep_SSR12, Nep_SSR14, Nep_SSR15, Nep_SSR16, Nep_SSR17 และ Nep_SSR18 ออกแบบไพรเมอร์จากฐานข้อมูล nucleotide ของหมีขาวหมีแกงลิง จำนวน 2,138 nucleotide ไพรเมอร์ Nep_SSR20, Nep_SSR21 และ Nep_SSR22 ออกแบบไพรเมอร์จากฐานข้อมูล

nucleotide ของพืชกินแมลง กลุ่ม *S. purpurea* จำนวน 950 nucleotide และไพรเมอร์ Nep_SSR10 และ Nep_SSR11 ถูกออกแบบมาจากฐานข้อมูล EST ของหมีขาวหมีแกงลิง จำนวน 41 EST (Table 1) โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากฐานข้อมูล EST ของหมีขาวหมีแกงลิง เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ aspartic proteinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยพันธะเปปไทด์ที่เป็นโมเลกุลใหญ่

Table 1 The designing primers from Nepenthaceae and Carnivorous plant for PCR amplification

Species	Database	Primer Design	Primer Amplification
Nepenthaceae	Nucleotide	15	10 (66.67%)
(<i>Nepenthes</i> spp.)	EST	2	0 (0%)
Carnivorous plant	Nucleotide	3	0 (0%)
(<i>S. purpurea</i>)		20	10 (50%)

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SSR

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ SSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ ที่ออกแบบจากฐานข้อมูล nucleotide ของหมีขาวหมีแกงลิง จำนวน 15 ไพรเมอร์ จากฐานข้อมูล EST ของหมีขาวหมีแกงลิง จำนวน 2 ไพรเมอร์ และที่ออกแบบจากฐานข้อมูล nucleotide พืชกินแมลงกลุ่ม *S. purpurea* จำนวน 3 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ ที่ออกแบบจากฐานข้อมูล nucleotide ของวงศ์หมีขาวหมีแกงลิง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหมีขาวหมีแกงลิง *N. mirabilis* ได้โดยไพรเมอร์ Nep_SSR1, Nep_SSR3, Nep_SSR6, Nep_SSR7, Nep_SSR8, Nep_SSR12, Nep_SSR14 และ Nep_SSR18 มีอุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสมที่ 58 องศาเซลเซียส และไพรเมอร์ Nep_SSR5 และ Nep_SSR17 มีอุณหภูมิ

Annealing ที่เหมาะสมที่ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนมีขนาดประมาณ 200-350 คู่เบส เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากฐานข้อมูล nucleotide ของหมีขาวหมีแกงลิงทั้งหมด (Table 2) และพบว่ามีไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ Nep_SSR2, Nep_SSR4, Nep_SSR9, Nep_SSR10, Nep_SSR11, Nep_SSR15, Nep_SSR16, Nep_SSR20, Nep_SSR21 และ Nep_SSR22 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากฐานข้อมูล nucleotide ของหมีขาวหมีแกงลิง จำนวน 5 ไพรเมอร์ ที่ออกแบบจากฐานข้อมูล EST ของหมีขาวหมีแกงลิง จำนวน 2 ไพรเมอร์ และที่ออกแบบจากฐานข้อมูล nucleotide ของพืชกินแมลงจำนวน 3 ไพรเมอร์

Table 2 The ten successful SSR primers that produced a specific band markers for *N. mirabilis*

primers	Primer sequence	Repeat motif	Tm(°C)	Product size (bp)
Nep_SSR1	F 5'-GTTCTAACAAATGGGGTTGACT-3' R 3'-CTATCTTCATTCTCGTCCGATT-5'	(TA) ₅	58	289
Nep_SSR3	F 5'-ATATTTCTATCGCATTGGCCCT-3' R 3'-TATATGGCGCAACCCCTTGTT-5'	(TA) ₅	58	241
Nep_SSR5	F 5'-CAAAAGAGCGATTGGATTG-3' R 3'-TAAAAGTAGAGGGTTTCTTGGG-5'	(TTA) ₆	55	216
Nep_SSR6	F 5'-CTACGAGGCATTTCTGTGAGT-3' R 3'-TACCTACAGCTTCTCCCAATTC-5'	(AT) ₅	58	292
Nep_SSR7	F 5'-CAAAAGAGCGATTGGATTG-3' R 3'-AGAGGGTTTTGGGGTTATC-5'	(TTA) ₆	58	209
Nep_SSR8	F 5'-CAAAAGAGCGATTGGATTG-3' R 3'-GGGTTTCTTGGGTTATCAAA-5'	(TTA) ₄	58	206
Nep_SSR12	F 5'-GCATTCGATTTCGTTGTA-3' R 3'-TAGATGGGAAAATATGCGGA-5'	(TA) ₅	58	350
Nep_SSR14	F 5'-TTCTAACAAATGGGGTTGACTG-3' R 3'-CTCTATCTTCATTCTCGTCCGAT-5'	(TA) ₈	58	294
Nep_SSR17	F 5'-TCAAAAGAGCGATTGGATTG-3' R 3'-GGACCGGAAACTCAAGTAAAG-5'	(TTA) ₆	55	233
Nep_SSR18	F 5'-TTCTAACAAATGGGGTTGACTG-3' R 3'-GACTCTATCTTCATTCTCGTCCG-5'	(TA) ₈	58	298

Note: Tm (°C) = annealing temperature

วิจารณ์

จากผลการออกแบบไพรเมอร์ จากฐานข้อมูล nucleotide ของหม้อข้าวหม้อแกงลิง จำนวน 2,138 nucleotide และ EST จำนวน 41 EST และฐานข้อมูล nucleotide พืชกินแมลง จำนวน 950 nucleotide ด้วยโปรแกรม websat และ primer3 พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ที่สามารถออกแบบได้ ทั้งนี้เป็นเพราะ nucleotide และ EST ที่ใช้เป็นฐานข้อมูลมาจากหม้อข้าวหม้อแกงลิงชนิดพันธุ์ต่างประเทศ ที่พบในสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกัน จึงมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่ำ ส่งผลให้การออกแบบไพรเมอร์มีตำแหน่งลำดับเบสที่เป็นเบสซ้ำจำนวนน้อย และตรงตำแหน่งที่เป็นเบสซ้ำมีลำดับเบสที่เหมือนกัน และบางคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีลำดับเบสที่จำเพาะกับตรงบริเวณหัวและท้ายของตรงตำแหน่งเบสซ้ำของไพรเมอร์ซ้ำกัน ดังนั้นไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จึงมีจำนวนน้อย และจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย

ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวนเพียง 10 ไพรเมอร์ จากไพรเมอร์ที่ออกแบบมาทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และให้รูปแบบดีเอ็นเออยู่ในสภาวะหลากหลายรูปแบบนั้นเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากฐานข้อมูล nucleotide ของหม้อข้าวหม้อแกงลิงทั้งหมด ในขณะที่ไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ ที่ออกแบบจากฐานข้อมูล nucleotide และ EST ของหม้อข้าวหม้อแกงลิง และออกแบบจากฐานข้อมูล nucleotide ของพืชกินแมลงกลุ่ม *S. purpurea* ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เนื่องจากฐานข้อมูล nucleotide ของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์นั้นเป็นลำดับเบสของหม้อข้าวหม้อแกงลิงชนิดต่างประเทศซึ่งเป็นกลุ่ม Highland ในขณะที่หม้อข้าวหม้อแกงลิงในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม Lowland โดย Schwallier และคณะ (2016) รายงานว่าระหว่างหม้อข้าวหม้อแกงลิงกลุ่ม Highland และ

กลุ่ม Lowland พันธุ์กรรมมีความแตกต่างกันทางสถิติ จึงส่งผลให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีความจำเพาะต่ำกับหม้อข้าวหม้อแกงลิงในประเทศไทยที่นำมาทดสอบ และฐานข้อมูลจากพืชกินแมลง *S. purpurea* อาจมีลำดับเบสที่ไม่จำเพาะกับหม้อข้าวหม้อแกงลิงส่วนฐานข้อมูล EST ของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งอาจไม่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย เนื่องจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนมีอยู่หลายยีน เช่น nep-1 (Aspartic proteinase nepenthesin-1), nep2 (Aspartic proteinase nepenthesin-2) และ NaAP3 (Aspartic proteinase 3) ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ Aspartic proteinase หรือ Nepenthesins ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน โดยเอนไซม์ชนิดนี้ที่มีในหม้อข้าวหม้อแกงลิงมีความแตกต่างจากยีนที่สร้าง Aspartic proteinase ในพืชชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (Kadex et al., 2014)

สรุป

การศึกษาพัฒนาและคัดเลือกเครื่องหมาย SSR สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้จำนวน 20 ไพรเมอร์ มีจำนวน 10 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้รูปแบบดีเอ็นเออยู่ในสภาวะหลากหลายรูปแบบสามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมแต่ละชนิดพันธุ์ของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่พบในประเทศไทยได้จำเพาะมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- พัญธิ์ธิตา จิตะเลศวงศ์, สิริภรณ์ ครัวญา, รักษา สุนันทบุรณ และอุรุ ธารนทรี. 2554. การศึกษาชนิดพันธุ์ไม้ "หม้อข้าวหม้อแกงลิง" (*Nepenthes*). ศูนย์ศึกษาและพัฒนาวนศาสตร์ ชุมชนที่ 9 สำนักจัดการทรัพยากรป่าไม้ที่ 9 กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5: 37-59
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Heyden, M.J. and Sharp P.J. 2001. Targeted development of informative Microsatellite (SSR) markers. *Nucleic Acids Research Journal*. 29: 44-49.
- Kadek, A., Tretyachenko, V., Mrazek, H., Ivanova, L., Halada, P., Rey, M., Schriemer, C. D. and Man, P. 2014. Expression and characterization of plant aspartic protease nepenthesin-1 from *Nepenthes gracilis*. *Protein Expression and Purification; Hailand Journal* 95: 121-128.
- Schwallier, R., Raes, N. Boer, H. J., Vos, R. A., Vugt, R. R. and Gravendeel, B. 2016. Phylogenetic analysis of niche divergence reveals distinct evolutionary histories and climate change implications for tropical carnivorous pitcher plants. *A journal of Conservation Biogeography* 22: 97-110.
- Powell, W., Machray, C. and Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Sciences*. 1: 215-222.