

การใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ใน การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes mirabilis*) ในหลอดทดลอง

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of somaclonal variation among in vitro *Nepenthes mirabilis*

จันทร์เพ็ญ ใจชื่อ¹, นิรันดร์ ภูวัน¹, ดวงখেতিตา กาญจนโสภ¹, ชีร ศรีสวัสดิ¹,
สุรพล ฐิตินากุล¹, สรายุทธ อ่อนสนิท¹ และ เยาวพรรณ สอนธิกุล^{1*}

Chanpen Jaisue¹, Nirandon Poowan¹, Duangkhaethita Kanjanasopa¹, Theera Srisawat¹,
Suraphon Thitithanakul¹, Sarayut Onsanit¹ and Yaowaphan Sontikun^{1*}

บทคัดย่อ: หม้อข้าวหม้อแกงลิงเป็นพืชกินแมลงที่มีการพัฒนาของใบเป็นหม้อที่สวยงาม ทำให้มีการนำหม้อข้าวหม้อแกงลิงออกจากธรรมชาติเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้มีจำนวนลดลง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอนุรักษ์และขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงให้ได้จำนวนมาก ทั้งนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกวิธีการที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ แต่การเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วเป็นเวลานานๆ อาจส่งผลให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ดังนั้นในการศึกษานี้จึงตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงในหลอดทดลองด้วยเทคนิค RAPD จำนวน 6 ไพรมเมอร์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. mirabilis* จำนวน 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 นำชิ้นส่วนตาข้างในธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ส่วนวิธีที่ 2 นำตาข้างของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 1 ปี มาชักนำยอด แล้วนำยอดใหม่มาตรวจสอบพันธุกรรมกับต้นเดิม จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยวิธีที่ 1 พบว่า มีไพรมเมอร์จำนวน 2 ไพรมเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัด และเมื่อนำมาตรวจสอบไม่พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น แสดงว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ในขณะที่การตรวจสอบต้นที่เจริญจากต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 ปี พบว่า มีไพรมเมอร์จำนวน 4 ไพรมเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอใน 3 สายต้น จากการตรวจสอบในครั้งนี้ พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคดังกล่าว

คำสำคัญ: การขยายพันธุ์, ความแปรปรวนทางพันธุกรรม, การแปรปรวน

ABSTRACT: *Nepenthes spp.* is dioecious carnivorous plants, which has evolved beautiful pitcher. It has been taken from the natural a lot, which resulting in highly reduction of population. Therefore, conservation and mass propagation of *Nepenthes spp.* is necessary. Tissue culture technique is a proper way for mass propagation. However, the rapid multiplication or long-term cultures may affect to induce somaclonal variation. This study aims to determine somaclonal

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

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

* Corresponding author: sontikul_y@hotmail.com

variation of *in vitro* *N. mirabilis* using 6 RAPD primers in *N. mirabilis* micropropagation with 2 methods. Method one, axillary buds of wild *N. mirabilis* was cultured on ½ MS medium supplemented with 2.0 mg/l BA for 6 weeks. Method two, axillary bud of 1 year *in vitro* *N. mirabilis* were cultured for shoot induction then investigate the genetic variation of micropropagated plant compared to donor plant. *N. mirabilis* cultured in method one showed 2 RAPD primers resulted in clear, well-separated and reproducible fragments with no polymorphism. This indicated that no genetic variation was found in this method. While, evaluation the somaclonal variation of shoot from the 1 year *in vitro* *N. mirabilis* showed 4 RAPD primers amplified product, and revealed polymorphism showing distinctly different banding patterns in the 3 somaclones. This indicated that genetic change was found in this method.

Keywords: Propagation, Somaclonal variation, Variation

บทนำ

หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes* spp.) มีชื่อสามัญว่า Tropical Pitcher Plant หรือ Monkey Cup จัดอยู่ในวงศ์ *Nepenthaceae* เป็นพืชที่มีความหลากหลายมากที่สุดในกลุ่มพืชกินแมลง หม้อข้าวหม้อแกงลิงส่วนใหญ่เจริญอยู่ในบริเวณที่ขาดธาตุอาหาร ดังนั้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจึงมีการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารด้วยการสร้างหม้อดักแมลง ซึ่งสามารถแบ่งตามอายุของพืชได้ 2 ลักษณะ ได้แก่ หม้อล่าง (Lower pitcher) เกิดบริเวณปลายใบใกล้พื้นดิน มีทั้งทรงกลมและทรงกระบอก มีสีส้มและลวดลายสวยงามสะดุดตาไว้ล่อเหยื่อ ส่วนใหญ่ปากหม้อหันเข้าหาสายตาดัง และหม้อบน (Upper pitcher) เกิดเมื่อพืชเติบโตจนเป็นเถาเลื้อยยาว สายตาดังจะม้วนเป็นมือเกาะเพื่อพยุงต้น ส่วนหม้อยอดออกเป็นรูปกรวย ก้นแหลม ปากหม้อหันออกจากสายตาดัง และมักเปลี่ยนเป็นสีเขียวเรียบ (พัชญ์สิดา และคณะ, 2554) โดยปัจจุบันหม้อข้าวหม้อแกงลิงได้รับความนิยมในตลาดไม้ประดับทั้งในและต่างประเทศ ทำให้พืชชนิดนี้ถูกเก็บจากธรรมชาติมาจำหน่ายเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้หม้อข้าวหม้อแกงลิงมีจำนวนลดลงและเป็นพืชที่เกือบอยู่ในข่ายใกล้จะสูญพันธุ์ ดังนั้นจึงต้องขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงเพื่อเป็นการอนุรักษ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์พืชให้ได้จำนวนมากและใช้ระยะเวลาสั้น และมีความสำคัญในการสร้างพืชต้นใหม่ที่มีลักษณะดีเหมือนต้นแม่ทุกประการ

แต่ในทางปฏิบัติ พบว่า บัณฑิตจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ และเมื่อมีการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์จะแสดงลักษณะบางประการที่แตกต่างไปจากเดิม ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นนี้จึงเป็นปัญหาสำคัญของการขยายพันธุ์พืช ที่ต้องการผลิตพืชที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์เป็นจำนวนมากๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความแปรปรวนที่เกิดขึ้นเพื่อคัดเลือกพืชที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์และลดการเกิดความแปรปรวน โดยปัจจุบันการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมนิยมนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอของต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เครื่องหมาย RAPD ถูกนำมาใช้ตรวจสอบความแปรปรวนในพืชหลายชนิด เช่น ชิง (Rout et al. 1998), ยางพารา (ยุพาภรณ์ และ สมปอง, 2556), ตะไคร้หอม (Dey et al. 2015), ปาล์มน้ำมัน (อัญชลี และ สมปอง, 2555) และหม้อข้าวหม้อแกงลิง (Devi et al. 2013) เนื่องจากเครื่องหมาย RAPD เป็นเครื่องหมายที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอของพืชที่ต้องการตรวจสอบ จึงเป็นวิธีการตรวจสอบดีเอ็นเอที่สะดวก ทำได้ง่าย รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบยีนที่ต้นพืชขนาดเล็กได้อย่างถูกต้องแม่นยำ (สุรินทร์, 2552)

การศึกษาในครั้งนี้จึงประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง โดยใช้เครื่องหมาย RAPD เพื่อให้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงต่อไป

วิธีการศึกษา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมีขาวหมีแกงลิง

ชักนำยอดหมีขาวหมีแกงลิง 2 วิธีการ โดยวิธีที่ 1 เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนของต้นหมีขาวหมีแกงลิงในธรรมชาติจำนวน 5 ต้น ต้นละ 5 ช่อ มาฟอกฆ่าเชื้อโดยล้างให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที แล้วแช่ในสารกันราเป็นเวลา 30 นาที ฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 15% เช้าเป็นเวลา 10 นาที และคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10% เช้าเป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งช่อ เชื้อ ส่วนวิธีที่ 2 นำชิ้นส่วนของหมีขาวหมีแกงลิงที่มีการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 1 ปี มาชักนำยอด โดยชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อทั้ง 2 วิธี บนอาหารแข็งสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างไปอ่อนจากยอดที่ชักนำได้ไปสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนหมีขาวหมีแกงลิงจากต้นในธรรมชาติ ต้นในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 1 ปี และจากยอดที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้ง 2 วิธี มาสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงตามวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) โดยนำตัวอย่างใบอ่อน 30-50 มก. ใส่ในหลอดไมโครทิวขนาด 1.5 มล. เติม CTAB บัฟเฟอร์ (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด พลิกหลอดกลับไปมา แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 60 นาที โดยกลับหลอดทุก 15 นาที จากนั้นเติม Chloroform : Isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสให้หลอดใหม่ประมาณ 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 2 รอบ จากนั้นเติมเอทิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 วินาที ดูดส่วนใสออกอีกครั้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติม RNaseA ความเข้มข้น 10 มก. ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหมีขาวหมีแกงลิงโดยใช้เทคนิค RAPD

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนของหมีขาวหมีแกงลิง โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วย ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 6 ไพรเมอร์คือ OPA-11(CAATCGCCGT), OPC-07(GTCCCCGACGA), OPK-19(CACAGGCGGA), OPH-05(AGTCGTCCCC), OPH-13(GACGCCACAC) และ OPK-13(GGTTGTACCC) (นรินทร์, 2557) มีปฏิริยารวมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอตัวอย่างความเข้มข้น 100 ng ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 mM buffer ความเข้มข้น 1X แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.5 mM ดิออกซีนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (dNTP) ความเข้มข้นชนิดละ 0.2 mM และ เอนไซม์ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 1 U

สำหรับปฏิกิริยา PCR ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95°C เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วยขั้นตอน Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาขั้นตอน Annealing ใช้อุณหภูมิ 32°C เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน Extention ใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที และขั้นตอน Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 วินาที ต่อมาขั้นตอน Annealing เพิ่มอุณหภูมิเป็น 38°C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จำเพาะกับดีเอ็นเอแม่แบบมากขึ้น และขั้นตอน Extention ใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที ทั้ง 3 ขั้นตอนนี้ทำซ้ำทั้งสิ้น 40 รอบ ในขั้นตอนสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที อีก 1 รอบ

การตรวจสอบผลผลิตจากเทคนิค PCR

นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ปริมาณ 3 ไมโครลิตร มาตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอ โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5% ในสารละลาย TBE buffer (Tris Base, Boric acid, Na₂ EDTA 0.5 M, pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 V เป็นเวลา 60 นาที นำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง Gel documentation เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏระหว่างแถบดีเอ็นเอของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้ง 2 วิธีกับต้นแม่ของแต่ละวิธี เพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ผลการศึกษา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิง

จากการนำชิ้นส่วนตาข้างของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในธรรมชาติ (วิธีที่ 1) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. พบว่าตาข้างสามารถเจริญเติบโตได้หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีลักษณะเป็นยอดแหลม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ใบเริ่มคลี่ออกจากยอด และสร้างใบสมบูรณ์ 2 ใบในสัปดาห์ที่ 5 (Figure 1)

ส่วนการชักนำยอดจากต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 1 ปี (วิธีที่ 2) พบว่า ตาข้างสามารถเจริญเติบโตได้หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีลักษณะเป็นใบเริ่มคลี่ออกจากยอด 1 ใบ โดยเริ่มสร้างใบสมบูรณ์ 2 ใบในสัปดาห์ที่ 3 และมีการสร้างใบเพิ่มขึ้น 5-6 ใบในสัปดาห์ที่ 4 และใบมีการเจริญเติบโตเต็มที่ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ (Figure 2)

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงในธรรมชาติโดยใช้เทคนิค RAPD

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนของหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างหม้อข้าวหม้อแกงลิงในธรรมชาติ โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 6 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ OPH-13 และ OPK-19 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนและขนาดที่ไม่แตกต่างกัน (Figure 3)



Figure 1 Regeneration of shoots from natural *N. mirabilis* axillary bud on ½MS medium supplemented with 2 mg/L BA for 1 week (A), 2 weeks (B), 3 weeks (C), 4 weeks (D) and 5 weeks (E)

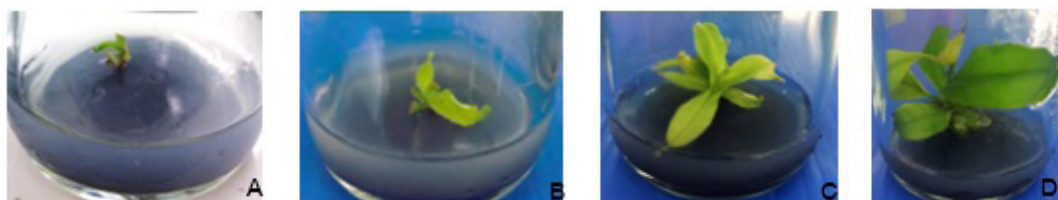


Figure 2 Regeneration of shoots from 1 year in vitro *N. mirabilis* axillary bud on ½MS medium supplemented with 2 mg/L BA for 2 weeks (A), 3 weeks (B), 4 weeks (C), and 5 weeks (D)

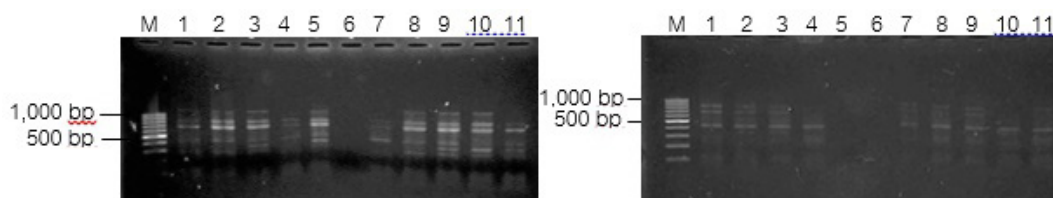


Figure 3 DNA pattern from leaves of *N. mirabilis* in Nature (Lane 1-5), distilled water (Lane 6, Negative control) and micropropagation plant (Lane 7-11) with RAPD technique using primer OPH-13 (A) and OPK-19 (B) (Lane M: 100 bp ladder, Thermo Scientific, USA)

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหน่อข้าวหม้อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต้นหน่อข้าวหม้อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ 1 ปี โดยใช้เทคนิค RAPD

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของหน่อข้าวหม้อแกงลิงด้วยไพรเมอร์ RAPD จำนวน 6 ไพรเมอร์ เมื่อ

ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า มีเพียง 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA-11, OPC-07, OPH-05 และ OPH-13 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหน่อข้าวหม้อแกงลิงได้ และแสดงลักษณะโพลีเมอร์พีทึมของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งจากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ OPA-11 พบว่า เกิดโพลี

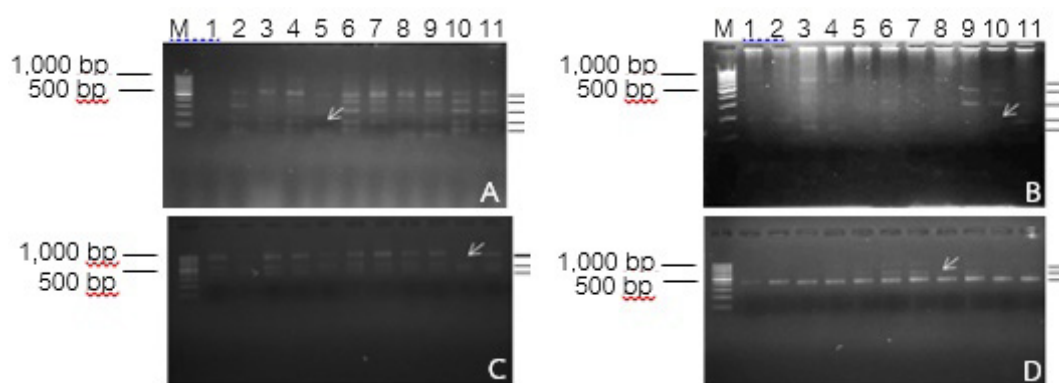


Figure 4 DNA pattern from Mother plant of *N. mirabilis* clone 1-5 (Lane 1, 3, 5, 7 and 10) and micropropagated clone 1-5 (Lane 2, 4, 6, 8-9 and 11) with RAPD technique using primer OPA-11 (A), OPC-07 (B), OPK-13 (C) and OPH-13 (D) (Lane M: 100 bp ladder, Thermo Scientific, USA)

เมอร์พีทึม 1 แถบ ในสายต้นที่ 3 เมื่อเทียบกับต้นในสภาพปลอดเชื้อ 1 ปี จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ OPH-13 พบว่า เกิดโพลีเมอร์พีทึมจำนวน 2 แถบ ในสายต้นที่ 4 เมื่อเทียบกับต้นในสภาพปลอดเชื้อ 1 ปี และจากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ OPC-07 และ OPK-13 พบว่า เกิดโพลีเมอร์พีทึมจำนวน 1 แถบในสายต้นที่ 5 เมื่อเทียบกับต้นในสภาพปลอดเชื้อ 1 ปี (Figure 4)

วิจารณ์

จากการขยายพันธุ์ต้นหน่อข้าวหม้อแกงลิงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า ส่วนของตาข้างมีเจริญเติบโตช้า อีกทั้งส่วนของตาข้างมีซอกหลักระหว่างก้านใบกับลำต้น เป็นแหล่งสะสมของเชื้อต่างๆ ทำให้ยากต่อการทำความสะอาด ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นหน่อข้าวหม้อแกงลิงจาก

ธรรมชาติจึงพบการปนเปื้อนสูง ขึ้นส่วนร่อนน้อย และเจริญเติบโตค่อนข้างช้า เนื่องจากการสร้างสารพิษออกสูงทำให้เกิดการออกซิเดชันของสารพิษออกซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์พืชเพาะเลี้ยง (Castro et al. 2016)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพโรเมอร์ RAPD จำนวน 6 ไพโรเมอร์ พบว่ามี 2 ไพโรเมอร์ ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อห่อข้าวหม้อแกงลิงในธรรมชาติ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Devi et al. (2013) ที่ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นห่อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *N. khasiana* ที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเทคนิค RAPD จำนวน 80 ไพโรเมอร์ พบว่ามี 14 ไพโรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม จากการศึกษายอดที่เกิดจากต้นห่อข้าวหม้อแกงลิงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 ปี พบว่ามี 4 ไพโรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และแสดงลักษณะโพลิมอร์ฟิซึมของแถบดีเอ็นเอ นั่นคือเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Devi et al. (2014) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นห่อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *N. khasiana* ด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมขึ้นในต้นห่อข้าวหม้อแกงลิงรุ่นที่ 3 ที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นนั้นอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของเซลล์ร่างกายที่เรียกว่า ไคเมอรา (Chimera) เนื่องจากมียอดเพียงบางชิ้นส่วนที่มีพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้การเกิดไคเมอราเป็นการเกิดการกลายพันธุ์ที่ไม่คงตัว โดยปรากฏอยู่ระยะเวลานานเท่านั้น ทำให้ลักษณะที่เกิดขึ้นไม่แสดงออกทางสัณฐานวิทยา (คมกฤษณ์ และสุชาติ, 2559)

จากการศึกษาพบว่า ขึ้นส่วนห่อข้าวหม้อแกงลิงในธรรมชาติมีการปนเปื้อนสูงทำให้มีขึ้นส่วนร่อนชีวิตน้อย ดังนั้นควรมีการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อลดอัตราการปนเปื้อน รวมถึงดีเอ็นเอที่สกัดได้พบว่ามีคุณภาพต่ำ เนื่องจากห่อข้าวหม้อ

แกงลิงเป็นพืชที่มีสารประกอบฟีนอลในปริมาณสูง ส่งผลให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีการปนเปื้อนของสารฟีนอลิกในปริมาณสูง ทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์น้อย (เบญจมาศ และคณะ, 2559) อาจส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้นอาจเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยการใช้ Polyvinyl pyrrolidone (PVP) ร่วมกับ CTAB เพื่อลดสารทุติยภูมิ เช่น สารประกอบฟีนอล และโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นสารที่รบกวนปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ในเทคนิคทางชีวโมเลกุล (Mathew et al, 2014)

สรุป

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของห่อข้าวหม้อแกงลิงที่ขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้เทคนิค RAPD จำนวน 6 ไพโรเมอร์ พบว่ามี 2 ไพโรเมอร์ คือ ไพโรเมอร์ OPH-13 และ OPK-19 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมเมื่อเปรียบเทียบระหว่างยอดใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นแม่ในธรรมชาติ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต้นห่อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 ปี พบว่ามี 4 ไพโรเมอร์ ได้แก่ OPA-11, OPC-07, OPH-05 และ OPH-13 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และแสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนของรูปแบบดีเอ็นเอใน 3 สายต้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถนำเทคนิค RAPD มาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นห่อข้าวหม้อแกงลิงในหลอดทดลองได้ ข้อมูลที่ได้นำไปสู่การปรับปรุงวิธีการเพาะเลี้ยงเพื่อไม่ให้เกิดความแปรปรวนต่อไป

คำขอบคุณ

ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี และศูนย์วิทยาศาสตร์และเครื่องมือกลางที่อนุเคราะห์เครื่องมือครุภัณฑ์และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- คมกฤษณ์ แสงเงิน และสุชาดา พัฒนกก. 2559. ผลขององค์ประกอบอาหารต่อการเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกลัยม์ในสกุลหวายต่างโดยเทคนิค TCLs. วารสารพืชศาสตร์ สงขลานครินทร์ 3(2): 70-75.
- นิรันดร์ ภูวน. 2557. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในหลอดทดลองด้วยเครื่องหมาย RAPD. โครงการนักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี, สุราษฎร์ธานี.
- เบญจมาศ สมวงศ์, ดวงแขพิตา กาญจนโสภา, ปาริชาติ นิลวิเชียร, สุรพล สุตินากุล, สรายุทธ อ่อนสนธิ และเยาวพรรณ สนิทกุล. 2559. การสกัดดีเอ็นเอของหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ *Nepenthes mirabilis*. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 3(2): 28-33.
- พัชณีสิตา สิวะเลิศวงศ์, สิริภรณ์ ครัวญา, รักษา สุนันทบุรณ์ และอุฐู เซาว์ทวิ. 2554. รายงานการศึกษานิคมพันธุ์ไม้หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes*). สำนักจัดการทรัพยากรป่าไม้ที่ 9 (ชลบุรี) กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.
- ยุพภรณ์ ศิริโสม และสมปอง เตชะโต. 2556. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นยางพาราที่ได้จากกระบวนการไมโครคัตติงด้วยเครื่องหมาย RAPD. วารสารนราธิวาสราชนครินทร์ 6(2): 117-124.
- สุรินทร์ ปิยะโชติคุณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์ และสมปอง เตชะโต. 2555. การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจเนติกแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD และ SSR. วารสารแก่นเกษตร 40: 157-166.
- Castro, A. H. F., Braga, K. Q. Sousa, F. M., Coimbra, M. C. and Chagas, R. C. R. 2016. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.). Revista Ciencia Agronomica. 47: 143-151.
- Devi, S.P., Kumaria, S., Rao, S.R. and Tandon, P. 2013. *In vitro* propagation and assessment of clonal fidelity of *Nepenthes khasiana* Hook. f.; a medicinal insectivorous plant of India. Acta Physiologiae Plantarum. 35: 2813-2820.
- Dey, T., Saha, S. and Ghosh, P.D. 2015. Somaclonal variation among somatic embryo derived plants - Evaluation of agronomically important somaclones and detection of genetic changes by RAPD in *Cymbopogon winterianus*. South african journal of botany. 96: 112-121.
- 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.

- Mathew, M.K., Jose, S., Rao, Y.S., Gupta, U. and Thomas, J. 2014. Optimization of genomic DNA extraction from fresh and dry leaves of large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.) for diversity analysis. Indian Journal of Biotechnology 13: 221-224.
- Rout, G.R., Das, P., Goel, S. and Raina, S.N. 1998. Determination of genetic stability of micropropagated plants of *ginger* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Botanical bulletin academia sinica journal. 39: 23-27.