การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR จากอ้อย

Genetic Diversity of Bamboo in Thailand as Revealed by Sugarcane EST-SSR Markers

อนุชสา บุญชาญ และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก

ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

ไผ่เป็นพืชที่มีการกระจายตัวในหลายภูมิภาคของโลก ในภูมิอากาศร้อนชื้นอย่างประเทศไทย สามารถพบไผ่ได้หลายสกุลในประเทศ การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่เป็นส่วนสำคัญในจำแนกและวางแผนการอนุรักษ์พันธุ์ไผ่ เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR พัฒนามาจากลำดับเบสที่อนุรักษ์ของยีน สามารถถ่ายโอนข้ามชนิดของพืชที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกันได้ ในการศึกษานี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR จากอ้อยมาใช้ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ที่เก็บมาจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ผลการทดลองพบว่าเครื่องหมาย EST-SSR ของอ้อยจำนวน 53 เครื่องหมาย สามารถใช้ได้ในไผ่ 11 สกุล 32 สปีชีส์ จำนวน 11 เครื่องหมาย มี 8 เครื่องหมายที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic ได้ทั้งหมด 232 แถบ มีค่า Polymorphism Information Content เฉลี่ยเท่ากับ 0.72 แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR ของอ้อยสามารถใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ได้ดี ผลการวิเคราะห์การจัดกลุ่มของตัวอย่างไผ่นั้นพบว่าโดยส่วนใหญ่ไผ่สามารถจัดกลุ่มอยู่ในสกุลเดียวกันและพื้นที่เก็บตัวอย่างใกล้เคียงกัน จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของพันธุกรรมไผ่พบว่าความแปรปรวนของพันธุกรรมไผ่ได้รับอิทธิพลจากความหลากหลายของสปีชีส์ไผ่ที่อยู่ภายในสกุลเดียวกันมากกว่าอิทธิพลจากความแตกต่างของสกุล

คำสำคัญ : ไผ่ ความหลากหลายทางพันธุกรรม อ้อย EST-SSR

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** ku@tu.ac.th

Abstract

Bamboos are widely distributed in the diverse climates around the world, and there are many genera of bamboos in Thailand. Understanding genetic structure and diversity of bamboos is important for identifying and planning for conserving programs. Express sequence tags derived simple sequence repeat (EST-SSR) markers developed from conserved coding sequences show considerable cross–species transferability in related species. In the present study sugarcane EST-SSR markers were selected and used for evaluation of genetic structure and genetic diversity of bamboos collected from different regions within Thailand. Of 53 Sugarcane EST-SSR markers, 11 markers could be transferred into 32 species from 11 genuses of bamboos. A total of 232 alleles were detected from eight polymorphic EST–SSR markers. Transferred EST–SSR markers revealed a high average polymorphism information content of 0.72 indicating that the markers was efficiently utilized for phylogenetic and genetic diversity analyses in bamboo. Cluster analysis reflected geographic distance and related species within genus. An analysis of molecular variance indicated that the genetic variation among species within genus contributed mainly to the total genetic variation of bamboo distributed in Thailand.

Keywords: genetic diversity, bamboo, EST-SSR, sugarcane

1. บทนำ

ไผ่เป็นพืชตระกูลหญ้าที่มีอายุยืนยาวที่สุด บางชนิดมีอายุถึงร้อยปี เป็นพืชที่มีชีพลักษณ์แบบ monocarpic เมื่อออกดอกและผลิตเมล็ดแล้วต้นแม่ก็จะตายไป ไผ่มีถิ่นกำเนิดและการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางตามธรรมชาติ ครอบคลุมเกือบทุกส่วนทั่วโลก ทั้งในเขตหนาว เขตอบอุ่น และเขตร้อนยกเว้นในทวีปยุโรป การกระจายพันธุ์มีมากที่สุดในเขตร้อนทางตอนใต้และตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปเอเชีย คือมีการกระจายพันธุ์ประมาณ 45 สกุล จาก 91 สกุลทั่วโลก จึงนับได้ว่าไผ่นั้นเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิดหนึ่ง [1]

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนจึงมีลักษณะภูมิอากาศ และลักษณะภูมิประเทศที่เหมาะสมแก่การกระจายและการเจริญเติบโตของไผ่ ซึ่งถือว่าเป็นศูนย์กลางการกระจายพันธุ์ไผ่แห่งหนึ่งของโลก [2] เราจึงสามารถพบไผ่ชนิดต่างๆ กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ ด้วยเหตุนี้เองไผ่จึงเป็นพืชที่อยู่คู่กับชีวิตประจำวันของคนไทยมาตั้งแต่สมัยโบราณ คนไทยเรารู้จักการใช้ประโยชน์จากไผ่ โดยการนำมาสนองต่อความต้องการพื้นฐานในด้านต่างๆ เช่น นำหน่อไผ่มาใช้เป็นอาหาร นำเส้นใยที่ได้จากการตีเหยื่อไผ่มาทำเครื่องนุ่งห่ม นำลำไผ่มาทำเป็นที่อยู่อาศัย นำมาสร้างเป็นของประดับตกแต่งบ้าน หรือนำมาทำเป็นของใช้ในครัวเรือน ในปัจจุบันนี้ไผ่ได้กลายเป็นพืชเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของไทย เนื่องจากมีการทำอุตสาหกรรมเกี่ยวกับการแปรรูปและส่งออกไผ่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์จากไผ่ และหน่อไม้สดยังทำรายได้ให้ประเทศเพิ่มมากขึ้นด้วย

ในประเทศไทยนั้นสามารถพบไผ่ประมาณ 15 สกุล [2] ซึ่งคาดว่าอาจมีบางชนิดที่ยังสำรวจไม่พบ เนื่องจากอาจอยู่ในป่าลึก และขาดผู้เชี่ยวชาญในการ

จำแนกพันธุ์ อุปสรรคที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการจำแนกพันธุ์ไผ่คือ การที่ไผ่มีอายุขัยในการออกดอกและผลิตเมล็ดยาวนานและไม่สม่ำเสมอ ไผ่แต่ละชนิดจะออกดอกและผลิตเมล็ดในอายุที่ต่างกัน ทำให้เกิดความลำบากในการเก็บตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ ด้วยเหตุผลข้างต้นทำให้มีการประยุกต์ใช้ความรู้เรื่องเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ ทำให้สามารถจำแนกพันธุ์ไผ่ได้ง่ายขึ้นและมีความแม่นยำมากขึ้น

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR (express sequence tag - simple sequence repeat) เป็นเครื่องหมายที่ได้รับความนิยมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งในพืชและสัตว์ เนื่องจากสามารถพัฒนาได้อย่างรวดเร็ว จากการค้นหา SSR ในฐานข้อมูล EST ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการพัฒนาน้อย เป็นเครื่องหมายที่มีการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วม และเนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่พัฒนาจากส่วนที่เป็นยีนดังนั้นจึงมีลำดับเบสอนุรักษ์ ทำให้สามารถใช้ประโยชน์ข้ามสปีชีส์หรือสกุลได้ดี [3,4] ในการวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ที่สำรวจในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR จากอ้อยซึ่งเป็นพืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับไผ่

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 พืชที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างไผ่ทั้งหมด 11 สกุล 32 สปีชีส์ (ตารางที่ 1) จำนวน 49 ตัวอย่าง เป็นตัวแทนของไผ่ที่เก็บรวบรวมได้ในประเทศไทย จากตัวอย่างที่เก็บมาทั้งหมด 136 ตัวอย่าง จากภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประธานชมรมคนรักไผ่ และคุณสิรภพ อาจรักษา เจ้าของสวนไผ่นานาพันธุ์ โดยกำหนดให้ไผ่แต่ละสกุลเป็นตัวแทนกลุ่มประชากรพื้นฐาน

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนสดของตัวอย่างไผ่แต่ละตัวอย่างมาบดในไนโตรเจนเหลว เพื่อทำให้เซลล์แตกออก และสกัด Genomics DNA ออกมาจากเซลล์โดยวิธีของ Gawel และ Jarnet (1991) [5]

2.3 การคัดเลือกเครื่องหมาย EST-SSR

คัดเลือกจากเครื่องหมาย EST-SSR ของอ้อย จำนวนทั้งหมด 58 เครื่องหมาย [5] มีหน้าที่อยู่ใน 4 กลุ่ม คือ sugarcane metabolism, disease response, abiotic stress response และ growth regulator เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR กับตัวอย่างในเบื้องต้นจากทุกสกุล สกุลละ 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ส่วนประกอบ PCR ปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วย DNA template 20 ng, PCR buffer, dNTPs 4 µM, $MgCl_2$ 10 µM, forward primer 10 pmol., reverse primer 10 pmol., *Taq* DNA polymerase 5U และอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ denature ที่ 94°C นาน 5 นาที และต่อด้วย 35 รอบ อุณหภูมิที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ประกอบด้วย 94°C นาน 1 นาที annealing สำหรับแต่ละเครื่องหมาย นาน 1 นาที extension 72°C นาน 2 นาที และ final extension 72°C นาน 7 นาที วิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เครื่องหมายที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ทั้ง 11 สกุล ถูกนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างไผ่ทั้งหมด นำผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์ด้วย 6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรท แล้วนับจำนวนแถบดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์

ตารางที่ 1 ตัวอย่างไผ่ที่นำมาศึกษาจำนวนทั้งหมด 49 ตัวอย่าง ประกอบด้วยไผ่ 11 สกุล 32 สปีชีส์

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อภาษาไทย	ที่มา	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อภาษาไทย	ที่มา	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อภาษาไทย	ที่มา
Phyllosthachys sp.	ไผ่ลาย	สุพรรณบุรี	*Dendrocalamus hamiltonii*	ไผ่หก (เขาค้อ)	เพชรบูรณ์	*Bambusa* sp.	ไผ่บงหวาน	ด่านช้างสุพรรณบุรี
Phyllosthachys nigra	ไผ่ดำ	ลพบุรี	*Dendrocalamus hamiltonii*	ไผ่หก	ลำพูน	*Bambusa glaucophylla* widjaja	ไผ่เงิน	ปราจีนบุรี
Phyllosthachys makinoi	ไผ่มากินหน่อย	ปราจีนบุรี	*Dendrocalamus strictus* (Roxb.)	ไผ่ซางดอย	ปากช่องนครราชสีมา	*Thyrsostachys siamensis*	ไผ่รวก (ไทรโยค1)	ไทรโยคกาญจนบุรี
Dendrocalamus membranaceus	ไผ่ซางนวล	ไทรโยคกาญจนบุรี	*Dendrocalamus latiflorus Munro*	ไผ่ซางคำ	เชียงราย	*Thyrsostachys siamensis*	ไผ่รวก3	ไทรโยคกาญจนบุรี
Dendrocalamus membranaceus	ไผ่ซางนวลเมล็ด	ไทรโยคกาญจนบุรี	*Dendrocalamus copelandii*	ไผ่มันหมู	กาญจนบุรี	*Thyrsostachys siamensis*	ไผ่รวก2	เพชรบูรณ์
Dendrocalamus membranaceus	ไผ่ซางนวล	สวนเวฬุวันพุทธมณฑล	*Dendrocalamus beecheyana*	ไผ่กิมซุ่ง (หน่อทอง)	ทองผาภูมิกาญจนบุรี	*Thyrsostachys oliveri*	ไผ่รวกดำ	นครปฐม
Dendrocalamus membranaceus	ไผ่ซางนวล	ไร่BN เพชรบูรณ์	*Bambusa mulfiplex*	ไผ่เลี้ยงหวาน (หนองคู2)	มหาสารคาม	*Gigantochloa hosseusii*	ไผ่บงคาย	ปราจีนบุรี
Dendrocalamus auriculata Kurz	ไผ่มัน	สวนเวฬุวันพุทธมณฑล	*Bambusa mulfiplex*	ไผ่เลี้ยงหวาน (หนองคู1)	มหาสารคาม	*Gigantochloa ligulata Gamble*	ไผ่แนะ	ปราจีนบุรี
Dendrocalamus auriculata Kurz	ไผ่มัน	ปราจีนบุรี	*Bambusa mulfiplex*	ไผ่เลี้ยงหวาน	บึงสัมพันธ์เพชรบูรณ์	*Vietnamosasa ciliata (A. Camus)*	ไผ่โจด	เพชรบูรณ์
Dendrocalamus auriculata Kurz	ไผ่เปาะ	ไร่BN เพชรบูรณ์	*Bambusa tulda*	ไผ่บงดำ	มหาสารคาม	*Vietnamosasa pusilla*	ไผ่เพ็ก	ลพบุรี
Dendrocalamus asper Backer	ไผ่ตง	ปราจีนบุรี	*Bambusa tulda*	ไผ่หางช้าง	ทองผาภูมิกาญจนบุรี	*Cephalostachyum virgatum*	ไผ่เสี๊ยะ	ปราจีนบุรี
Dendrocalamus asper Backer	ไผ่ตง	ปราจีนบุรี	*Bambusa oldhamii*	ไผ่หยก (ลี่จู๋)	มก.กาญจนบุรี	*Cephalostachyum pergracile*	ไผ่ข้าวหลาม	มก.กาญจนบุรี
Dendrocalamus asper	ไผ่ตงเขียวศรีปราจีน	ปราจีนบุรี	*Bambusa longispiculatar*	ไผ่ลำมะลอก	ปราจีนบุรี	*Melocanna humillis Kurz*	ไผ่เกรียบ	ปราจีนบุรี
Dendrocalamus sericeus	ไผ่ซางหม่น	ดอยเชียงดาวเชียงใหม่	*Bambusa blumeana*	ไผ่สีสุก	ปราจีนบุรี	*Neohouzeana mekongensis*	ไผ่หลอด	ปราจีนบุรี
Dendrocalamus sericeus	ไผ่ซางหม่นเมล็ด	นครนายก	*Bambusa vulgaris*	ไผ่เหลือง	ปราจีนบุรี	*Schizostachyum brachycladum Kurz*	ไผ่สีทอง	ปราจีนบุรี
Dendrocalamus brandisii Kurz	ไผ่บงใหญ่	ทองผาภูมิกาญจนบุรี	*Bambusa ventricosa*	ไผ่น้ำเต้าใหญ่	ราชบุรี	*Dinochloa scandens (Blume) Kunte*	ไผ่เลื้อย	ไร่BN เพชรบูรณ์
Dendrocalamus brandisii Kurz	ไผ่บงใหญ่	ปราจีนบุรี						

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

เก็บข้อมูลแถบดีเอ็นเอแบบการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (แบบข่มสมบูรณ์) ข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR ของอ้อยทั้งหมด 11 เครื่องหมาย จะถูกนำมาวิเคราะห์ polymorphism information content (PIC) [7] genetic similarity coefficient จากนั้นนำข้อมูล ค่า coefficient ไปวิเคราะห์การจัดกลุ่มและนำมาสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.01 [8] วิเคราะห์ Shannon's Information index จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic โดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 [9] และวิเคราะห์ analysis of molecular variance (AMOVA) ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN 3.1 [10]

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การคัดเลือกเครื่องหมาย EST-SSR

จากเครื่องหมายทั้งหมด 58 เครื่องหมาย เลือกมาจากยีน 4 กลุ่ม คือ sugarcane metabolism, disease response, abiotic stress response และ growth regulator สามารถคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ได้กับตัวอย่างไผ่ทั้งหมด 11 สกุล 32 สปีชีส์ มีจำนวน 11 เครื่องหมาย (ตารางที่ 2) โดยคิดเป็นอัตราการถ่ายโอนเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR จากอ้อย เข้าสู่ไผ่เท่ากับ 18.97% ซึ่งอัตราการถ่ายโอนนี้มีค่าน้อยกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Sharma *et al.* (2008) [11] ที่ใช้เครื่องหมาย EST-SSR จากอ้อย ศึกษาไผ่จำนวน 23 สปีชีส์ มีอัตราการการถ่ายโอนเท่ากับ 75% ทั้งนี้เนื่องในการทดลองนี้ไผ่ที่นำมาศึกษามีความหลากหลายของจำนวนสกุลและจำนวนสปีชีส์มากกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัยดังกล่าว ดังนั้นจำนวนของเครื่องหมายที่สามารถเพิ่มปริมาณแบบจำเพาะในทุกสปีชีส์ของไผ่จึงมีจำนวนน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมาย EST-SSR ของอ้อยที่ได้พัฒนาไว้แล้วก็สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในพืชที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน เช่น ในไผ่ซึ่งเป็นพืชตระกูลหญ้าเหมือนกัน โดยไม่ต้องมีค่าใช้จ่ายในการพัฒนา SSR เพิ่มแต่อย่างใด

3.2 การประเมินเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR

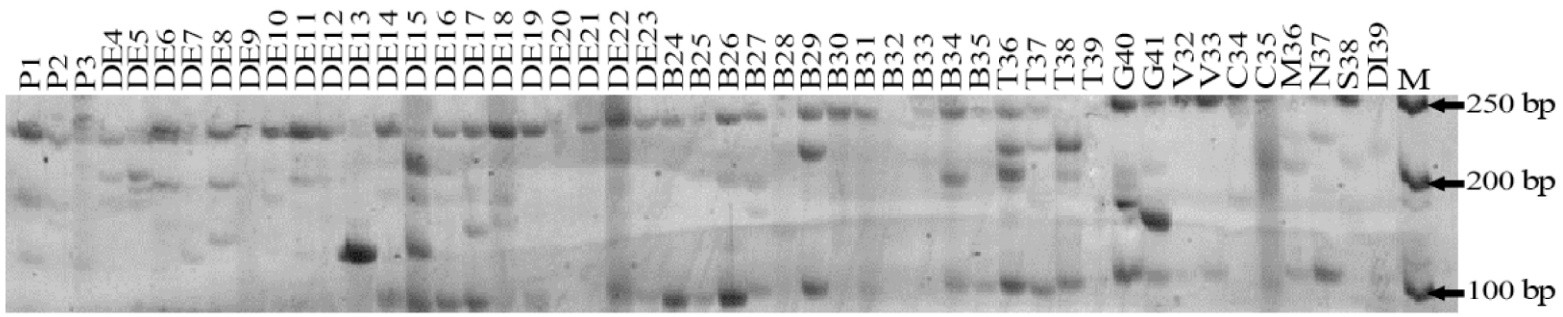
จากเครื่องหมายที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 11 เครื่องหมายนั้นพบว่ามี 8 เครื่องหมาย ที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic คือเครื่องหมาย SEM425, SEM430, SEM432, SEM435, SEM436, SEM447, SEM451 และ SEM455 ส่วนเครื่องหมายที่เหลือคือ SEM426, SEM431 และ SEM454 ไม่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างไผ่ที่นำมาศึกษา ตัวอย่างลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic แสดงในรูปที่ 1

จากตัวอย่างภาพพบว่ามีการเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งแบบที่เป็นแถบเดียวต่อตัวอย่าง สองแถบต่อตัวอย่าง และมี 4 ตัวอย่าง ที่เกิดแถบดีเอ็นมากกว่าสองแถบ ได้แก่ DE15 ไผ่ซางหม่น (*Dendrocalamus sericeus*) B29 ไผ่หยก (*Bambusa oldhamii*) T36 ไผ่รวก (ไทรโยค 1) (*Thyrsostachys siamensis*) และ T38 ไผ่รวก 2 (*Thyrsostachys siamensis*) ลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอแบบมากว่าสองแถบเป็นไปได้ว่าตัวอย่างไผ่เหล่านี้อาจเป็นไผ่ที่เป็นพืชพวก polyploid หรืออาจจะเกิดจากการ duplication ของยีนที่ใช้ศึกษา ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Sharma *et al.* (2008) [11] ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด

ตารางที่ 2 ตารางแสดงรายละเอียดเครื่องหมายที่คัดเลือกได้

Marker	Motif	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Expected EST homology	E-value	PIC
SEM 425	(gcc)5	GTGCCACCAGCAGCAAT	TCTCGTAGCTGCTCGACTTC	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplast precursor (FBPase)	2.00E-26	0.3642
SEM 426	(at)5	TCGAGAGCGGTTTCATCTTT	CTTTCCTGTCAGCCAAGTGA	Sugar transporter family protein	1.00E-14	-*
SEM 430	(cgg)5	TCCGACTACCTCAAGTGCAAG	GACGGCATCTTCTTCTTCTCC	sucrose synthase	7.00E-40	0.4288
SEM 431	(ca)6	CAATTCTCGATCCAAAGAAGGT	CCATGACTCCCAATTGAAGG	alpha-amylase	7.00E-86	-*
SEM 432	(gc)6	CGCGTCCGTAGATTAGTAGCTC	AGCGAGTAGATGTTGATGACCC	Sugar transporter family protein	3.00E-70	0.9306
SEM 435	(ga)5	AGGCTGAGAGAGCAAAGAAAGA	CCTAGGATCCTTCGGGTTTC	stress-induced protein sti1	1.00E-31	0.9157
SEM 436	(tcc)5	GGTCCCATACATAACACAAGCA	TGCATGAAGAAGCTCAGGTG	disease resistance response protein-related/dirigent protein-related	6.00E-45	0.6432
SEM 447	(gc)5	TGAGTTCAGTTCCTTCCCC	AGAACTCCAAGGAGCAGCAG	low temperature and salt responsive protein-like	4.00E-12	0.9622
SEM 451	(cga)6	TAGTACCGCGACAGACCTTTCT	GACTGAAACGCAAGAGAGCAG	cold induced protein-like	3.00E-22	0.9218
SEM 454	(gga)6	GTAACTAGCAGCAACCCTAGCC	ATCCTCTTTTGCCTCCCCT	water-stress protein-like protein	4.00E-16	-*
SEM 455	(gca)5	CCAAGCTCACCGACATCTG	AGGACGGGTACTTGTTGAGGT	dehydration-responsive element binding protein 3	2.00E-37	0.6267
Mean						0.7242

*= เครื่องหมายที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบ Monomorphic



รูปที่ 1 การเกิดแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic ของเครื่องหมาย SEM 455 โดยแถวขวามือสุด M คือ Marker *Hindf* IV และแถวที่ 1 – 49 เป็นตัวอย่างไผ่ทั้งหมด 49 ตัวอย่าง ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1

EST-SSR ของอ้อย Yu *et al.* (2004) [12] ที่ศึกษาเครื่องหมาย EST-SSR ของข้าวสาลี และ Saha *et al.* (2004) [13] ศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR ของหญ้า *Festuca arundinacea* ที่เป็นพืชในวงศ์เดียวกันแล้วพบลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการ duplication ของยีนที่ใช้ศึกษา และการเกิดแถบดีเอ็นเอที่เป็นพืช polyploidy เครื่องหมาย EST-SSR จำนวน 8 เครื่องหมาย ที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic สามารถสร้างจำนวนแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 232 แถบ เมื่อนำมาศึกษาในตัวอย่างไผ่ทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อไพรเมอร์เท่ากับ 29 แถบ (แอลลีล) (ตารางที่ 3) พบว่าค่า PIC ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมาย แต่ละเครื่องหมายมีค่า PIC อยู่ในช่วง 0.3642-0.9622 โดยเครื่องหมายที่มีค่า PIC ต่ำสุดคือ SEM425 มีค่า PIC เท่ากับ 0.3642 ส่วนเครื่องหมายที่มีค่า PIC สูงที่สุดคือ SEM447 มีค่า PIC เท่ากับ 0.9622 เครื่องหมายทั้งหมดมีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.7242 แสดงว่าเครื่องหมาย EST-SSR จากอ้อยสามารถใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ได้ดีเนื่องจากค่า PIC ที่ได้นั้นมีค่าสูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Sharma *et al.* (2008) [11]

ตารางที่ 3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่จำแนกตามสกุลไผ่ทั้งหมด 11 สกุล

Genus	จำนวนตัวอย่าง	Shannon's Information index	จำนวนแถบดีเอ็นเอแบบ Polymorphic
Phyllostachys spp.	3	0.13	22
Dendrocalamus spp.	20	0.29	92
Bambusa spp.	12	0.23	64
Thyrsostachys spp.	4	0.14	29
Gigantochloa spp.	2	0.08	13
Vietnamosasa spp.	2	0.12	20
Cephalostachyum spp.	2	0.16	27
Melocanna spp.	1	0.00	0
Neohouzeana spp.	1	0.00	0
Schizostachyum spp.	1	0.00	0
Dinochloa spp.	1	0.00	0

3.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่

จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่มตัวอย่างไผ่สปีชีส์ต่างๆ ด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ (รูปที่ 2) โดยในแต่ละกลุ่มมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงค่อนข้างสูง อยู่ระหว่าง 0.83-0.91 ทั้งนี้เนื่องจากโดยธรรมชาติส่วนใหญ่การขยายพันธุ์ของไผ่เป็นการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ ซึ่งเป็นการคงจีโนไทป์เดิมของไผ่ไว้ จึงทำให้ มีความคล้ายคลึงกันของจีโนไทป์ภายในสปีชีส์เดียวกันสูง

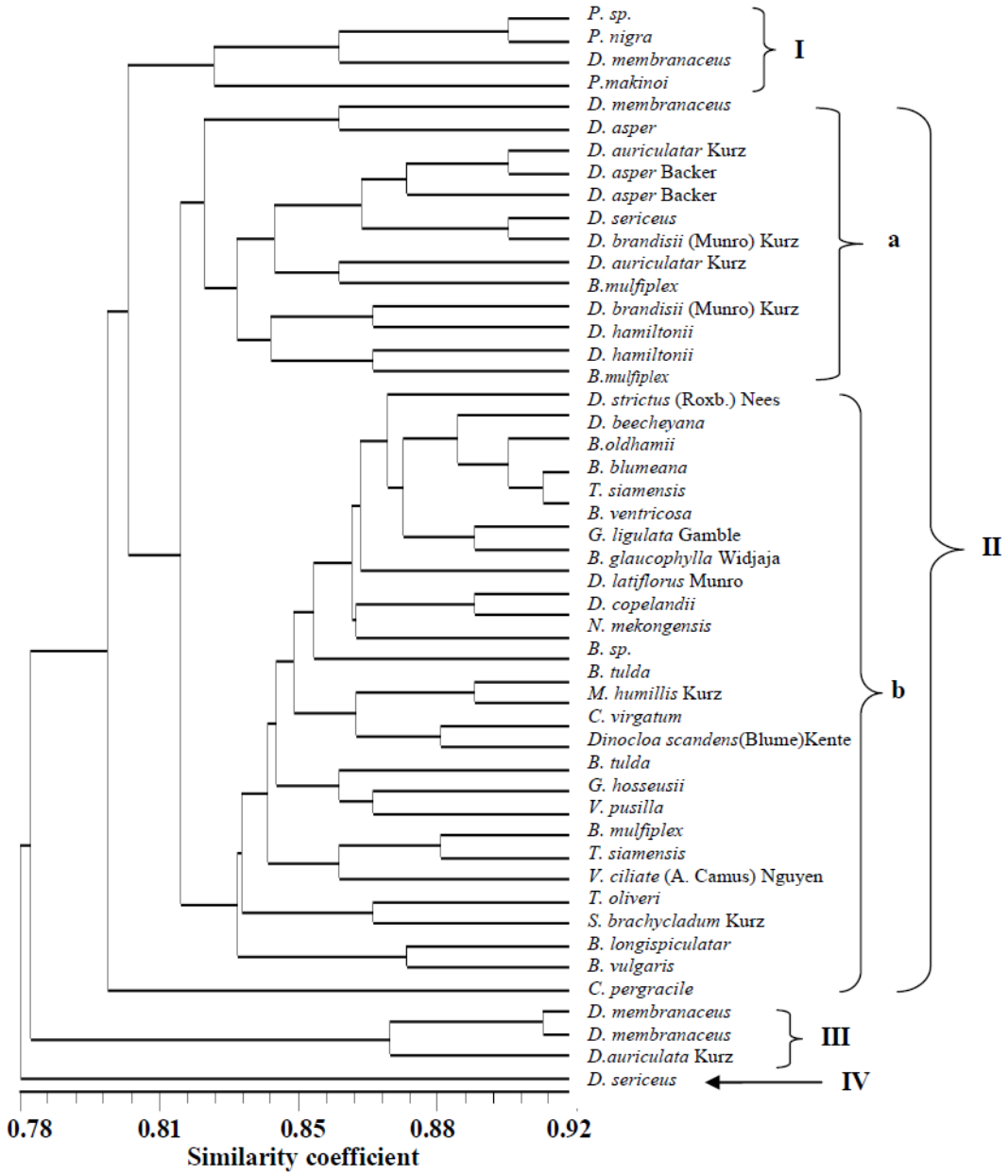
โดยเฉพาะตัวอย่างไผ่ที่เก็บในพื้นที่บริเวณใกล้เคียงกัน

กลุ่มแรก (I) ของตัวอย่างไผ่ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกลุ่มตัวอย่างในสกุล *Phyllosthachys* spp. การจัดกลุ่มนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Sharma *et al*. (2008) [11] ที่มีการจัดกลุ่มตัวอย่างในสกุล *Phyllosthachys* spp. แยกออกจากสกุลอื่นๆได้ชัดเจน ส่วนกลุ่มที่สอง (II) จะประกอบด้วยตัวอย่างในสกุล *Bambusa* spp. สกุล *Cephalostachyum* spp. สกุล *Dendrocalamus* spp. สกุล *Dinochloa* spp. สกุล *Gigantochloa* spp. สกุล *Neohouzeana* spp. สกุล *Schizostachyum* spp. สกุล *Thysostachys* spp. สกุล *Vietnamosasa* spp. และไผ่เกรียบ (*Melocanna humillis* Kurz) โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย a ส่วนใหญ่ประกอบด้วยสกุล *Dendrocalamus* spp. และกลุ่มย่อย b ที่ประกอบด้วยสกุล *Bambusa* spp. สกุล *Cephalostachyum* spp. สกุล *Dinochloa* spp. สกุล *Gigantochloa* spp. สกุล *Neohouzeana* spp. สกุล *Schizostachyum* spp. สกุล *Thysostachys* spp. สกุล *Vietnamosasa* spp. และไผ่เกรียบ (*Melocanna humillis* Kurz) การจัดแบ่งกลุ่มย่อยนี้มีความสอดคล้องกับลักษณะการออกดอกและการกระจายพันธุ์ที่แตกต่างกันของไผ่ และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Watanabe *et al*. (1994) [14] ที่พบว่าไผ่สกุล *Gigantochloa* spp. มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับไผ่สกุล *Bambusa* spp. นอกจากนั้นยังพบว่ามีบางตัวอย่างในสกุล *Dendrocalamus* spp. มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับไผ่ในสกุล *Bambusa* spp. มากกว่าไผ่สปีชีส์อื่นๆในสกุลเดียวกันสอดคล้องกับการศึกษาของ Li (1997) [15] ที่พบไผ่บางสปีชีส์ถูกจัดกลุ่มให้อยู่กลุ่มเดียวกันกับไผ่ในสกุล *Bambusa* spp. กลุ่มที่สามมีเพียงสกุลเดียวคือ *Cephalostachyum pergracile* ส่วนกลุ่มที่สี่ (IV) นั้นประกอบด้วย 3 ตัวอย่าง คือ DE5 ไผ่ซางนวล (*Dendrocalamus membranaceus*) DE6 ไผ่ซางนวล (*Dendrocalamus membranaceus*) และ DE8ไผ่มัน (*Dendrocalamus auriculata* Kurz) และ กลุ่มที่ห้า (IV) คือตัวอย่าง DE15 ไผ่ซางหม่น (*Dendrocalamus sericeus*) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ปลูกจากเมล็ด การที่ไผ่ตัวอย่างนี้ถูกแยกออกมาจากไผ่ชนิดอื่นๆ ในสกุลเดียวกันอาจเนื่องมาจากไผ่ตัวอย่างนี้ได้รับการขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดซึ่งมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงกว่าการปลูกโดยไม่อาศัยเพศ จึงทำให้เกิดความแตกต่างจากไผ่ตัวอย่างอื่นๆ มากที่สุด

เป็นที่น่าสังเกตว่า *Dendrocalamus* spp. สปีชีส์ต่างๆ เป็นสมาชิกในกลุ่มต่างๆ ทั้งสี่กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wong (1995) [16] แสดงให้เห็นว่าไผ่ *Dendrocalamus* spp. มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของสปีชีส์กว้างมาก โดยสปีชีส์ส่วนใหญ่จะมีความคล้ายคลึงกับไผ่ *Bambusa* spp (รูปที่ 2)

3.4 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของไผ่แต่ละสกุล

การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของไผ่แต่ละสกุลโดยการแบ่งกลุ่มประชากรไผ่ออกเป็น 11 กลุ่ม ตามไผ่ทั้งหมด 11 สกุล ค่า Shannon's information index (I) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในแต่ละสกุล สกุลที่มีค่า I สูงสุด คือ สกุล *Dendrocalamus* spp. มีค่า I เท่ากับ 0.29 ส่วนสกุลที่มีค่า I เท่ากับ 0 มี 4 สกุล คือ *Melocanna* spp., *Neohouzeana* spp., *Schizostachyum* spp. และ *Dinochloa* spp. เนื่องจากจำนวนตัวอย่างของทั้ง 4 สกุล นั้นมีสกุลละ 1 ตัวอย่าง



รูปที่ 2 Phylogram แสดงการจัดกลุ่มของตัวอย่างไผ่

เท่านั้น ค่า I นี้ สอดคล้องกับจำนวนแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic และสัดส่วนการเกิดแถบดีเอ็นเอ

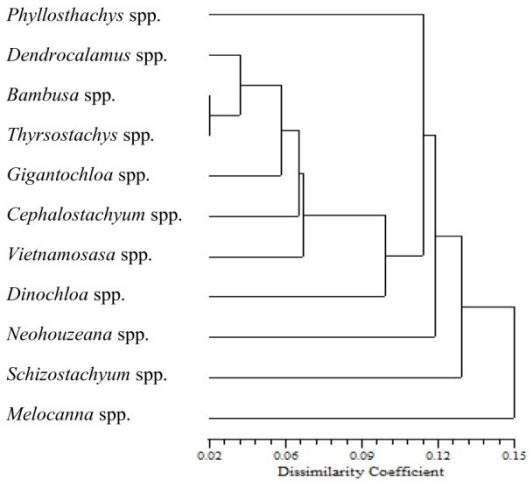
สัดส่วนการเกิดแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic โดยสกุล *Dendrocalamus* spp. นั้นมีจำนวนการเกิดแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic สูงสุด คือ 92 แถบ คิดเป็นสัดส่วนการเกิดแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic สูงสุด 77.97% เนื่องจากสกุล *Dendrocalamus* spp. ที่ศึกษาในการทดลองครั้งนี้มีจำนวนตัวอย่างและจำนวนสปีชีส์มากที่สุดเมื่อเทียบกับไผ่สกุลอื่นที่นำมาศึกษา สกุล *Bambusa* spp. มี

จำนวนการเกิดแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic รองลงมาเท่ากับ 64 มีค่า I เท่ากับ 0.23

ค่า I ของไผ่แต่ละสกุลนอกจากจะสัมพันธ์กับจำนวนตัวอย่างแล้ว ยังสัมพันธ์กับความหลากหลายของพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างและความหลากหลายของพื้นที่ที่เก็บจะพบว่าไผ่สกุล *Dendrocalamus* spp. มีความหลากหลายสูงสุดเนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษา 20 ตัวอย่าง เก็บมาจาก 9 จังหวัดใน 5 ภูมิภาคของประเทศไทย ในกรณีไผ่สกุล *Phyllostachys* spp., *Thyrsostachys* spp., *Gigantochloa* spp., *Vietnamosasa* spp. และ *Cephalostachyum* spp. แม้ว่ามีจำนวนตัวอย่างใกล้เคียงกัน คือ 3, 4, 2, 2 และ 2 ตามลำดับ สกุล *Cephalostachyum* spp. และ *Thyrsostachys* spp. มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 0.16 และ 0.14 ทั้งนี้เนื่องจากไผ่ในสกุล *Cephalostachyum* spp. เก็บมาจากจังหวัดที่มีตำแหน่งที่ค่อนข้างห่างกัน ดังนั้นในการวางแผนการเก็บตัวอย่างไผ่ที่จะใช้ในการอนุรักษ์นั้นจึงควรพิจารณาถึงทั้งจำนวนตัวอย่างและพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างไผ่เพื่อให้ครอบคลุมความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ จาก phylogram (รูปที่ 3) แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของแต่ละสกุลไผ่ พบว่าไผ่สกุล *Bambusa* spp. และไผ่สกุล *Thysostachys* spp. มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด โดยมีค่า dissimilarity coefficient เท่ากับ 0.02 ผลที่ได้นี้ต่างจากการศึกษาของ Jin *et al.* (2000) [17] ที่พบว่าไผ่สกุล *Bambusa* spp. และไผ่สกุล *Thysostachys* spp. ที่ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมต่ำ โดยมีค่า dissimilarity coefficient ประมาณ 0.70 ไผ่ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ กลุ่มตัวอย่างสกุล *Shizostachyum* spp. และกลุ่มตัวอย่างสกุล *Melocanna* spp. ซึ่งมีค่า dissimilarity coefficient ประมาณ 0.13 ลักษณะการจัดกลุ่มตัวอย่างของ Phylogram นี้ใกล้เคียงกับจัดแบ่งกลุ่มตัวอย่างไผ่ทั้ง 32 สปีชีส์ในรูปที่ 2 โดยจัดกลุ่มให้สกุล *Phyllosthachys* spp. แยกออกจากสกุลอื่นเป็นกลุ่มหนึ่งเฉพาะสกุล และจัดรวมไผ่สกุล *Bambusa* spp. สกุล *Cephalostachyum* spp. สกุล *Dendrocalamus* spp. สกุล *Dinochloa* spp. สกุล *Gigantochloa* spp. สกุล *Thysostachys* spp. และสกุล *Vietnamosasa* spp. รวมอยู่ในกลุ่มใหญ่กลุ่มเดียวกัน การจัดกลุ่มไผ่สกุล *Thysostachys* spp. รวมกับไผ่สกุล *Bambusa* spp. และไผ่สกุล *Gigantochloa* spp. นี้คล้ายกับการศึกษาของ Watanabe *et al.* (1994) [14] และ Jin *et al.* (2000) [17] ที่ศึกษาพบว่าไผ่สกุล *Thysostachys* spp. นี้อยู่ใน Subtribe Bambusinae เช่นเดียวกันกับไผ่สกุล *Bambusa* spp. และไผ่สกุล *Gigantochloa* spp. ไผ่สกุล *Melocanna* spp. ถูกแยกออกจากไผ่สกุลอื่นอย่างชัดเจน เนื่องจากไผ่สกุลนี้มีค่า dissimilarity coefficient มากที่สุด ซึ่งการจัดกลุ่มนี้สอดคล้องกับการจัดจำแนกไผ่ตามอนุกรมวิธาน (Ohrnberger, 1999) [17] ที่ศึกษาพบว่าเมื่อจัดจำแนกไผ่ออกเป็นกลุ่มตามสกุล ไผ่สกุล *Melocanna* spp. จะถูกจัดกลุ่มแยกไปรวมกลุ่มอยู่กับไผ่ในสกุล *Ochlandra* spp. ซึ่งเป็นคนละกลุ่มกับไผ่ที่ศึกษาในการทดลองนี้

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยวิธี AMOVA พบว่าค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของไผ่หลายสปีชีส์ที่อยู่ภายในสกุลเดียวกันมีค่า 90% (ตารางที่ 4) ของความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งหมด ขณะที่ความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างสกุลคิดเป็นสัดส่วน 10% ของความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรมของไผ่ในประเทศส่วนใหญ่ เป็นผลจากความหลากหลายทางพันธุกรรม

ของสปีชีส์ ดังนั้นในการอนุรักษ์พันธุกรรมไผ่เพื่อดำรงความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่จึงควรให้ความสำคัญกับการเก็บรวบรวมไผ่หลายๆ สปีชีส์



รูปที่ 3 Phylogram แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของไผ่ 11 สกุล

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ AMOVA

Source of variation	d.f.	Sum of square	Variance components	Percentage of variation
Among Genus	10	139.589	1.0986	10
Within Genus	38	375.717	9.8873	90
Total	48	515.306	10.9859	

Fixation Index FST: 0.1000

4. สรุป

เครื่องหมาย EST-SSR จากอ้อยซึ่งเป็นพืชที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับไผ่ สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ได้ผลอย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการพัฒนาเครื่องหมาย SSR แต่อย่างใด เครื่องหมาย EST-SSR จากอ้อยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความสามารถในการถ่ายทอดโอนมาใช้กับไผ่ต่างสกุลได้เป็นจำนวนไม่มากนัก เนื่องจากความหลากหลายของสกุลและสปีชีส์ไผ่ของการทดลองนี้มีจำนวนมาก ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ในแต่ละสกุลมีความสัมพันธ์กับจำนวนตัวอย่างที่เก็บและความหลากหลายของพื้นที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งเป็นปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการอนุรักษ์พันธุกรรมไผ่ในประเทศไทยให้ดำรงความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอนุรักษ์พันธุกรรมของไผ่สปีชีส์ต่างๆ ที่อยู่ภายในแต่ละสกุล

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

6. เอกสารอ้างอิง

[1] อนันต์ อนันตโชติ, 2534, ไม้ไผ่ประเทศไทยที่น่ารู้จัก, ภาควิชาการจัดการป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[2] รุ่งนภา พัฒนพิบูลย์, บุญฤทธิ์ ภูริยากร และวลัยพร สถิตวิบูรณ์, 2544, ไม้ไผ่ในประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

[3] Kantety, R., Rotal, M., Matthews, D. and Sorrells, M., 2002, Data Mining for Simple Sequence Repeats in Expressed Sequence Tags from Barley, Maize, Rice, Sorghum and Wheat, Plant Mol. Biol. 48: 501-510.

[4] Varshney, R., Thiel, T., Stein, N., Langridge, P. and Graner, A., 2002, *In Silico* Analysis on Frequency and Distribution of Microsatellites in ESTs of Some Cereal Species, Cell Mol. Biol. Lett. 7: 537-546.

[5] Gawel, N. L. and Jaret, R.L., 1991, A Modified CTAB DNA Extraction Procedure of *Musa* and *Ipomoea*, Plant Mol. Bio. Rep. 9: 262-266.

[6] Thipmongkolcharoen, P., Poomipan, P. and Ukoskit, K., 2007, Development of EST-SSR Markers by Data Mining from Sugarcane ESTs, Abstracts of the 6th Asian crop science Association Conference, Bangkok, p. 55.

[7] Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W., 1980, Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms, Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.

[8] Rohlf, F. J., 1998, NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02, Exeter Software, Setauket, New York.

[9] Yeh, F.C., Yang, R.C. and Boyle, T., POPGENE, Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis, Release.

[10] Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L., 2000, Arlequin: A Software for Population Genetics Data Analysis, User Manual ver. 2.000, Genetics and Biometry Lab., Dept. of Anthropology, University of Geneva, Geneva.

[11] Sharma, R.K., Gupta, P., Sharma, V., Sood, A., Mohapatra, T.B. and Ahuja, P.S., 2008, Evaluation of Rice and Sugarcane SSR Marker for Phylogenetic and Genetic Diversity Analyses in Bamboo, Genome 51: 91-103.