ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืช และการประยุกต์ใช้ในการเกษตร

291928

เรือนแก้ว ประพฤติ
นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ
สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทนำ

การตรวจดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล เช่น การตรวจพิสูจน์หาความสัมพันธ์ทางสายเลือดพ่อ-แม่-ลูก ใช้เป็นหลักฐานช่วยสืบหาคนร้ายในคดีฆาตกรรม การระบุบุคคลที่เป็นเหยื่อจากภัยธรรมชาติ วิทยาการนี้ได้รับการยอมรับและถูกนำไปใช้กันมากขึ้นโดยเฉพาะกับมนุษย์และสัตว์แต่หลายท่านอาจจะยังไม่ทราบว่าพืชก็มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเช่นเดียวกับมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ต้นพืช 2 ต้น ดูลักษณะภายนอกแล้วแทบไม่แตกต่างกัน จนบางครั้งเข้าใจว่าเป็นชนิดเดียวกันแต่สามารถบอกความต่างด้วยดีเอ็นเอ พืชที่ชื่อเรียกต่างกันอาจมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน ถ้าท่านเป็นนักปรับปรุงพันธุ์ที่ทุ่มเททำงานด้วยความเพียรพยายามจนได้สายพันธุ์ที่มีลักษณะพึงประสงค์ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะช่วยคุ้มครองสายพันธุ์ของท่านได้อย่างไร

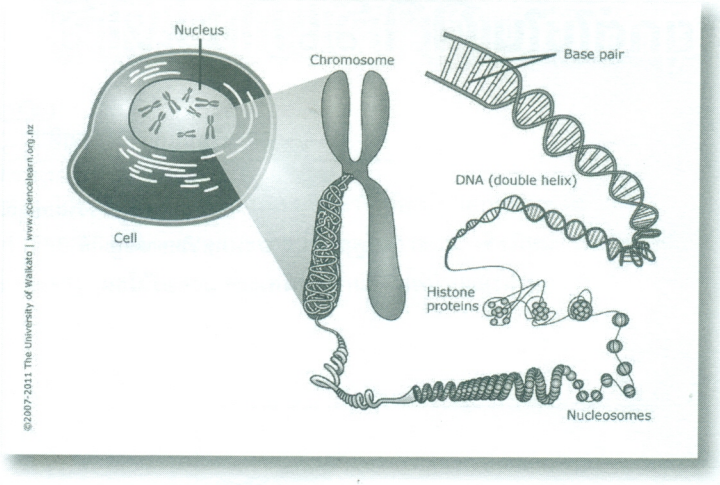
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ย่นระยะเวลาการทำงานให้สั้นลงได้หรือไม่ บทความนี้คงจะเป็นประโยชน์และให้ความกระจ่างแก่ท่านด้วยคำตอบจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอ คือ อะไร มีโครงสร้างและหน้าที่อะไร

ดีเอ็นเอ (DNA) ย่อมาจาก Deoxyribonucleic acid เป็นสารพันธุกรรมประกอบด้วยเบสจำนวนหลายล้านๆ เบสขมวดอัดเป็นแท่งโครโมโซมอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์แต่ละเซลล์ เบสจำนวนมหาศาลประกอบด้วยเบส 4 ชนิด คือ adenine (A), thymine (T), cytosine (C) และ guanine (G) เบสทั้ง 4 ชนิดนี้จะเรียงต่อกันเป็นสาย สายยาวเดี่ยวแต่ละสายนี้เกาะจับกันเป็นลักษณะเส้นคู่ โดยเบส A จับเบส T และเบส C จับเบส G ของเส้นตรงข้ามด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเกลียวคล้ายบันไดวน (double helix)

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดยกเว้นไวรัส มีองค์ประกอบของเบส 4 ชนิดนี้เหมือนกันแต่ลำดับการเรียงตัวของเบสนั้นไม่เหมือนกันมีการสลับตำแหน่งกันอันเป็นเอกลักษณ์เฉพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด รวมทั้งจำนวนและความยาวก็มีความแตกต่างกันด้วย สิ่งมีชีวิตที่วิวัฒนาการสูงดีเอ็นเอในแฮพพลอยด์ (haploid) เซลล์จะยาวกว่าสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำขนาดเล็ก

เช่น ดีเอ็นเอของมนุษย์มีขนาด 3.3 x 10^9 คู่เบส ข้าวโพด 3.9 x 10^9 คู่เบส เชื้อแบคทีเรีย *Escherichiacoli* 4.7 x 10^6 คู่เบส เป็นต้น ลำดับการเรียงตัวของเบสเป็นเสมือนรหัสที่ใช้กำหนดลักษณะทางพันธุกรรมหรือที่เรียกว่ายีน (gene) ดีเอ็นเอหรือรหัสเบสที่ขดขมวดอยู่ในนิวเคลียสมีหน้าที่เป็นแหล่งเก็บข้อมูลหรือรหัสพันธุกรรมและยังทำหน้าที่ส่งผ่านข้อมูลพันธุกรรมจากรุ่นพ่อแม่สู่รุ่นลูกผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสของเซลล์สืบพันธุ์



ภาพที่ 1 เซลล์และโครงสร้างดีเอ็นเอ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืช

เราทราบว่าลายพิมพ์นิ้วมือ (fingerprint) เป็นลักษณะอย่างหนึ่งที่ใช้ระบุเอกลักษณ์บุคคลได้เพราะไม่ซ้ำกันเลยในแต่ละคน ยกเว้นฝาแผดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือ DNA fingerprint คำนี้ทั้งที่ไม่เกี่ยวข้องอะไรกับลายพิมพ์นิ้วเลยแต่ที่นำมาต่อท้ายคงเป็นเพราะต้องการสื่อให้เข้าใจว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอก็สามารถใช้ระบุเอกลักษณ์สิ่งมีชีวิตได้เช่นเดียวกันและยังมีความถูกต้องแม่นยำมากกว่าอีกด้วย

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืชจึงหมายถึง รูปแบบของแถบชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะแต่ละต้น ยกเว้นพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศหรือมาจากโคลน(clone) เดียวกัน หรือเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์หรือเป็นลูกผสมเดียวกันก็จะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชแต่ละต้นจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงไม่ว่าจะอยู่ระยะใดๆ ก็ตาม หรือมาจากส่วนที่ต่างกัน เช่น พืชต้นเดียวกันดีเอ็นเอจากเมล็ดจะเหมือนดีเอ็นเอจากใบ ดีเอ็นเอจากส่วนยอดก็มีรูปแบบเหมือนส่วนราก นอกจากนี้แล้ว ลักษณะทางสิ่งแวดล้อมไม่มีผลต่อรูปแบบของดีเอ็นเอ ดังนั้น ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงมีความแม่นยำ ถูกต้อง มากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้สัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกพืช

ขั้นตอนการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอพืช

การสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอของพืชมี 3 แหล่งได้แก่ 1) นิวเคลียส 2) ไมโตคอนเดรีย และ 3) คลอโรพลาสต์ ส่วนใหญ่นิยมใช้ดีเอ็นเอจากนิวเคลียสหรือเรียกว่า nucleus DNA มาใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพราะขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอค่อนข้างง่าย ให้ข้อมูลพันธุกรรมมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์

ดีเอ็นเอสามารถสกัดจากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ราก ใบอ่อน ลำต้น เมล็ด สามารถเก็บตัวอย่างสดหรือเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำหรืออาจเป็นตัวอย่างอบแห้ง แต่การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสดจะได้ดีเอ็นเอที่ดีทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชทำได้หลายวิธี วิธี CTAB method เป็นวิธีมาตรฐานที่สามารถใช้ได้ผลดีกับพืชทั่วๆ ไป แต่พืชบางชนิดที่ใช้วิธีนี้แล้วได้ดีเอ็นเอคุณภาพต่ำ อาจจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนหรือประยุกต์ขั้นตอนต่างๆ เพิ่มขึ้นรวมทั้งใช้สารเคมีบางชนิดร่วมกับวิธี CTAB อย่างไรก็ตามการสกัดดีเอ็นเอมีหลักการที่คล้ายกันคือการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสด้วยวิธีกล เช่น การบดให้เป็นผงละเอียดในไนโตรเจนเหลว และใช้สารเคมีเช่น SDS ทำลายเยื่อหุ้มนิวเคลียสเมื่อดีเอ็นเอหลุดออกมาปะปนในสารละลายที่ใช้สกัดแล้วจึงทำการแยกเอาดีเอ็นเอออกมาด้วยการเติมเอทานอลหรือไอโซโพรพานอลเพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนแยกออกมา

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction

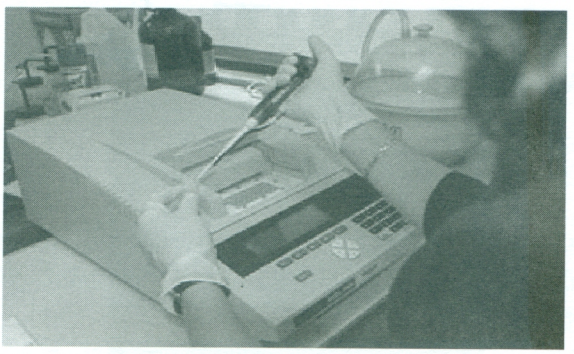
สารละลายดีเอ็นเอที่เราสกัดได้นี้ใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ขั้นตอนต่อมาคือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบให้มีปริมาณมากขึ้น ดีเอ็นเอแม่แบบเพียงไม่กี่โมเลกุลจะถูกเพิ่มปริมาณเป็นล้านๆโมเลกุลด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ปฏิกิริยา PCR นี้เกิดในสภาวะหลอดทดลอง การดำเนินไปของปฏิกิริยาต้องมีไพรเมอร์(primer) หรือนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆขนาดประมาณ 10-20 เบส ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอแม่แบบตรงตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สมกัน ในภาวะที่อุณหภูมิเหมาะสมเอนไซม์ Taq DNA polymerase ทำหน้าที่นำเบสอิสระหรือสาร dNTPs มาต่อเข้ากับสายของไพรเมอร์ให้มีความยาวขึ้น ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นจำนวนหลายรอบอย่างต่อเนื่องกันด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Thermal Cycler) ในแต่ละรอบดีเอ็นเอสายใหม่ก็จะถูกใช้เป็นแม่แบบด้วยเช่นกัน จึงทำให้เกิดดีเอ็นเอสายใหม่จำนวนหลายล้านโมเลกุล

การแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Electrophoresis

ชิ้นส่วนสายดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นซึ่งมีโมเลกุลจำนวนมหาศาลนี้ จะถูกคัดแยกออกจากกันด้วยกระแสไฟฟ้าโดยอาศัยความต่างของขนาด โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาผ่านเข้าสู่ตัวกลางที่เป็นแผ่นวุ้น agarose โดยอาศัยเทคนิค electrophoresis เมื่อปล่อยไฟฟ้ากระแสตรงผ่านตัวกลาง ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะถูกแยกออกจากการกันด้วยความแตกต่างของขนาด ชิ้นส่วนขนาดเล็กจะผ่านตัวกลางได้เร็วกว่า ทำให้เคลื่อนที่ได้ระยะทางไกลกว่าขนาดใหญ่

การย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสง

สามารถมองเห็นรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันได้โดยนำแผ่นวุ้นนี้ไปย้อมในสารที่มีคุณสมบัติเข้าไปจับกับดีเอ็นเอ และสามารถเปล่งแสงให้เห็นได้เมื่อนำมาส่องด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต สารที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอเช่น เอทธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) สารนี้มีความเป็นพิษเพราะเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ ควรใช้อย่างระมัดระวังและกำจัดอย่างถูกต้องเหมาะสม ปัจจุบันมีสาร SYBR ซึ่งมีอันตรายน้อยกว่าให้เลือกใช้



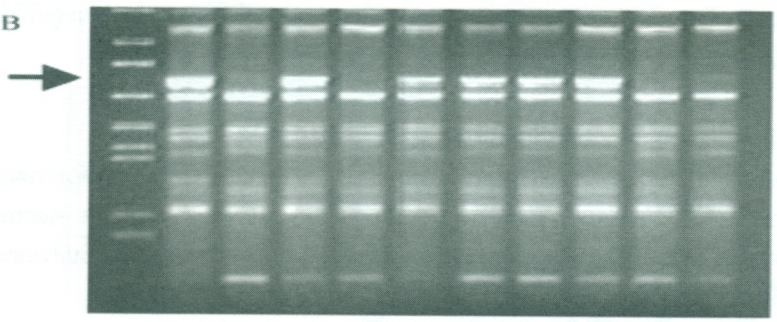
เทคนิคที่ใช้ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอระยะเริ่มแรกใช้เทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เทคนิคนี้จะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดสายดีเอ็นเอให้เป็นท่อนสั้นๆ นำไปแยกออกจากกันในแผ่นวุ้นแล้วย้ายชิ้นดีเอ็นเอนี้ลงแผ่นไนโตรเซลลูโลสจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับชิ้นดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี เพื่อตรวจติดตามรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ วิธีนี้ต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอค่อนข้างมากอีกทั้งมีขั้นตอนยุ่งยากซับซ้อน ประกอบกับเทคนิค PCR ถูกนำมาประยุกต์ใช้แพร่หลายมากขึ้น เทคนิค PCR มีข้อดีคือใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อยมากระดับนาโนกรัมก็เพียงพอเพราะเป็นการเพิ่มปริมาณหรือทำสำเนาดีเอ็นเอให้มีปริมาณมากขึ้นในสภาวะหลอดทดลองที่มีองค์ประกอบหลักที่สำคัญคือ เอนไซม์ Taq DNA polymerase, เบส A, T,C,G (dNTPs) และไพรเมอร์องค์ประกอบทั้งหมดใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ปฏิกิริยาจะเกิดต้องใช้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอระยะต่อมาจึงใช้ PCR กันมากเช่นเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos และคณะ 1995) RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA) (Willium และคณะ 1990) และ Microsatellite DNA เป็นต้น เทคนิคเหล่านี้ใช้หลักการของ PCR เหมือนกันแต่แตกต่างกันที่คุณลักษณะของไพรเมอร์ที่ใช้เท่านั้น

การประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้านการเกษตร

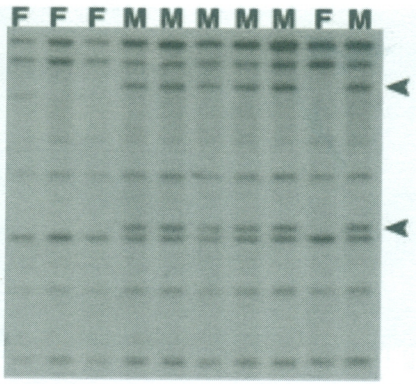
1. ตรวจความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ลูกผสม เช่นเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมต้องไม่มีพันธุ์อื่นปะปน

2. ใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อตรวจติดตามลักษณะที่ต้องการ เช่นต้านทานโรค แมลงจะช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ โดยดูจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏซึ่งสามารถตรวจติดตามได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า ไม่จำเป็นต้องรอเพื่อดูลักษณะตอนต้นโตหรือจนกว่าจะให้ผลผลิต



ภาพที่ 3 ลูกศรชี้เป็นแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคใบจุดในถั่วเหลือง

3. ใช้ระบุเพศพืชบางชนิด เช่น หน่อไม้ฝรั่ง มะละกอ พืชตระกูลปาล์ม เช่น ตาล อินทผาลัม จะไม่สามารถระบุเพศได้ ต้องรอจนกระทั่งออกดอก เช่น มะละกอเกษตรกรจะสุ่มปลูกไปก่อน เมื่อต้นโตและรู้แน่ชัดแล้วจะตัดต้นตัวผู้ทิ้งไป ต้นอินทผาลัมต้องรอจนกระทั่งออกดอกต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3 ปี การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรวจสอบยีนที่กำหนดเพศได้จะช่วยทำให้ประหยัดต้นทุนและเวลา ไม่ต้องรอจนต้นโตซึ่งใช้เวลานาน

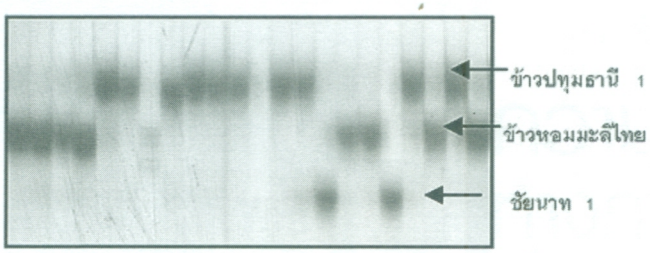


ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในต้นเพศผู้เท่านั้น

4. คัดแยกต้นกล้าที่เกิดจากการผสมตัวเองออกจากลูกผสมแท้ ช่วยให้ย่นระยะเวลา ไม่ต้องปลูกในแปลงทดสอบเพื่อรอดูลักษณะตอนต้นโต

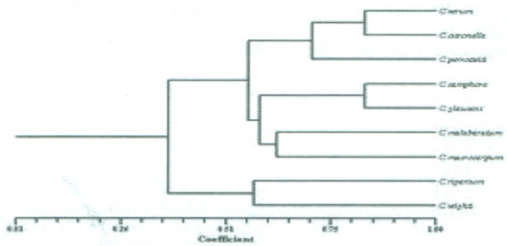
ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอขนาด 1193 คู่เบส แสดงเอกลักษณ์ยีนจากต้นพ่อสู่ต้นลูกผสม (1-4) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นพ่อ (5-10) ลูกผสม และต้นแม่ (11-20)

5. การส่งออกข้าวสารพันธุ์หอมมะลิ 105 ซึ่งมีคุณภาพดี มีราคาสูง มักมีปัญหาการปลอมปนจากข้าวสายพันธุ์ที่มีคุณภาพต่ำกว่า ไม่สามารถแยกความแตกต่างด้วยลักษณะทางกายภาพ แต่บ่งบอกได้ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ



ภาพที่ 6 แถบดีเอ็นเอเครื่องหมายของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ข้าวหอมมะลิไทยและพันธุ์ชัยนาท 1

6. ใช้ศึกษาประวัติและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 7 แสดงค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มของพืช Cinnamomum species ตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

นอกจากนี้แล้วยังใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นหลักฐานประกอบการขึ้นทะเบียนขอรับรองพันธุ์กับกรมวิชาการเกษตร ศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์หรือสืบค้นประวัติของสายวิวัฒนาการในสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมใช้ตรวจยืนยันสายพันธุ์พืชสมุนไพร เนื่องจากพืชสมุนไพรไทยมีความหลากหลายสายพันธุ์มากมีลักษณะสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน บางครั้งอาจสร้างความสับสนในการนำมาใช้ การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาตรฐานเฉพาะของสายพันธุ์ที่ให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพสูง ทำให้การใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรมีความถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

สรุป

ปัจจุบันลายพิมพ์ดีเอ็นเอนับเป็นเครื่องมือที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้การเกษตรมีความเจริญก้าวหน้าอย่างรวดเร็วมีการนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอไปใช้อย่างกว้างขวางไม่เฉพาะกับพืชเท่านั้นยังรวมถึงด้านประมงและปศุสัตว์ เพราะลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้ข้อมูลทางพันธุกรรมได้ถูกต้องแม่นยำกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เอกสารอ้างอิง
MAEJO VISION

Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V. Lee and A. Hornes. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Res. 23: 4407-4414.

Williums, J., A.R. Kubelik, J.L. Kenneth, J.A. Rafalski and V.T. Scott.1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res. 18:6531-6535.

ขอขอบคุณ

ภาพประกอบบทความ

http://www.sciencelearn.org.nz/Contexts/Uniquely-Me/Sci-Media/Images/Cell-chromosomes-and-DNA

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945203003753

http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1999/v4-338.html

http://www.currentscience.ac.in/Downloads/article_id_093_04_0462_0463_0.pdf

http://dnatec.kps.ku.ac.th/index.php?option=com_content&view=article&id=129:2011-06- 18-07-47-11&cat-id=28:service-dnatec&Itemid=116

http://www.ethnoleaflets.com/leaflets/rapd.htm