การตรวจลูกผสมข้ามชนิดของถั่วอาหารสัตว์ระหว่าง *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade กับ *Centrosema pubescens* และ *Centrosema macrocarpum* ด้วยเทคนิค RAPD

Identification of Interspeccific Hybrids between *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade with *Centrosema pubescens* and *Centrosema macrocarpum* using RAPD Technique

สุดารัตน์ สกุลคู[1] อเนก โตภาคงาม[1] สุชีลา เตชะสงศ์เสถียร[1] ชุติพงศ์ อรรคแสง[1] และ สุมนทิพย์ บุนนาค[2]

Sudarath Sakhunkhu[1], Anake Toparkngarm[1], Suchila Techawongstean[1], Chutipong Akrasang[1] and Sumonthip Booknak[2]

Abstract

Study on mechanism and methods to overcome barriers in interspecific crossing between *Centrosema passcuorum* cv. Cavalcade with *Centrosema pubescens* and *Centrosema macrocarpum* was carried out at Khon Kean University during September 2002-November 2004. The interspecific hybrids from both cross and reciprocal cross were quite similar until we could not classified from the mother plants. RAPD technique was applied for their identification with the modified method of Keb-llanes et al (2002). DNA extraction give the good DNA solution of all hybrid and inbred progeny in this experiment. The combination of 2 primers gave difference banding pattern of the parents and hybrid and reciprocal hybrids.

บทคัดย่อ

จากการศึกษากลไกลในการผสมข้ามชนิด และการแก้ไขอุปสรรคในการผสมข้ามชนิดของถั่วอาหารสัตว์ระหว่าง *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade กับ *Centrosema pubescens* และ *Centrosema macrocarpum* ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างกันยายน 2545 - พฤศจิกายน 2547 พบว่าลูกผสมที่ได้มีความแปรปรวนของลักษณะปรากฏและมีลักษณะใกล้เคียงกับลักษณะของต้นแม่จนไม่สามารถจำแนกลูกผสมกับต้นแม่ได้ชัดเจน จึงต้องทดสอบลูกผสมโดยการเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าการสกัด DNA ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Keb-llanes et al. (2002)ให้สารละลาย DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ Primer 2 ชนิดร่วมกันในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง พันธุ์ พ่อแม่ และลูกผสมได้

[1]ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

[1]Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

[2]Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University

บทนำ

การจัดจำแนกพืชโดยใช้ลักษณะ morphology ในพืชบางชนิดอาจได้ผลไม่ถูกต้องดังจะเห็นได้จากการศึกษาของ Salomon and Luu (1992) ใน genus *Elemus.* L., พบว่า species ที่จัดอยู่ใน section เดียวกันตามลักษณะ morphology มี basic genome ที่แตกต่างกันในขณะที่ species ที่มี genome เหมือนกันจัดอยู่ใน 2-3 section เช่นเดียวกับ เซนโตรซีมา ที่การจัดจำแนกยังไม่ชัดเจน การผลิตลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade ซึ่งเป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีผลผลิตใบมาก ใบไม่หลุดร่วงง่าย เหมาะสำหรับใช้เป็นพืชอาหารสัตว์ทั้งประเภทอาหารหยาบสด และแห้ง มีลักษณะประจำ species เป็นพืชฤดูเดียว (annual) อ่อนแอต่อโรคและแมลง กับ *Centrosema pubescens* และ *Centrosema macrocarpum* ซึ่งมีลักษณะเป็นพืชข้ามปี และต้านทานต่อโรค แมลงได้ดีกว่า เพื่อคัดเลือกพืชอาหารสัตว์ชนิดใหม่ที่มีคุณภาพดีเหมาะสมต่อการผลิตปศุสัตว์ในประเทศไทย ซึ่งพบว่าลูกผสมที่ได้โดยทั่วไปจะมีลักษณะส่วนใหญ่ที่ใกล้เคียงกับพืชพันธุ์แม่การใช้เทคนิค RAPD สำหรับตรวจสอบลูกผสมจะช่วยให้ทราบผลได้ชัดเจนขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. การสร้างลูกผสม ปลูก *C. pascurum* cv. Cavalcade, *C. pubescens* และ *C. macrocarpum* แล้วผสมด้วยวิธี hand pollination ดังนี้ *C .pascurum* cv. Cavalcade x *C. pubesces, C. pubescen* x *C. pascuorum* cv. Cavalade, *C. passcuorum* cv. Cavalade x *C. marcrocarpum*, *C. marcrocarpum* x *C. pascuorum* cv. Cavalade, *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pascuorum* cv. Cavalcade, *C. pubescens* x *C. pubesces* และ *C. marcrocarpum* x *C. marcrocarpum* จากนั้นปลูกลูกผสมที่ได้เพื่อทดสอบลูกผสมข้ามชนิดเปรียบเทียบกับลูกผสมตัวเอง

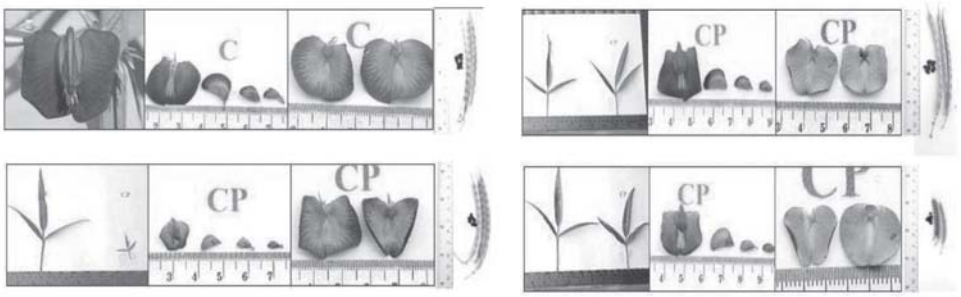
2. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของลูกผสมด้วยเทคนิค RAPD

2.1 การสกัด DNA ทดลองสกัด DNA ของพืชลูกผสมที่ได้ด้วยวิธีการสกัด DNA 3 วิธีคือ ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1990) ดัดแปลงจาก Graham et.al., 1994 และดัดแปลงจาก Keb-llanes et.al., 2002

2.2 การตรวจสอบแบบแผนของแถบ DNA ด้วยเทคนิค RAPD โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ใช้ oligonucleotides random primer ขนาด 10 nucleotides จำนวน 8 ชนิดจาก Operon Technologies คือ A 02 (TGCCGACTG) A07(GAAACGGGTG) A09 (GGGTAACGCC) A18(AGGTGACCGT) A20 (TTGCGATCC) G08 (TCACGTCCAC) G10(AGGGCCGTCT) G11 (TGCCCGTCGT) แล้วตรวจสอบแบบแผนของแถบ DNA ด้วยเทคนิค Gel-electrophoresis โดยใช้ agarose gel และย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจดูด้วย Gel-documentator เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพ

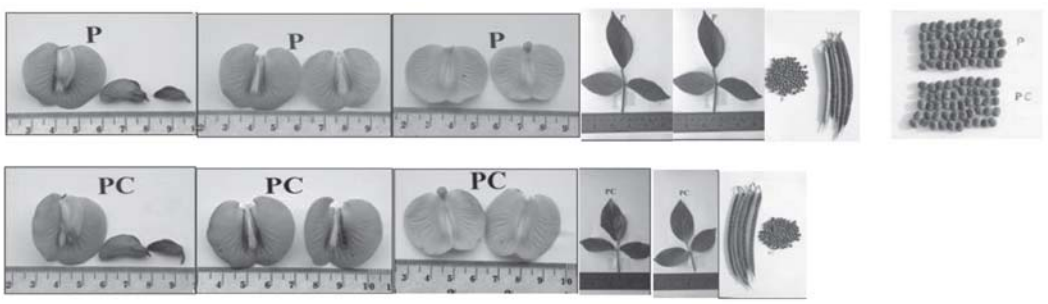
ผลการศึกษา

การผสมเกสรคู่ผสมละ 154 ต้นพบว่าในคู่ผสมระหว่าง C. *pubescens* x C. *pascuorum* cv. Cavalcade หลังการผสมเกสร 10 วันฝักที่ได้จะฝ่อแห้งไป ซึ่งสามารถแก้ไขได้ด้วยการฉีดพ่นสาร GA อัตรา 10 ppm ที่ขั้วฝัก และที่ฝักทุก 2 วัน หลังการผสมเกสรทำให้ฝักสามารถเจริญเติบโตเป็นฝักที่สมบูรณ์ได้ จากการตรวจสอบลักษณะปรากฏ ลูกผสมที่ได้ มีลักษณะของรูปร่างและขนาดของใบ ดอก ฝัก และเมล็ดทั้งลูกผสมข้ามชนิดและลูกผสมตัวเองของพันธุ์ พ่อ-แม่ พบว่าลูกผสมข้ามชนิดในทุกคู่ผสมมีลักษณะส่วนใหญ่ใกล้เคียงกับ ลูกผสมตัวเองของต้นแม่ดังแสดงใน Fig. 1



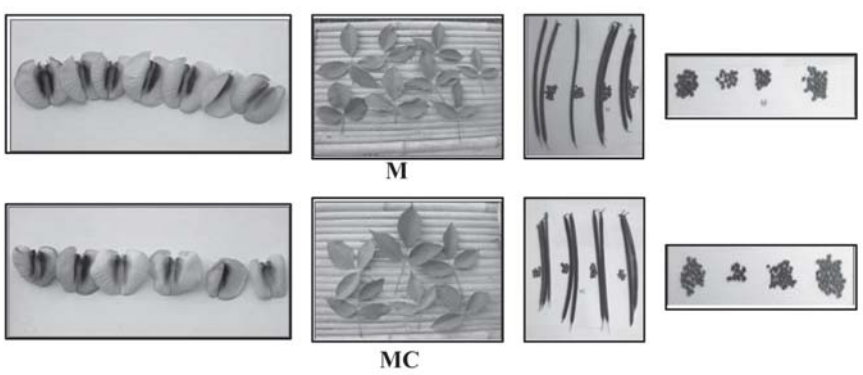
C : *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pascuorum* cv. Cavalcade **CP :** *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pubescens*

Fig. 1 **Leafs, flowers and pods of *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pubescens* and *C. pascuorum* cv.Cavalcade x *C. pascuorum* cv. Cavalcade**



P : *C. pubescens* x *C. pubescens* PC : *C. pubescens* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade

Fig. 2 **Leafs, flowers and pods of *C. pubescens* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade and *C. pubescens* x *C. pubescens***



M : *C. marcrocarpum* x *C. marcrocarpum* MC : *C. marcrocarpum* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade

Fig. 3 **Leafs, flowers and pods of *C. marcrocarpum* x *C. marcrocarpum* and *C. marcrocarpum* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade**

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของลูกผสมด้วยเทคนิค RAPD พบว่าการสกัด DNA ทั้ง 3 วิธี ให้ผลต่างกันคือ วิธีการดัดแปลงจาก Dolye and Dolye (1990) พบว่าสารละลาย DNA ที่ได้จะมีสีที่แตกต่างกันไปตามชนิดของพืชโดยสารละลาย DNA ที่ได้จาก *C.pubescens* ผสมตัวเอง จะมีสีเข้มที่สุดรองลงมาคือ *C.pubescens* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade ส่วน *C.pascuorum* cv. Cavalcade ผสมตัวเองสารละลาย

DNA จะใส (Fig. 4) เป็นวิธีที่ให้สารสกัด DNA ที่มีค่าความบริสุทธิ์น้อยที่สุดคือมีค่าเฉลี่ย 1.58 ปริมาณ DNA 24.84μg/μl ส่วนวิธีการดัดแปลงจาก Graham et.al., (1994) ให้ค่าความบริสุทธิ์เฉลี่ย 1.78 ปริมาณ DNA 56.23 μg/μl ส่วนวิธีการที่ดัดแปลงจาก Keb-Ilanes et al.(2003) จะได้สารละลาย DNA ที่มีค่าความบริสุทธิ์สูงที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ย 1.90 ปริมาณ DNA 36.65 (Table1)

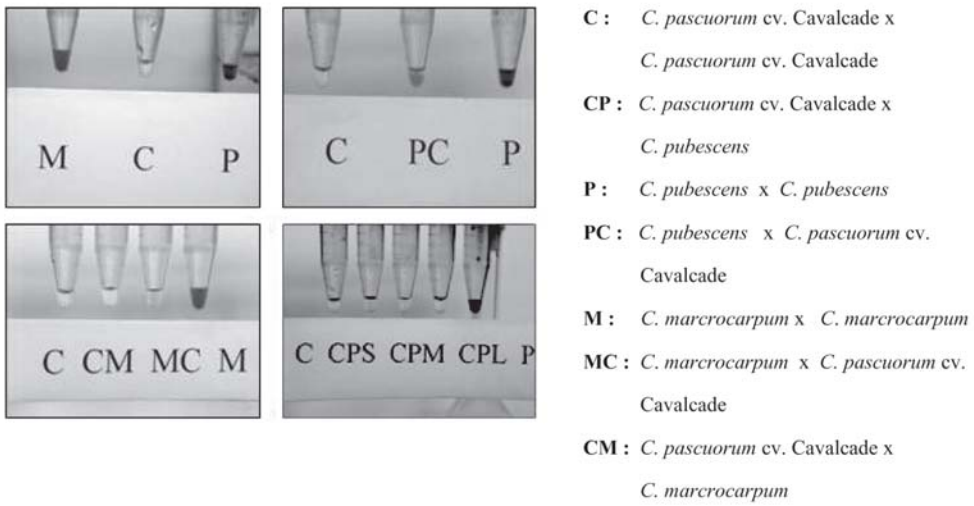


Fig. 4 DNA solution of Centrosema hybrids which extracted by modification method of Dolye and Dolye (1990)

Table 1 Purity and quanlity of DNA from 3 modified extraction methods

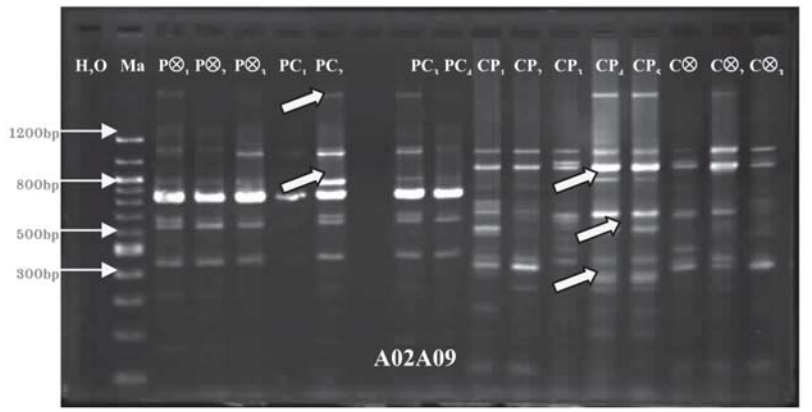
Plant	Extraction methods					
	Dolye and Dolye (1990)		Graaham et.al (1994)		Keb-Ilanes et al. (2002)	
	Purity	DNA(μg/μl)	Purity	DNA(μg/μl)	Purity	DNA (μg/μl)
C	1.68	23.63	1.86	51.47	1.95	47.03
P	1.25	5.93	1.56	10.23	1.92	19.23
M	1.64	35.90	1.73	48.57	1.92	21.23
CP	1.73	29.80	1.86	110.33	1.85	58.33
CM	1.77	43.60	1.86	91.55	1.94	63.10
PC	1.37	8.40	1.62	10.00	1.86	28.80
MC	1.62	26.63	1.97	71.43	1.88	18.83
Mean	1.58	24.84	1.78	56.23	1.90	36.65

การตรวจสอบแบบแผนของ DNA ด้วยเทคนิค RAPD จากการศึกษาลายพิมพ์ DNA โดยใช้ primer ของ operon ขนาด 10 nucleotide จำนวน 8 ชนิด พบว่ามีเพียง 4 ชนิดคือ A18, A09, A07 และ A02 ที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ของถั่วลูกผสมเซนโตรซีมาได้ โดยการใช้ primer ชนิดเดียว สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างลายพิมพ์ DNA ของลูกผสมข้ามชนิด กับลูกผสมตัวเองของต้นพ่อ หรือแม่ได้ แต่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ DNA ระหว่างลูกผสมข้ามชนิด กับลูกผสมตัวเองของพันธุ์พ่อและแม่ได้จึงทดลองใช้ primer 2 ชนิดร่วมกัน (combination primer)ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ปริมาณสาร 25 μ ใน 1 หลอด microtube ประกอบด้วย

PCR buffer	1	x
Mg Cl_2	2.5	mM
dNTP mix	0.2	mM
primer(A)	17.5	pmol
primer(B)	17.5	pmol
tag polymerase	1.125	unit

เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ครบ 25 μl นำไปเข้าเครื่อง PCR ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย gel electrophoresis ด้วย 2% agarose gel ใน 1.5 x TBE buffer พบว่าการใช้ primer A02 ร่วมกับ primer A09 พบแถบ DNA ของ PC1 และ มีตำแหน่งตรงกับแถบ DNA ของ CP4, CP4 และ C⊗2 ที่ตำแหน่งของแถบ DNA ที่มีน้ำหนัก โมเลกุลมากกว่า 1200 base pairs นอกจากนั้นยังพบแถบ DNA ที่ตำแหน่งประมาณ 1000 base pairs ในลายพิมพ์ DNA ลูกผสมข้ามชนิดของ PC1, CP4 และ CP5 และพบแถบ DNA ที่ต่ำกว่า 300 base pair ใน CP2, CP4 และ CP5 ที่ไม่ปรากฏชัดเจนในลายพิมพ์ DNA ของลูกผสมตัวเองของถั่วคาวาเคด และถั่วพิวเบสเซนส์ (Fig. 5)ในการเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA ระหว่างลูกผสมระหว่างถั่วคาวาลเคดกับถั่วแมคโครคาปัมเปรียบเทียบกับลูกผสมตัวเองของถั่วคาวาลเคด และถั่วแมคโครคาปัม พบแถบ DNA ที่ตำแหน่งประมาณ 600 base pairs (MC3) 900 base pairs (MC4) 1000 base pairs (MC5) ที่ไม่ปรากฏในกลุ่มถั่วแมคโครคาปัมผสมตัวเองแต่ใกล้เคียงกับแถบ DNA ที่พบในกลุ่มถั่วคาวาลเคดผสมตัวเอง และพบแถบ DNA ที่ตำแหน่งประมาณ 400 base pairs ใน CM1 ในช่วง 400 base pairs ถึง 300 base pairs ใน CM2 ที่ไม่พบในลายพิมพ์ DNA ของกลุ่มถั่วคาวาลเคดผสมตัวเอง (Fig. 6) การใช้ primer A07 และ A09 พบแถบ DNA ของลูกผสมข้ามชนิดที่ปรากฏในตำแหน่งเดียวกับแถบ DNA ของลายพิมพ์ DNA ของลูกผสมตัวเองของพันธุ์พ่อและแม่ชัดเจน(ประมาณ 850 base pairs, 500 base pairs) แต่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างลูกผสมระหว่างถั่วคาวาลเคดถั่วแมคโครคาปัมได้อย่างชัดเจน (Fig. 9)

ในขณะที่การใช้ primer A07 และ A18 ในการเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA ของลูกผสมระหว่างถั่วคาวาลเคดกับถั่ว พิวเบสเซนส์ เปรียบเทียบกับลูกผสมตัวเองของถั่วและถั่วพิวเบสเซนส์ พบว่ามีแถบ DNA ที่ตำแหน่งประมาณ 300 base pairsใน PC1, PC2 และ PC3 ที่ใกล้เคียงกับแถบ DNA ที่พบในกลุ่มของถั่วคาวาลเคดผสมตัวเอง ในกลุ่มของลูกผสมของถั่วคาวาลเคดผสมถั่วพิวเบสเซนส์ พบแถบ DNA ที่ตำแหน่ง 600 base pairs ใน CP2, CP3 และ CP4 ที่ไม่พบในลายพิมพ์ DNA ของถั่วพิวเบสเซนส์ และถั่วคาวาลเคดผสมตัวเอง (Fig. 8) ในขณะที่การใช้ primer A02 และ A18 ไม่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างลายพิมพ์ DNA ของถั่วคาวาลเคดผสมตัวเอง ถั่วคาวาลเคดผสมกับถั่วพิวเบสเซนส์ ถั่วพิวเบสเซนส์ผสมกับถั่วคาวาลเคด และ ถั่วพิวเบสเซนส์ผสมตัวเอง (Fig. 7)

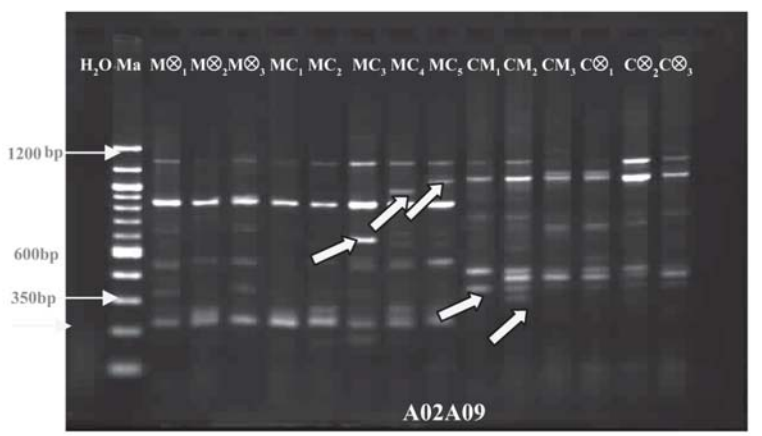


Ma: Marker P⊗ : *C. pubescens* x *C. pubescens* PC: *C. pubescens* x *C. pascuorum* cv. Cavalade

C ⊗ : *C. pascuorum* cv. Cavalade x *C. pascuorum* cv. Cavalade

CP⊗ : *C. pascuorum* cv. Cavalade x *C. pubescens*

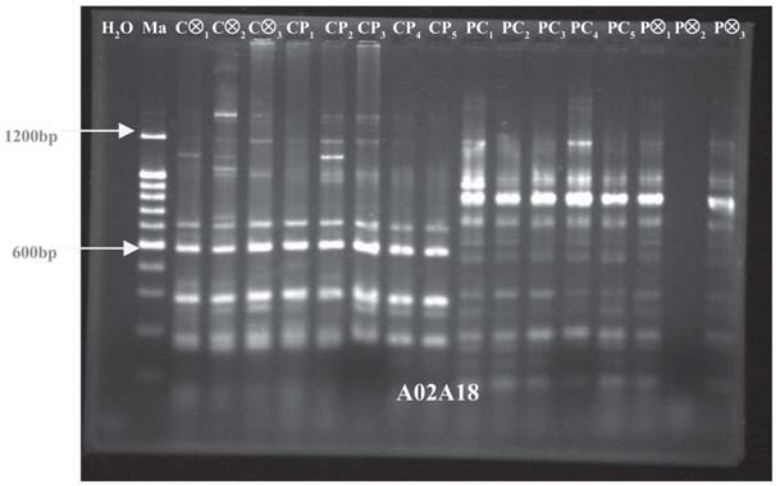
Fig. 5 **Electrophoretic DNA pattern of *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pubescens*, and *C. pubescens* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade compared with *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pascuorum* cv. Cavalcade and *C. pubescons* x *C. pubescens* using primer A02 and A09**



Ma: Marker M⊗ : *C. macrocarpum* x *C. macrocarpum* MC: *C. macrocarpum* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. macrocarpum* CM: *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. macrocarpum*

C⊗ : *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pascuorum* cv. Cavalcade

Fig. 6 **Electrophoresis DNA pattern of *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. macrocarpum* and *C. macrocarpum* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade compared with *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pascuorum* cv. Cavalcade and *C. macrocarpum* x *C. macrocarpum* using primer A02 and A09**

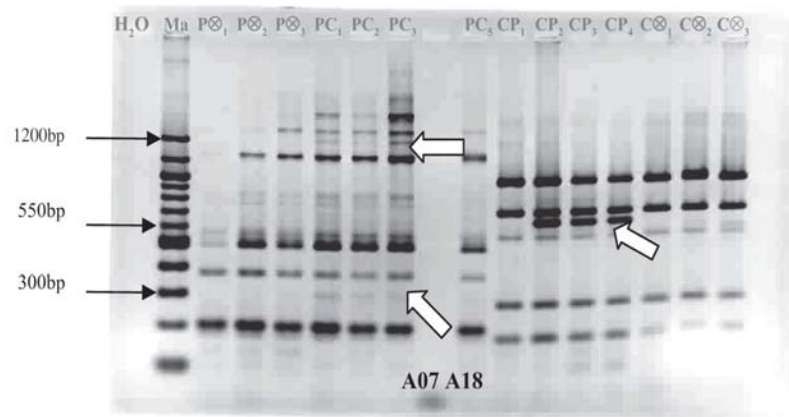


Ma: Marker P⊗ : *C. pubescens* x *C.pubescens* PC: *C. pubescens* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade

C ⊗ : *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pascuorum* cv. Cavalcade

CP⊗ : *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pubescens*

Fig. 7 **Electrophoresis DNA pattern of *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pubescens* and *C. pubescens* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade compared with *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pascuorum* cv. Cavalcade and *C.pubescens* x *C.pubescens* using primer A02 and A18**

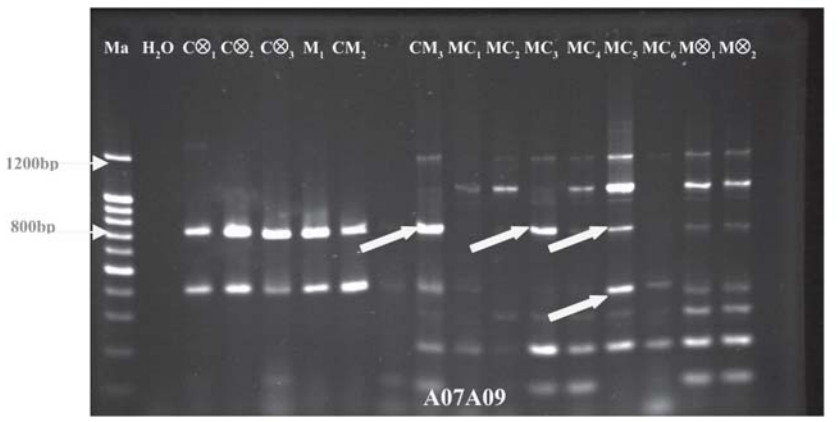


Ma: Marker P⊗ : *C. pubescens* x *C. pubescens* PC: *C. pubescens* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade

C⊗ : *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pascuorum* cv. Cavalcade

CP⊗ : *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pubescens*

Fig. 8 **Electrophoresis DNA pattern of *C. pubescens* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade and *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pubescens* compared with *C. pubescens* x *C. pubescensand, C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pascuorum* cv. Cavalcade using primer A07 and A18**



Ma : marker M⊗ : *C. macrocarpum* x *C. macrocarpum* MC: *C. macrocarpum* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade CM : *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. macrocarpum* C⊗ : *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pascuorum* cv. Cavalcade

Fig. 9 **Electrophoresis DNA pattern of *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. macrocarpum* and *C. macrocarpum* x *C. pascuorum* cv. Cavalcade with *C. pascuorum* cv. Cavalcade x *C. pascuorum* cv. Cavalcade and *C. macrocarpum* x *C. macrocarpum* using primer A07 and A09**

วิจารณ์

ลักษณะทางพันธุกรรม

ลักษณะโครโมโซมของถั่วเซ็นโตรซีมาที่มีขนาดเล็กและมีจำนวนโครโมโซมที่ใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่สามารถเห็นความแตกต่างของโครโมโซมจึงจำเป็นต้องตรวจสอบลายพิมพ์ DNA การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมพืชด้วยการตรวจสอบลายพิมพ์ของ DNA ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายเพราะสามารถจำแนกตามความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชได้โดยไม่มีผลกระทบจากสภาพแวดล้อมต่อพืชทดสอบ (Williams et.al., 1990) โดยเฉพาะในกรณีของการทดลองนี้ที่การตรวจสอบลักษณะปรากฏ และลักษณะโครโมโซมไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของพันธุกรรมได้ชัดเจน

การสกัด DNA ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1990) พบว่าสารละลาย DNA มีสีต่างกันตามชนิดของพืช โดยสารสกัด DNA ที่ได้จากถั่วพิวเบสเซนส์ จะมีสีเข้มที่สุด รองลงมาคือ ลูกผสมระหว่าง ถั่วพิวเบสเซนส์ กับ ถั่วคาลาวาเคด สารสกัดที่มีสีเข้มจะมีสารปนเปื้อนจาก plant secondary product เช่น polysaccharide polyphenol tannin ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของ restriction enzyme taq polymerase และ lygase ทำให้การเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR ไม่ได้ผล (Nagaraja, 2000; Boituex,1999; Porebski et al.,1993) ซึ่งในการตรวจสอบสารภายในใบและต้นถั่วพิวเบสเซนส์ โดย Niang et.al. (2002) พบว่ามี polyphenol ที่สามารถสกัดได้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Weishing et.al.(1995) กล่าวว่า พืชแต่ละชนิดมีองค์ประกอบทางชีวเคมีในเซลล์พืชต่างกัน ดังนั้นวิธีการสกัด DNA แต่ละวิธีย่อมให้ผลผลิต DNA ต่างกัน จากการทดลองใช้วิธีของ Graham et.al. (1994) โดยใช้ CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)ในการสกัด ซึ่งได้ผลดีในพืชหลายชนิด เช่น ฝ้าย blackcurrents เฟิร์น และไม้ผลหลายชนิด (Woodhead et.al., 1999) CTAB เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น detergent มีประจุบวกสามารถเกาะติดกับประจุลบของ DNA เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble complex) และตก

ตะกอน ช่วยป้องกันไม่ให้ polysaccharide มาตกตะกอนกับ DNA ได้ (Michiels et al., 2003) นอกจากนี้การใช้ CTAB ร่วมกับ NaCl ในการกำจัด polysaccharide ได้ผลดี (Alijanabi, 1999; Rout et.al.,)

จากผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่า วิธีการ Doyle and Doyle (1990) ได้ผลผลิตความเข้มข้นของ DNA และความบริสุทธิ์ของ DNA ต่ำที่สุด ในการสกัด DNA จาก ถั่วพิวเบสเซนส์ และไม่เพียงพอที่จะทำ PCR ส่วนวิธีการของ Graham et.al. (1994) พบว่ามีค่าความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ DNA เพิ่มขึ้นเนื่องจากการใช้ CTAB ร่วมกับ NaCl ซึ่งจะช่วยกำจัดสาร polysaccharide และpolyphenol ออกไปได้แต่สำหรับถั่วพิวเบสเซนส์ แล้ว ก็ยังได้ค่าความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำอยู่ การใช้วิธีการสกัดแบบ Keb-llanse et.al. (2002) จะได้สารสกัดจาก DNA จาก ถั่วพิวเบสเซนส์ ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น และได้ปริมาณ DNA มากขึ้น เนื่องจากมีความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นและยังมีการใช้ ascorbic acid และ β-mercaptoacetate ซึ่งจะช่วยกำจัดสารปนเปื้อนพวก polysaccharide และ phenolic compound ได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมี PVP ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการขจัดสารปนเปื้อนดังกล่าว (Kim et.al., 1997; Michiels et.al., 2003) แต่พบว่าลูกผสมถั่วเซนโตรซีมา อื่นๆนั้นแม้ว่าจะมีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณของ DNA ลดลง ซึ่งอาจเป็นเพราะมีการล้างตะกอน DNA หลายครั้ง จึงมีโอกาสสูญเสีย DNA ออกไป ดังนั้นการสกัด DNA จากถั่วเซนโตรซีมาชนิดอื่นๆ อาจใช้วิธีการของ Graham et.al. (1994) ก็เพียงพอที่ได้ความบริสุทธิ์ของ DNA เพียงพอ และปริมาณ DNA ที่มากพอ เพราะเป็นวิธีการที่ใช้สารเคมีและมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก ส่วนถั่วพิวเบสเซนส์ และลูกผสมที่มีถั่วพิวเบสเซนส์ เป็นต้นแม่ที่ใช้วิธีการสกัด DNA ของ Keb-llanse et.al. (2002) จะให้ผลได้ดีที่สุด

อย่างไรก็ดีความบริสุทธิ์ของ DNA ก็มีผลต่อความสำเร็จของการทำ PCR อย่างมาก (Nagaraja K.V., 2000; Rout et.al., 2002; Michiels et.al., 2003) การสกัด DNA ของถั่วเซนโตรซีมา ในการทดลองครั้งนี้ด้วยวิธี Keb-llanse et.al. (2002) เป็นวิธีที่ได้สารสกัดที่มีความบริสุทธิ์มากที่สุดและมีปริมาณ DNA ที่มากเพียงพอ จึงใช้วิธีการนี้ในการสกัด DNA ของถั่วเซนโตรซีมาในการทดลองนี้

จากการทดลองนี้มีข้อสังเกตเกี่ยวกับสารละลาย DNA ของถั่วเซนโตรซีมาที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1990) จะเห็นได้ว่าสารละลาย DNA ที่สกัดได้จากใบถั่วพิวเบสเซนส์ และลูกผสมที่เกิดจากถั่วคาวาลเคด ผสมกับถั่วแมคโครคาปัม จะมีสารละลาย DNA ที่สกัดได้สีเข้มกว่าสารละลาย DNA ที่สกัดได้จากใบของถั่วคาวาลเคด ผสมตัวเอง แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลจากการถ่ายทอดพันธุกรรมจากคู่ผสมที่เป็นถั่วพิวเบสเซนส์ และ ถั่วแมคโครคาปัม ซึ่งสามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการตรวจสอบการผสมข้ามชนิดถั่วกลุ่มนี้ได้

การตรวจสอบแบบแผนของ DNA ด้วยเทคนิค RAPD ซึ่งในการเพิ่มปริมาณ DNA ในกระบวนการ PCR นั้น primer จะเข้าไปเกาะกับ DNA template ในตำแหน่งที่มี base คู่ผสม (complementary base) โดยจะต้องมีระยะห่างระหว่าง primer ไม่เกิน 2000 base pairs การใช้ primer ในการทดลองนี้คือ A18, A09, A07 และ A02 primer แต่ละตัวอาจมีจุดที่เกาะติดกับ DNA ต้นแบบของลูกผสมแต่ละคู่ โดยที่ primer A18 และ A02 อาจมี base คู่สมกับ DNA ของถั่วพิวเบสเซนส์ จึงสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้เฉพาะถั่วพิวเบสเซนส์ และลูกผสมระหว่างถั่วพิวเบสเซนส์ กับถั่วคาวาลเคด ส่วน A09 จะมี base คู่สมกับ ถั่วแมคโครคาปัม ในขณะที่ A07 ก็มี base คู่สมกับ DNA ของถั่วคาวาลเคดโดยที่ A02 และ A09 จะเข้ากันกับ DNA ต้นแบบของคู่ผสม ถั่วคาวาลเคด กับถั่วแมคโครคาปัม ได้ในตำแหน่งที่ไม่แข่งกัน (incompetitive) เช่นเดียวกับการใช้ primer A07 และ A18 ในการตรวจสอบ DNA ของ ถั่วคาวาลเคด ผสมกับ ถั่วพิวเบสเซนส์ ทำให้ได้แบบแผนของแถบ DNA ที่แสดงความแตกต่างระหว่างลูกผสมข้ามชนิดและลูกผสมตัวเองได้ ซึ่ง Penner (1996) กล่าวว่าการใช้ arbitrary primer ชนิดเดียวใน

การเพิ่มปริมาณ DNA primer จะต้องเกาะติดกับ DNA templateในระยะที่ห่างกันไม่เกิน 2,000 base pairs ซึ่งเป็นไปได้ว่าการเพิ่มจำนวน DNA เป็นการสำเนา DNA ต้นแบบ จากจุดเดิม ทำให้ได้แถบของ DNA ซ้ำเดิม ไม่ใช่การจำลอง DNA ของทั้ง genome จึงมีการทดลองใช้ primer 2 ชนิดร่วมกันในการเพิ่มปริมาณของ DNA ของข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ และ canola พบว่าการใช้ primer 2 ชนิดร่วมกัน ทำให้มีจำนวน polymorphism ที่ไม่พบในการใช้ primer แต่ละชนิด ในการทำปฏิกิริยา PCR คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแถบ DNA ที่เกิดจากการใช้ primer ชนิดเดียว คือ 20-30 เปอร์เซ็นต์ ในข้าวโอ๊ต บาร์เลย์ และ canola ในขณะที่ข้าวสาลีมีเพียงแค่ 8 เปอร์เซ็นต์

จากการพิจารณารูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จะเห็นได้ว่าแม้ในลูกผสมตัวเองของ ถั่วแมคโครคาปัมและถั่วคาวาลเคด ก็มีความแปรปรวนของรูปแบบของแถบ DNA แสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนจากพันธุกรรมของพันธุ์ พ่อ-แม่ และแม้ว่ารูปแบบของ DNA ลูกผสมข้ามชนิดส่วนใหญ่ จะใกล้เคียงกับแถบ DNA ของลูกผสมตัวเองของพันธุ์แม่ แต่ก็มีแถบ DNA ที่มีขนาดใกล้เคียงกับแถบ DNA ที่พบในลูกผสมตัวเองของต้นพ่อ ซึ่งจะพบในเฉพาะกลุ่มของลูกผสมข้ามชนิดเท่านั้นแต่ไม่พบในแถบ ลูกผสมของตัวเองต้นแม่ซึ่ง Chen et al., (2004) รายงานจากผลการศึกษาลักษณะปรากฏ และลักษณะ DNA ของลูกผสมข้ามชนิด และลูกผสมย้อนกลับสลับเพศของพืชตระกูลแตง ระหว่าง *Cucumis hystrix* Chakr (2n=2x=24) และ *Cucumis sativas* L.(2n=2x=14) พบว่ารูปแบบของลายพิมพ์ DNA ของรูปผสมข้ามชนิดแตกต่างจากต้นพ่อ-แม่ โดยไม่พบแถบของ DNA ของต้นพ่อหรือต้นแม่ในลายพิมพ์ DNA ของลูกผสมรวมถึงการพบแถบ DNAที่ไม่ปรากฏในลายพิมพ์ DNA ของต้นพ่อ หรือต้นแม่ ซึ่งความแตกต่างของลายพิมพ์ DNA นี้เกิดจากการผสมข้ามชนิดในลูกผสมซึ่งทำให้ genome ของพืชแตกต่างกันไปทำให้ตำแหน่งที่ primer จะเกาะติดกับ DNA ต้นแบบแตกต่างไป (Hallden et al.,1996) จึงกล่าวได้ว่าในการทดลองนี้ ลูกผสมข้ามชนิดมี DNA ที่มีลำดับเบสเหมือนกับต้นพ่ออยู่แม้จะไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าเป็นลูกผสมข้ามชนิด จากแบบแผนของ DNA ที่ได้เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ทดสอบมีจำกัด และจำนวน primer ที่ใช้มีเพียง 8 ชนิดเท่านั้น

จากผลการศึกษาลักษณะปรากฏของรูปผสมและ ลักษณะโครโมโซม และลายพิมพ์ DNA ของลูกผสมข้ามชนิดที่ได้ อาจไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าลูกผสมที่ได้เกิดจากการผสมข้ามชนิดตามแผนการทดลองแต่เมื่อพิจารณาจากลักษณะของสารละลาย DNA ที่ได้จากถั่วพิวเบสเซนส์ผสมตัวเองจะมีสีเข้มที่สุด รองลงมาคือสารละลาย DNA ของแมคโครคาปัมผสมตัวเองและลูกผสมระหว่างถั่วพิวเบสเซนส์ ผสม ถั่วคาวาลเคด ส่วนลูกผสมระหว่างถั่วแมคโครคาปัมผสมกับถั่วคาวาลเคดและลูกผสมระหว่างถั่วคาวาลเคดกับพิวเบสเซนส์ ก็มีสารละลาย DNA ที่มีสีเข้มกว่าสารละลาย DNA ของถั่วคาวาลเคดผสมตัวเอง แสดงถึงอิทธิพลของการถ่ายทอดลักษณะจากการผสมข้ามชนิดรวมถึงลักษณะของก้านใบย่อย และการกระจายตัวของลักษณะต้นถั่วในรุ่น F_2 ที่ให้เชื่อได้ว่าการผสมข้ามชนิดระหว่าง ถั่วคาวาลเคด กับถั่วพิวเบสเซนส์ และ ถั่วแมคโครคาปัม ประสบความสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

Alijanabi, S.M., L. Forget, and A. Dookum. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol - free sugarcane DNA. Plant molecular Biology Report.17:1-8.

Boiteux, L.S., M.E.N. Fonseca, and P.W. Simon. 1999. Effects of plant tissue and DN purification method on random amplified polymorphic DNA-base genetic fingerprinting analysis in carrot. Journal of American Society for Horticultural Science. 124(1):32-38.

Bryant.J.A. 1997. DNA extraction, in P.M. Dey, J.B. ltarborne(Eds.), Methods in plant Biochemistry, Academic Press, San Diego,1997. pp.1-12.

Chen F.G., F.Y. Zhuang, X.A. Liv, and C.T. QIAN. 2004. Reciprocal differences of morphological and DNA characters interspecific hybridization in *Cucumis.* Canadian Jurnal of Botany 82:16-21.

Dempster.E.L., K.V. Pryor, D. Francis,J.E.Young, and H.J. Rogers. 1999. Rapid DNA extraction from Ferns for PCR based analysis. Biological Techniques 27:66-68.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of freshleaf tissue. Phytochamical Bulletin 19:11-15.

Graham, G.C., R.J. Henry, and R.J. Redden. 1994. Identification of navy bean varieties using random amplification of polymorphic DNA Australian Journal of experimental in Agriculture 34:1173-1176.

Hallden, C., M. Hansen, N.O. Nilsson, A. hjerdin, and T. Sall. 1996. Compettition as a source of errors in RAPD analysis. Theoritical and Applied Gennetics 93:1185-1192.

Keb-Ilanes, M., G. Gonzalez, B.chi-Manzanero, and D. Infante. 2002. A rapid and simple method for small- scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. Plant Molecular Biology Reporter 20:299a-299e.

Kim, C.S., C.H. Lee., J.S. Shin., Y.S. Chung, and N.I. Hyung. 1997. A simple and rapid method of isolation of high quality genomeic DNA from fruit trees and conifers using PVP. Nucleic Acid Research. 1085-1086.

Michiels, An., W.V. den Ende, M. Tuker, L.V. Rite, and A.V. Laere. 2003. Extraction of high quality genomic DNA from latex-containing plants. Analytical Biochemistry. 315:85-89.

Nagaraja, K.V. 2000. Biochemical composition of caschew (*Anacardium occidentalel*) Kernel testa. Journal of Food Science and Technndogy. 37:554-556.

Niang A.I., B.A. Amadalo, J.de Wolf, and S.M. Gathumbi. 2002. Species screening for short-term planted fallows in the highlands of western Kenya. Agroforestry Systems 56:145-154.

Penner Greg, A. 1996. RAPD Analysis of Plant Genome in Prem P. Jauhar (ed.). Method of Genome analysis in plants. CRC Press. Inc. USA. 251-268.

Porebski, S., L.G. Bailey, and B.R. Baum.1997. Modification of CTAB extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Rep.15:8-15.

Rout, G.R., S.Samal, S. Nayak,Rashmi M. Nanda, P.C.Lenka, and P. Das. 2000.An Alternative Method of Plant DNA Extraction of Cashew (*Anacardium occidentale L.*) for randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Gartenbauwissenchaft. 67(3):114-118.

Salomon, B. and B.R. Lu. 1992. Genomic groups, morphology, and sectional delimitation in Eurasian Elymus (Poaceae:Triticeae). Plant Syst. Evol. 180: 1-13.

Weishing, K.H., N.K. Wolff, and W. Meyer (Eds).1995. DNA isolation and purification in DNA fingerprinting in plants and Fungi. CRC. Press, Boca Raton Florida,USA. 44-59.

Williams, J.G.K., A.R. Kubisik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V.Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research.18: 6531-6535.

Wilkie, S.E, P.G. Issac, and R.J. Slater. 1993. Random amplification polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in Akkium. Theoritical and Applied Genetic. 80: 497-504.

Woodhead, M., H.V. Davies, R.M. Breman, and M.A. Tylor,. 1999. The isolation of genomic DNA from Blackcurrent *(Ribes nigrum.* L.) Molecular Biotechnology 9: 243-246.