การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกะเพราโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

Genetic Diversity Study in Holy Basil (*Ocimum tenuiflorum* L.) Using Microsatellite Markers

ธนพัฒน์ นิลวรานนท์[1] อรอุบล ชมเดช[2,3] ภูมิพัฒน์ ทองอยู่[2,3] อนุชา วงศ์ปราณีกุล[4] และ จุลภาค คุ้นวงศ์[2,3]
Thanapat Nilwaranon[1] Ornubol Chomdej[2,3] Pumipat TongyooAnucha[2,3]
Anucha Wongpraneekul[4] and Julapark Chunwongse[2,3]

[1]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, Thailand 73140
[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
[2]Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand
[3]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
[3]Center for Agriculture Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand
[4]ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.นครปฐม 73140
[4]Tropical vegetable research center, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

บทคัดย่อ: การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกะเพรา (*Ocimum tenuiflorum* L.) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 11 เครื่องหมายในการตรวจสอบ จากตัวอย่างเชื้อพันธุกรรมกะเพราจำนวน 96 accessions ที่เก็บรวบรวมมาจากแปลงปลูกของเกษตรกรทุกภูมิภาคในประเทศไทยโดยศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ได้แก่ ค่าคาดคะเนเฮเทอโรไซโกซิตี (H_e) ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o) ค่า polymorphic information content (PIC) และจัดกลุ่มหาความสัมพันธ์ในตัวอย่าง จากค่าความต่างทางพันธุกรรมพบว่าเชื้อพันธุกรรมกะเพราในประเทศไทยมีความหลากหลายต่ำ โดยข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการบริหารจัดการเชื้อพันธุกรรมกะเพราเพื่อลดความซ้ำซ้อน การจัดทำเชื้อพันธุกรรมหลักร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และใช้ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น ๆ ในการศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะสำคัญเช่น ลักษณะกลิ่นหอม เพื่อหาตำแหน่งยีนที่สัมพันธ์กับลักษณะนั้น ๆ และสามารถนำไปใช้ในปรับปรุงพันธุ์ของกะเพราไทยต่อไปในอนาคต
คำสำคัญ: เชื้อพันธุกรรม เทคนิคพีซีอาร์ จีโนไทป์ ค่าความต่างทางพันธุกรรม การวิเคราะห์จัดกลุ่ม

Abstract: Genetic diversity study of 96 holy basil (*Ocimum tenuiflorum* L.) accessions collected from different places in Thailand after Tropical Vegetable Research Center (TVRC), Kasetsart University was conducted using 11 microsatellite markers from different linkage groups. The results were analysed for the expected heterozygosity (H_e), observed heterozygosity (H_o), polymorphic information content (PIC) and cluster analysis demonstrating the level of diversity of the collection was low. This background genetic information will be useful for holy basil germplasm management including to reduce redundancy and to use in combination with morphological traits to establish the core collection. These SSR markers in conjunction with the other molecular markers can be used to study the genome wide association to identify the candidate markers/genes for the future use in holy basil improvement.
Keywords: Germplasm, PCR, genotype, genetic dissimilarity, cluster analysis

คำนำ

กะเพรา (*Ocimum tenuiflorum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย ใช้ในการประกอบอาหาร เป็นสมุนไพรรักษาโรค และใช้ประโยชน์จากน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากส่วนต่างๆ จากการศึกษาด้านวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ประกอบกับข้อมูลในระดับโมเลกุล พบว่ากะเพรามีถิ่นกำเนิดในภาคกลางตอนบนของประเทศอินเดีย (Bast *et al.,* 2014) แล้วมีการแพร่กระจายไปในทวีปเอเชียโดยเฉพาะในเขตร้อนชื้น ทวีปออสเตรเลีย (Hanelt *et al*., 2001) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 (Archna *et al*., 2013) มีขนาดจีโนมโดยประมาณ 612 Mb (Rastogi *et al*., 2015) ดอกของกะเพราเป็นดอกสมบูรณ์เพศ สามารถเกิดการผสมตัวเอง (self-pollination) และเกิดการผสมข้าม (cross-pollination) ได้โดยอาศัยแมลง

ปัจจุบันผู้บริโภคกะเพราในประเทศไทยมีความต้องการกะเพราที่หลากหลายมากขึ้น เช่น มีใบขนาดใหญ่ และมีกลิ่นหอมในปริมาณที่สูง ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีกะเพราสายพันธุ์ใดที่มีลักษณะดังกล่าว ไม่ว่าจะเป็นพันธุ์ท้องถิ่นหรือพันธุ์การค้า การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกะเพราที่มีอยู่ในประเทศไทย จะทำให้นักปรับปรุงพันธุ์มีข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ของกะเพรา การวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกะเพราจากตัวอย่างเชื้อพันธุกรรมกะเพราจำนวน 96 accessions ที่รวบรวมมาจากแปลงปลูกของเกษตรกรทุกภูมิภาคในประเทศไทยโดยศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (SSR marker) ที่เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจพบความแตกต่างของดีเอ็นเอได้สูง และสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ (co-dominant marker) ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของกะเพราที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในปรับปรุงพันธุ์ของกะเพราในประเทศไทย การจัดการเชื้อพันธุกรรมหลัก (core collection) ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และใช้งานร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นๆในการศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจ เพื่อหาตำแหน่งยีนที่สัมพันธ์กับลักษณะนั้นๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อพันธุกรรมกะเพราและการสกัดดีเอ็นเอ

เชื้อพันธุกรรมกะเพราจำนวน 96 accessions จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน ที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งเพาะปลูกกะเพราของเกษตรกรจาก 39 จังหวัดในทุกภูมิภาคของประเทศไทย เพาะต้นกล้าในโรงเรือนแล้วนำใบอ่อนจากต้นกล้าจำนวน 10 ใบ โดยแต่ละใบเก็บจากแต่ละต้นใน accession เดียวกันมารวมกันในหลอดทดลองและนำไปสกัดดีเอ็นโดยวิธีของ (Fulton *et al*., 1995)

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ปรับดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 ng/ul แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 11 ตำแหน่ง เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในตรวจสอบครั้งนี้ถูกออกแบบขึ้นมาใหม่ โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอของจีโนมกะเพราจากผลงานวิจัยของ (Rastogi *et al*., 2015) (ตารางที่ 1)

Table 1 Names and sequences of microsatellite primer and repeat motif ranging from 2 to 6

No.	SSR name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	SSR motif
1	OT01	5'-TGCATCCAATGGTCAAATGT-3'	5'-TGAAATGAATGTGCATGAGG-3'	(AG)15
2	OT02	5'-GAAGTGATTGGCATTGTTGC-3'	5'-CTTGCCCCTCCTTTCACTCT-3'	(GAAAG)6
3	OT03	5'-CATATATTCATGCAAAACCTTTGA-3'	5'-GTTCGCGACTTTATCGCTGT-3'	(AATAT)5
4	OT04	5'-TGAGCAACGATTTGCTTACG-3'	5'-GCGTGCTAAGCGATTTTTGT-3'	(ATATA)5
5	OT05	5'-GAAATTCACTCCCCCAACCT-3'	5'-TCCTCAAACCAAGAATCCTCA-3'	(AGAA)7
6	OT06	5'-GCTACTCATCCCTCCCACAT-3'	5'-CCACTTGGCCCACTTCTTAG-3'	(TAATAC)5
7	OT07	5'-TCGCTAACGCATTTACACCA-3'	5'-TCGTATGCTCATACTGGAAAGC-3'	(TTCTTT)6
8	OT08	5'-ATTGAGCGTGGACTTTTAGCA-3'	5'-ACAAGGGCGGGTTAATAATG-3'	(TTCTC)5
9	OT09	5'-AAAGGGTGCAATTCAACGAC-3'	5'-GTGGGCTACACTGTGTGCATT-3'	(AGAA)5
10	OT10	5'-TACCTTCTTCGGCTTCTCCA-3'	5'-GGGGACGAAGAAAGTGATGA-3'	(CTCTTC)6
11	OT11	5'-CATTCCAATTGATTGCCAAA-3'	5'-CGATTGCAAGAGGAAACTCC-3'	(AATT)5

ตรวจสอบผลที่ได้จากแต่ละเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์โดยวิธี DNA Polyacrylamide Gel Electrophoresis ใน 4.5% polyacrylamide gel จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอโดยวิธี silver nitrate staining ผลที่ได้จะแสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ (ภาพที่ 1) ตามรูปแบบของอัลลีลที่มีในแต่ละตัวอย่างทดลอง

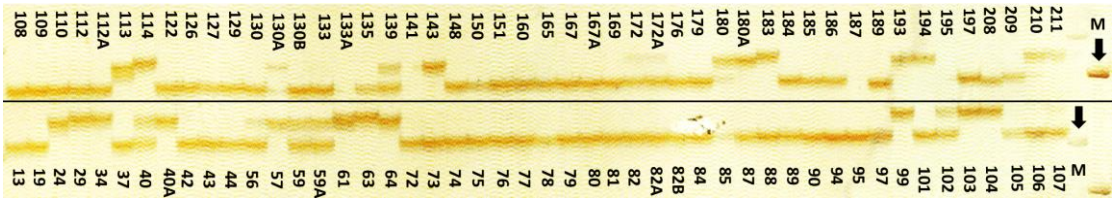

Figure 1 DNA profiles of holy basil accessions amplified using OT01 marker, M: ΦX174 DNA/HinfI Dephosphorylated Markers, the right arrow represent 200 bp DNA marker

การวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลาย

บันทึกผลแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆในรูปแบบข้อมูลอัลลีล (allelic data) นำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่า Polymorphic Information Content (PIC) ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o: observed heterozygosity) ค่าคาดคะเนเฮเทอโรไซโกซิตี (H_e: expected heterozygosity or gene diversity) และวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic similarity) จากวิธีของ Nei's genetic distance (Nei *et al.*,1983) เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic average (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม PowerMarker V3.25 และแสดงแผนภูมิพันธุกรรม (Phylogenetic tree) จากโปรแกรม DARwin6

ผลการทดลอง

1) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกะเพราโดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย SSR markers จำนวน 11 ตำแหน่งในเชื้อพันธุกรรมกะเพราจำนวน 96 accessions พบว่าให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic) จำนวน 10 ตำแหน่ง และไม่พบความแตกต่าง (monomorphic) จำนวน 1 ตำแหน่งที่เครื่องหมาย OT11 ตรวจพบอัลลีลทั้งหมด 26 อัลลีล เฉลี่ย 2.36 อัลลีลต่อตำแหน่ง

โดยเครื่องหมายที่พบอัลลีลสูงสุดคือ OT01 และไม่พบโฮโมไซกัส null allele ในทุกตำแหน่งที่ตรวจสอบ จากตัวอย่างทดลอง พบค่า major allele frequency อยู่ในช่วง 0.66-1.00 ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.75 ต่อตำแหน่ง ค่า H_e มีค่าอยู่ในช่วง 0.00-0.47 มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.36 ต่อตำแหน่งและค่า H_o มีค่าอยู่ในช่วง 0.00-0.20 มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.10 ต่อตำแหน่ง ค่า PIC อยู่ในช่วง 0.00-0.41 มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.30 ต่อตำแหน่ง และในเครื่องหมาย OT10 และ OT11 มีค่า PIC ต่ำกว่า 0.1 จึงไม่นำข้อมูลที่ได้ไปร่วมวิเคราะห์กับเครื่องหมายอื่นในการจัดกลุ่ม (ตารางที่ 2)

Table 2 Summary statistics

Marker	Allele No.	Major allele frequency	H_e	H_o	PIC
OT01	4	0.75	0.40	0.10	0.36
OT02	2	0.69	0.43	0.11	0.34
OT03	2	0.66	0.45	0.11	0.35
OT04	2	0.66	0.45	0.10	0.35
OT05	3	0.72	0.42	0.09	0.35
OT06	3	0.69	0.44	0.07	0.37
OT07	2	0.69	0.43	0.10	0.34
OT08	2	0.72	0.40	0.11	0.32
OT09	3	0.68	0.47	0.20	0.41
OT10	2	0.95	0.09	0.05	0.09
OT11	1	1.00	0.00	0.00	0.00
Mean	2.36	0.75	0.36	0.10	0.30

H_e : Expected heterozygosity, H_o : Observed heterozygosity, PIC : Polymorphic Information Content

2) การจัดกลุ่มกะเพรา

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถแบ่งกะเพราออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ที่ค่าดัชนีความต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.40 โดยในกลุ่มที่ 1 มีสมาชิกทั้งหมด 69 ตัวอย่าง และในกลุ่มที่ 2 มีสมาชิกทั้งหมด 27 ตัวอย่าง มีตัวอย่างวิจัยที่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรม คือ 52 ตัวอย่างในกลุ่ม 1a, 2 ตัวอย่างในกลุ่ม 1b, 9 ตัวอย่างในกลุ่ม 2a, 2 ตัวอย่างในกลุ่ม 2b และ 2 ตัวอย่างในกลุ่ม 2c

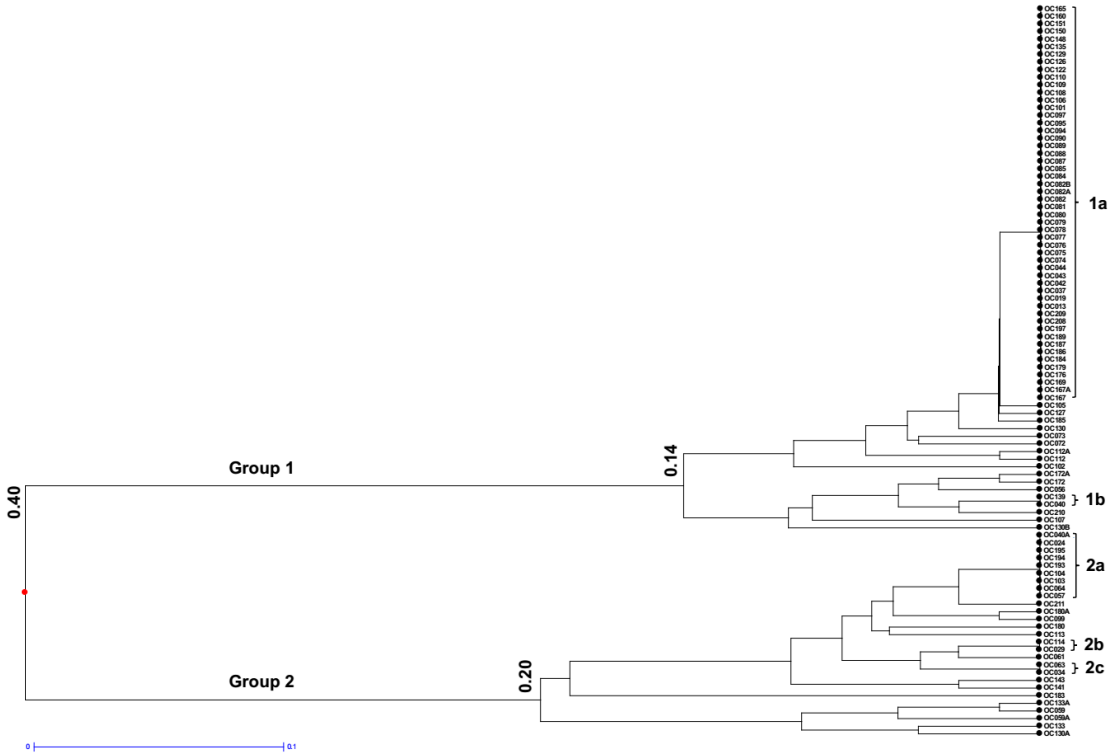

Figure 2 Dendrogram of 96 holy basil accessions resulting from the UPGMA cluster analysis based on Nei (1983) distance obtained from the Microsatellite marker

วิจารณ์

จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งมีค่าต่ำ และค่า major allele frequency ที่สูงนั้น เนื่องจากประชากรที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ โดยส่วนมากมีจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัสอัลลีลเหมือนกัน ในหลายตำแหน่งที่ตรวจสอบ ซึ่งการที่พบจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัสอัลลีลจำนวนมาก น่าจะเกิดจากธรรมชาติของกะเพราที่เป็นพืชที่มีเกิดการผสมตัวเองได้ ส่วนการพบรูปแบบอัลลีลเหมือนกัน น่าจะมีสาเหตุมาจากความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

ค่าเฉลี่ยของ H_o มีค่าต่ำกว่าค่า H_e มาก (homozygote excess) การที่ปรากฏลักษณะเช่นนี้ มีสาเหตุมาจาก เกิดการ selection และหรือ inbreeding ในประชากร ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากกะเพราที่นำมาศึกษาครั้งนี้ ส่วนมากเป็นพันธุ์ท้องถิ่นหรือพันธุ์การค้าที่มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการเก็บเอาไว้ แล้วมีการปลูก การขยายพันธุ์ อยู่เพียงสายพันธุ์เดียวเรื่อยมา

ค่า PIC เฉลี่ยอยู่ในระดับต่ำ แสดงถึงเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในตรวจสอบไม่ครอบคลุมในตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ที่มีความผันแปรสูง หรือเกิดจากตัวอย่างวิจัยในครั้งนี้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง เนื่องมาจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่เป็นสปีชีส์เดียวกันทั้งหมด

ข้อมูลจากวิเคราะห์การจัดกลุ่ม ทำให้ทราบว่ากะเพราไทยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ในระดับความต่างทางพันธุกรรมปานกลาง แต่ภายในกลุ่มแต่ละกลุ่มเองนั้น มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับที่ต่ำ กลุ่มเชื้อพันธุกรรมกะเพราที่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมนั้น พบว่าไม่ได้มีแหล่งที่มาจากภูมิภาคเดียวกันทั้งหมด อาจเป็นไปได้ว่าเป็นพันธุ์การค้าจากบริษัทเดียวกัน ทำให้มีพันธุกรรมที่เหมือนหรือใกล้เคียงกันมาก แม้จะพบลักษณะสัณฐานบางลักษณะที่แตกต่างกัน

สรุป

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ บ่งชี้ว่ากะเพราที่เกษตรกรไทยใช้ในการเพาะปลูกเพื่อเป็นการค้านั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ควรมีการเก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรมกะเพราเพิ่ม จากพันธุ์การค้า พันธุ์ท้องถิ่น และพันธุ์ที่พบอยู่ในธรรมชาติ ทั้งในประเทศไทยและจากต่างประเทศ เพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ของกะเพราไทย และได้ข้อมูลที่นำมาใช้ในการบริหารจัดการเชื้อพันธุกรรมกะเพราให้เกิดประโยชน์

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ไปวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะสำคัญที่สนใจ แล้วค้นหาตำแหน่งยีนที่สัมพันธ์กับลักษณะนั้น ๆ เพื่อนำไปช่วยคัดเลือกในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์กะเพราต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน ที่ให้ตัวอย่างและสถานที่ในการทำงานวิจัย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่มอบทุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Bast, F., R. Poojaand M. Devendra. 2014. Chloroplast DNA phylogeography of holy basil (*Ocimum tenuiflorum*) in Indian subcontinent. The Scientific World Journal 70(3): 277-282.

Hanelt, P. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. 2001. Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops: Except Ornamentals. 4 vols. Springer, Berlin. 3641 p.

Archna, Shivnaz, Tandon N. and Anand. 2013. Somatic chromosomal studies in Ocimum basilicum & *Ocimum sanctum* L.. International Journal of Phytomedicine 5(3): 330-340.

Rastogi, S., A. Kalra and V. Gupta. 2015. Unravelling the genome of Holy basil: an "incomparable" "elixir of life" of traditional Indian medicine. BMC Genomics 16(1): 413-426.

Fulton, T. M., J. Chunwongse and S.D. Tanksley. 1995. Microprep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous Plants. Plant Molecular Biology Reporter 13(3): 207-209.

Nei, M., F. Tajima, and Y. Tateno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. J. Mol. Evol. 19(2): 153-170.