

การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทย
จากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *rbcl*
Identification of Mangoes Cultivars in Thailand
Using DNA Sequences of *rpoC1* and *rbcl* Genes

ปิยดา บุสดี และธีระชัย ธนานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Piyada Bussadee and Theerachai Thanananta

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Narumol Thanananta*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

บทคัดย่อ

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นไม้ผลเมืองร้อนที่มีความสำคัญและนิยมปลูกกันมากชนิดหนึ่งของไทย ซึ่งมะม่วงมีมากมายหลายพันธุ์ แต่มะม่วงที่สามารถส่งเป็นสินค้าออกไปยังต่างประเทศนั้นมีเพียงไม่กี่พันธุ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงตรวจสอบพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยเพื่อการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์มะม่วงในอนาคต โดยรวบรวมตัวอย่างมะม่วงที่พบในประเทศไทยจำนวน 18 พันธุ์ มาตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *rbcl* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *rbcl* ไม่สามารถแยกมะม่วงทั้ง 18 พันธุ์ ออกจากกัน ดังนั้นจึงควรใช้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณอื่นร่วมด้วย เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรและเหมาะสมสำหรับจำแนกพันธุ์มะม่วง

คำสำคัญ : มะม่วง; ยีน *rpoC1*; ยีน *rbcl*; การจำแนกพันธุ์; ลำดับดีเอ็นเอ

Abstract

Mango (*Mangifera indica* L.) is one of the important tropical fruits which is popularly grown in Thailand. There are a lot of mango cultivars, but only a few of them can be exported. This research was focused on identification of mangoes cultivars in Thailand for conservation and improvement of mango cultivars in the future. Eighteen mangoes cultivars were collected and DNA sequences of *rpoC1* and *rbcl* genes were determined. The results show that the nucleotide sequences of *rpoC1* and *rbcl* genes could not be used to identify all of them. Therefore, it is suggested that the regions other than *rpoC1* and *rbcl* genes may be included in DNA sequence-based identification to increase variable and informative sites for distinguishing mangoes.

Keywords: mango; *rpoC1* gene; *rbcl* gene; identification; DNA sequence

1. บทนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นไม้ผลเมืองร้อน ไม้ผลัดใบ ซึ่งเกษตรกรนิยมปลูกกันมาก และยังเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญของไทยอีกชนิดหนึ่ง รับประทานได้ทั้งผลดิบและผลสุก นอกจากนี้ยังสามารถแปรรูปเก็บไว้สำหรับรับประทานหรือจำหน่ายนอกฤดูได้ ลักษณะทั่วไปของมะม่วง คือ ลำต้นมีขนาดกลางถึงใหญ่ ความสูงประมาณ 10-40 เมตร เปลือกมีสีน้ำตาลเข้ม รากเป็นรากแก้วมีความยาวของรากประมาณ 6-8 เมตร หรือมากกว่า ใบมีลักษณะเป็นแบบใบเดี่ยว ความยาวของใบเฉลี่ย 15-45 เซนติเมตร ดอกมีลักษณะเป็นแบบดอกช่อแยกแขนง ในแต่ละช่อดอกประกอบด้วยดอก 2 ประเภท คือ ดอกเพศผู้ และดอกสมบูรณ์เพศแยกกัน แต่อยู่ร่วมช่อดอกเดียวกัน ผลมีลักษณะเป็นแบบผลเดี่ยว ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันไปในแต่ละพันธุ์ [1,2] เนื่องจากมะม่วงมีหลายพันธุ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงรวบรวมพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ (specific site)

รหัสแท่งดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เป็นการใช้นิวคลีโอไทด์ (nucleotide

sequence) ของตำแหน่งจำเพาะบริเวณหนึ่ง หรือหลายบริเวณร่วมกันในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต [3] โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งที่ใช้ต้องมีความแตกต่างกัน ซึ่งเกิดจากความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variability) ในระดับชนิดหรือสปีชีส์ (species) [4] แต่มีตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved site) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คงเดิม เพื่อใช้เป็นตำแหน่งที่ให้ไพรเมอร์ (primer) เข้าจับและเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์หรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) [5] โดยปัจจุบันมีผู้สนใจศึกษาการจำแนกชนิดและพันธุ์พืชโดยใช้รหัสแท่งดีเอ็นเอมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* [6] การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลดอกดาหล่าโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะ [7] การศึกษาการจำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1* [8] เป็นต้น

ยีน ribulose-bisphosphate carboxylase (rbcL) เป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ แพลรหัสเป็น large subunit ของเอนไซม์ ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RUBISCO) [9] ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide fixation) ในพืช ส่วนยีน *rpoC1* คือ ยีนที่แปลรหัสได้เป็นพอลิเปปไทด์ (polypeptide) ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) ซึ่งอยู่ในพลาสติด [10]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงในประเทศไทยโดยใช้ลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่งจำเพาะ เนื่องจากพบมะม่วงในประเทศไทยมากมายหลายพันธุ์ ซึ่งนอกจากเป็นพันธุ์มะม่วงที่ปลูกเพื่อประโยชน์ทางการค้าแล้ว ยังมีมะม่วงพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา อีกทั้งยังพบว่ามะม่วงพันธุ์เดียวกัน แต่มาจากแหล่งเพาะปลูกต่างกัน อาจมีคุณภาพไม่เหมือนกัน ดังนั้นการตรวจสอบพันธุ์มะม่วงโดยใช้ลำดับดีเอ็นเอนอกจากจะทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแล้ว ยังสามารถใช้ระบุพันธุ์และจำแนกพันธุ์ในระดับโมเลกุล รวมทั้งยังเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และคุ้มครองพันธุ์มะม่วงของไทยด้วย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พันธุ์มะม่วง

พันธุ์มะม่วงที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มี 18 พันธุ์ ได้แก่ โชคอนันต์ มะปริงป้า ทองดำ เจ้าคุณทิพย์ กะล่อน แรด ศรีสยาม ฟาลัน เพชรบ้านลาด หนองแขง หนังกวางวัน มั่นขุนศรี หัวเขียวสวย แก้ว น้ำดอกไม้ พูลถวายทะวาย และอร่อง โดยเก็บรวบรวมจากแหล่งเพาะปลูกต่าง ๆ ของประเทศไทย

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [11] โดยบดใบมะม่วงปริมาณ 2-3 กรัม

ในบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer: 4 % CTAB, 2.5 M NaCl, 0.6 % SDS, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium metabisulfite) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเติมพอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (PVP, polyvinylpyrrolidone) ปริมาณ 0.3 กรัม เมื่อบดจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงเทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เติมนิวเมทาเมอแคปโตเอทานอล (β -mercapto-ethanol) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปปั่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีการผสมด้วยการพลิกหลอดไปมาเป็นระยะ ๆ เมื่อครบเวลาจึงนำออกมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 $\times$ g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมนิเอียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 $\times$ g เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล (ethanol) ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (TE: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วถ่ายสารละลายใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ RNase A (10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (phenol : chloro-

form : isoamyl alcohol = 25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 × g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่ แล้วเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 × g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมนิเออร์พอลิอะครีลาไมด์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate pH 5.2) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 × g เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจึงตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ [12]

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *rbcl*

นำสารละลายดีเอ็นเอมะม่วงที่สกัดได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) สำหรับยีน *rpoC1* (Forward: 5'-GTG GAT ACA CTT CTT GAT AAT GG-3' และ Reverse: 5'-TGA GAA AAC ATA AGT AAA CGG GC-3') และไพรเมอร์สากลสำหรับยีน *rbcl* (Forward:

5'-TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC-3' และ Reverse: 5'-GGC ACA AAA TAA GAA ACG ATC TC-3') ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นจึงตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.4 การวิเคราะห์ผล

ตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *rbcl* ในมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ โดยนำส่งผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปยังบริษัท Solgent (ประเทศเกาหลีใต้) เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของมะม่วงแต่ละพันธุ์มาเปรียบเทียบกับด้วยโปรแกรม ClustalW [13] เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม แล้วนำข้อมูลไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 6.0 (molecular evolutionary genetics analysis) [14] โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ neighbor-joining [15]

3. ผลการวิจัย

3.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของมะม่วง 18 พันธุ์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *rpoC1* และ *rbcl* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวได้ทั้ง 18 พันธุ์ โดยเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส

ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 550 และ 650 คู่เบส ตามลำดับ

3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ในพืชอื่น ๆ หลังจากนั้นได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ในมะม่วง 18 พันธุ์ ไว้ในฐานข้อมูลออนไลน์ NCBI โดยมีหมายเลขเฉพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ในมะม่วง 18 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม ClustalW2 แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 6.0 พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมไม่สามารถแยกมะม่วง 18 พันธุ์ ออกจากกันทั้งหมด (รูปที่ 1ก) แยกได้เพียง 2 พันธุ์ คือ มะปริงป้าและอกร่อง เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* พบว่ามีตำแหน่งที่ให้ความหลากหลาย (polymorphism) ซึ่งเกิดจากการกลาย (mutation) จำนวน 3 ตำแหน่ง (ตารางที่ 2) โดยพบ 2 รูปแบบ ได้แก่ ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) และอินเดล (indel, insertion/deletion) โดยแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและรูปแบบการกลายนี้สามารถแยกมะม่วงหรือระบุพันธุ์มะม่วงได้ 2 พันธุ์ คือ มะปริงป้าและอกร่อง

ตารางที่ 2 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ในมะม่วง 18 พันธุ์ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์มะม่วง

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
ไพริมิดีนทรานสิชัน	468
อินเดล	551 และ 552

ตารางที่ 1 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และยีน *rbcl* ในมะม่วง 18 พันธุ์

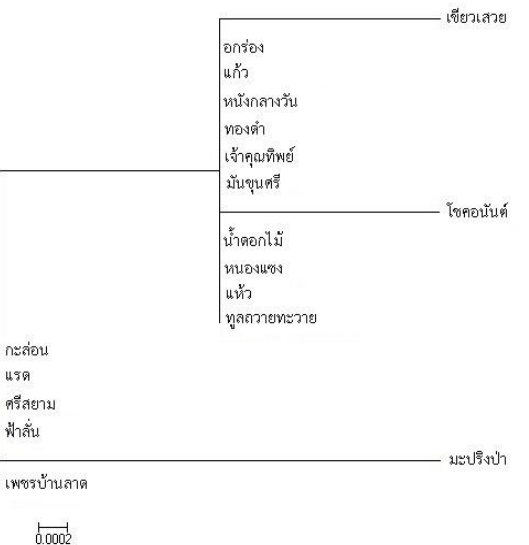
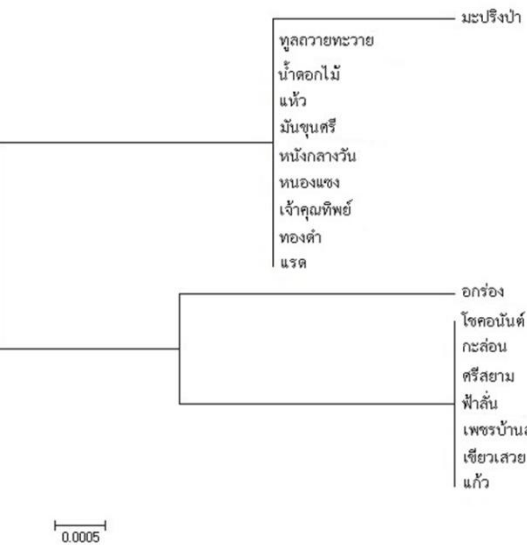
พันธุ์มะม่วง	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์	
	<i>rpoC1</i>	<i>rbcl</i>
โชคอนันต์	KR028419	KR610374
มะปริงป้า	KR071805	KR610375
ทองดำ	KR071806	KR610376
เจ้าคุณทิพย์	KR071807	KR610377
กะล่อน	KR071808	KR610378
แรด	KR071809	KR610379
ศรีสยาม	KR071810	KR610380
ฟ้าลั่น	KR071811	KR610381
เพชรบ้านลาด	KR071812	KR610382
หนองแขง	KR071813	KR610383
หนังกลางวัน	KR071814	KR610384
มันขุนศรี	KR071815	KR610385
แก้ว	KR071816	KR610386
เขียวเสวย	KR071817	KR610387
แก้ว	KR071818	KR610388
น้ำดอกไม้	KR071819	KR610389
ทูลถวายเป็น	KR071820	KR610390
อกร่อง	KR071821	KR610391

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในมะม่วง 18 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม ClustalW2 แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 6.0 พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนั้นไม่สามารถแยกมะม่วง 18 พันธุ์ ออกจากกันทั้งหมด (รูปที่ 1ข) แยกได้เพียง 3 พันธุ์ คือ เขียวเสวย โชคอนันต์ และมะปริงป้า เมื่อตรวจสอบ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* พบว่ามีตำแหน่งที่ให้ความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์มะม่วง 5 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3) โดยพบ 3 รูปแบบ ได้แก่ พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) ทรานสเวอร์ชัน (transversion)

และอินเดิล ซึ่งแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและรูปแบบการกลายนี้สามารถแยกมะม่วงหรือระบุพันธุ์มะม่วงได้ 5 พันธุ์ คือ เชี่ยวเสวย โชคอนันต์ มะปริงปำ มั่นขุนศรี และอกร่อง



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* (ก) และ *rbcl* (ข)

ตารางที่ 3 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในมะม่วง 18 พันธุ์ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์มะม่วง

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
พิวรีนทรานสิชัน	607
ทรานสเวอร์ชัน	65, 437 และ 609
อินเดิล	653

จึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน มาวิเคราะห์ร่วมกัน แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (รูปที่ 3) ซึ่งแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้นั้นพบว่าไม่สามารถแยกมะม่วงออกจากกันครบทุกพันธุ์ แต่สามารถแยกมะม่วงพันธุ์เชียวเสวย โชคอนันต์ อกร่อง และมะปริงปำ ออกจากมะม่วงพันธุ์อื่น ๆ

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *rbcl* ร่วมกัน

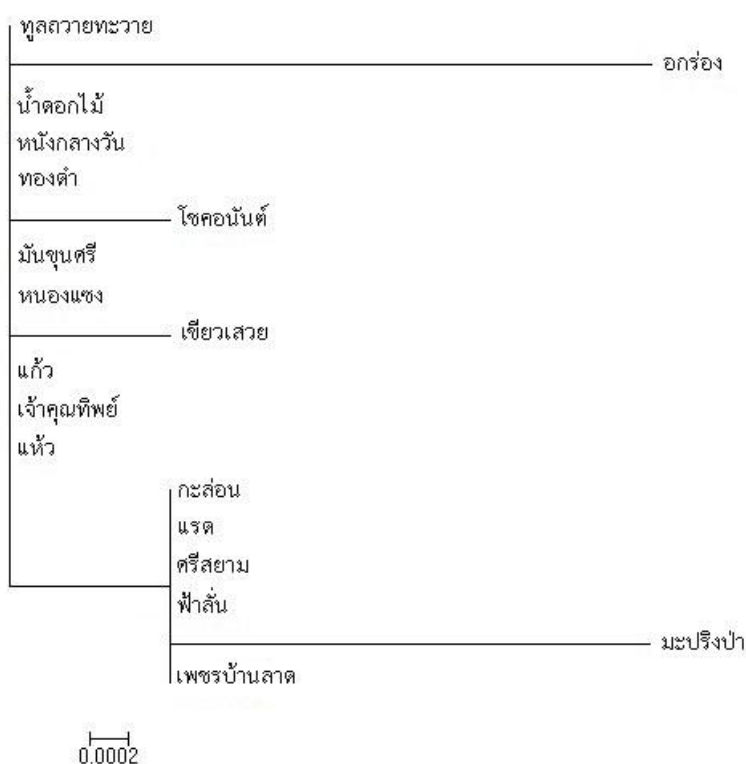
เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* หรือ *rbcl* เพียงยีนใดยีนหนึ่ง พบว่าแต่ละยีนสามารถแยกมะม่วงออกจากกันได้จำนวนน้อย ดังนั้น

4. วิจัยารณ์

การตรวจสอบมะม่วง 18 พันธุ์ โดยสกัดแยกดีเอ็นเอของมะม่วงและนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *rpoC1* และยีน *rbcl* แล้ววิเคราะห์

ลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *rpoC1* ในมะม่วงไม่สามารถแยกมะม่วง 18 พันธุ์ ออกจากกันทั้งหมด แต่สามารถแยกได้เพียง 2 พันธุ์ คือ มะปริงป่าและอกร่อง โดยนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 468 สามารถระบุพันธุ์มะปริงป่า และนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 551 และ 552 สามารถระบุพันธุ์อกร่อง อย่างไรก็ตาม เมื่อ

พิจารณาการแปลรหัส (translation) เป็นกรดอะมิโนพบว่าตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองนั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโน กล่าวคือ แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์และรหัสพันธุกรรม (genetic code) แต่ยังคงกำหนดการสร้างกรดอะมิโนชนิดเดิม ซึ่งถือว่าเป็นการกลายแบบพ้อง (synonymous mutation หรือ silent mutation) [16]



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *rbcL* ร่วมกัน

ในการทำงานเดียวกัน เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *rbcL* ในมะม่วง ก็ไม่สามารถแยกมะม่วง 18 พันธุ์ ออกจากกันครบทุกพันธุ์เช่นกัน แต่แยกเพียง 3 พันธุ์ คือ เขียวเสวย โชคอนันต์ และมะปริงป่า โดยมีมะม่วงอีก 15

พันธุ์ ที่เหลือสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ อกร่อง และมันขุนศรี และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ทองคำ เจ้าคุณทิพย์ กะล่อน แรด ศรีสยาม ฟ้าลั่น เพชรบ้านลาด หนองแขง หนังกลางวัน แห้ว แก้ว น้ำดอกไม้ และทุลฉวยทะวาย

นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 65 ที่มีความหลากหลายและจำเพาะกับมะม่วงพันธุ์มะปรางป่า เมื่อแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากทรีโอนีน (threonine) เป็นแอสพาราจีน (asparagine) (ตารางที่ 4) ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองจัดอยู่ในกลุ่มที่มีขั้วแต่ไม่มีประจุเช่นเดียวกัน ไม่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน และจัดเป็นการกลายเปลี่ยนกลาง (neutral mutation) [16]

นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 437 ที่มีความหลากหลายและจำเพาะกับมะม่วงพันธุ์มะปรางป่า เมื่อแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากทรีโอนีนเป็นเซอรีน (serine) ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองจัดอยู่ในกลุ่มมีขั้วแต่ไม่มีประจุเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 4) จัดเป็นการกลายเปลี่ยนกลาง [16]

นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 607 ที่มีความหลากหลายและจำเพาะกับมะม่วงพันธุ์เขียวเสวย เมื่อแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากกรดกลูตามิก (glutamic acid) เป็นไลซีน (lysine)

(ตารางที่ 4) โดยกรดกลูตามิกจัดอยู่ในกลุ่มมีขั้วและมีประจุเป็นลบ ส่วนไลซีนจัดอยู่ในกลุ่มมีขั้วและมีประจุเป็นบวก ซึ่งจัดเป็นการกลายแบบไม่พ้อง (missense mutation หรือ nonsynonymous mutation) [16] และอาจมีผลต่อการทำงานของโปรตีนหากอยู่ในส่วนสำคัญ

นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 609 ที่มีความหลากหลายและจำเพาะกับมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ เมื่อแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากกรดกลูตามิกเป็นกรดแอสพาทิก (aspartic acid) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จัดอยู่ในกลุ่มมีขั้วและมีประจุเป็นลบเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 4) ซึ่งเป็นการกลายเปลี่ยนกลาง [16]

นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 653 ที่มีความหลากหลายและจำเพาะกับมะม่วงพันธุ์มันขุนศรีและอกร่อง เมื่อแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่าลำดับกรดอะมิโนไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 4) ซึ่งเป็นการกลายแบบพ้อง [16]

ตารางที่ 4 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbCL* ที่ให้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบในมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ

ตำแหน่ง	พันธุ์มะม่วงที่จำเพาะ	รูปแบบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน
65	มะปรางป่า	C เป็น A	Thr เป็น Asn
437	มะปรางป่า	C เป็น G	Thr เป็น Ser
607	เขียวเสวย	G เป็น A	Glu เป็น Lys
609	โชคอนันต์	G เป็น C	Glu เป็น Asp
653	มันขุนศรีและอกร่อง	Gap (deletion)	ไม่เปลี่ยนแปลง

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน มาวิเคราะห์ร่วมกัน แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าไม่สามารถแยกมะม่วงออกจากกันครบทุกพันธุ์ แต่สามารถแยกมะม่วงพันธุ์เขียวเสวย โชคอนันต์ อกร่อง และมะปรางป่าออกจากพันธุ์อื่น ๆ

โดยอาศัยรูปแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะมาจำแนกพืชระดับพันธุ์ซึ่งอยู่ในชนิดหรือสปีชีส์ (species) เดียวกันนั้นมีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ สอดคล้องกับ นฤมล และคณะ [17] ที่

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *rbcl* ซึ่งไม่สามารถจำแนกข้าวมีสีออกจากกันครบทุกพันธุ์ โดยแตกต่างจาก สุรินทร์ และคณะ [18] ที่สามารถจำแนกมะม่วงแต่ละพันธุ์ได้โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) และ Wichan และคณะ [19] ที่สามารถจำแนกมะม่วงแต่ละพันธุ์ได้โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือเอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence repeat)

Topik และคณะ [20] พัฒนาเครื่องหมายรหัสแท่งดีเอ็นเอของยีน *matK* เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงในประเทศอินโดนีเซียและประเทศไทย พบว่าสามารถแยกมะม่วงเป็น 3 กลุ่มและแยกมะม่วง *M. laurina* และ *M. macrocarpa* ที่พบในประเทศอินโดนีเซียออกจากกันได้ เช่นเดียวกับ Suparman และคณะ [21] ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์

ทางพันธุกรรมของมะม่วงโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* โดยสามารถแยกมะม่วงเป็น 4 กลุ่ม และแยกมะม่วง *M. laurina* ที่พบในประเทศไทยและประเทศอินโดนีเซียออกจากกันได้ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะปลูกมีผลต่อชนิดและพันธุ์พืช อีกทั้งการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงบริเวณใดบริเวณหนึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการจำแนกพันธุ์พืช เนื่องจากลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่งนั้นมีขนาดเล็กมากเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดจีโนม (genome size) ของพืชชนิดนั้น ๆ [6] หรือเนื่องจากตำแหน่งนั้นมีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ต่ำ เป็นผลให้ตำแหน่งดังกล่าวไม่สามารถใช้แยกพืชในระดับพันธุ์ ต่างจากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเออื่นที่สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งจีโนม ซึ่งให้ผลดีกว่าการวิเคราะห์เพียงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งเท่านั้น [17,18]

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *rbcl* ที่ให้ความแตกต่างในมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ

ยีน	ตำแหน่ง	พันธุ์มะม่วงที่จำเพาะ	รูปแบบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์
<i>rpoC1</i>	468	มะปริงป๋า	C เป็น T
	551	อกร่อง	Gap (insertion)
	552	อกร่อง	Gap (insertion)
<i>rbcl</i>	65	มะปริงป๋า	C เป็น A
	437	มะปริงป๋า	C เป็น G
	607	เขียวเสวย	G เป็น A
	609	โชคอนันต์	G เป็น C

5. สรุป

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *rpoC1* และ *rbcl* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของมะม่วงได้ทั้ง 18 พันธุ์ โดยมีขนาดประมาณ 550 และ 650 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสอง แล้วสร้าง

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าไม่สามารถจำแนกมะม่วง 18 พันธุ์ ออกจากกันครบทั้งหมด โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* สามารถแยกมะม่วงได้เพียง 2 พันธุ์ คือ มะปริงป๋าและอกร่อง แม้พิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมด้วยก็ยังสามารถแยกได้เพียง 2 พันธุ์ เช่นเดิม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* สามารถแยกมะม่วงได้ 3 พันธุ์ คือ เชี่ยวเสวย โชคอนันต์ และมะปริงป้า และเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมก็สามารถแยกมะม่วงได้ 3 พันธุ์ ได้แก่ เชี่ยวเสวย โชคอนันต์ และมะปริงป้า เช่นเดิม โดยมะม่วงอีก 15 พันธุ์ สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ มั่นขุนศรี และอกร่อง ซึ่งไม่สามารถแยกออกจากกัน และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ทองดำ เจ้าคุณทิพย์ กะล่อน แรต ศรีสยาม ฟ้างัน เพชรบ้านลาด หนองแขง หนังกกลางวัน แห้ว แก้ว น้ำดอกไม้ และทุลฉวยทะวาย ซึ่งไม่สามารถแยกออกจากกัน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองมาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่าสามารถแยกมะม่วงพันธุ์ เชี่ยวเสวย โชคอนันต์ อกร่อง และมะปริงป้า ออกจากพันธุ์อื่น ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองดังกล่าวจึงยังไม่เหมาะสมต่อการจำแนกพันธุ์มะม่วง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะในบริเวณอื่นร่วมด้วย ทั้งนี้เพื่อให้สามารถแยกมะม่วงทั้ง 18 พันธุ์ ออกจากกันได้

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

7. รายการอ้างอิง

- [1] วนิษฐา หวานแสนะ, 2552, ประสิทธิภาพและประสิทธิผลของเอ็นเอและเอชไอพีออนเพื่อการชักนำการหลุดร่วงของช่อดอกและช่อดอกของมะม่วงน้ำดอกไม้, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- [2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว, 2556, มะม่วง : การผลิตและเทคโนโลยีหลังการ

เก็บเกี่ยว, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 836 น.

- [3] Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and Dewaard, J.R., 2003, Biological identification through DNA barcodes, *Proc. Royal Soc. B* 270: 313-321.
- [4] Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2008, DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105: 2761-2762.
- [5] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.U., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res.* 8: 6531-6535.
- [6] นฤมล ธนानันต์, วริศรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ, *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 22: 664-673.
- [7] นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่ใต้ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สังโตกลอกตาหมู่สังโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 22: 523-530.
- [8] นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร ไท่มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1*, *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 22: 664-673.

- [9] Gielly, L. and Taberlet, P., 1994, The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: Noncoding versus *rbcl* sequences, *Mol. Biol. Evol.* 11: 769-777.
- [10] ญัฐกร เพชรชา, ดวงมล แม้นศิริ และสุรพล แสนสุข, 2554, การประเมินดีเอ็นเอในพลาสติดบริเวณ *rpoC1* และ *rpoB* ในการใช้เป็น DNA Barcode และกรณีศึกษาในพืชสกุล *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae), pp. 554-563, ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 12, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- [11] Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- [12] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1626 p.
- [13] Kuo, B.L., 2003, ClustalW-MPI: ClustalW analysis using distributed and parallel computing, *Bioinformatics* 19: 1585-1586.
- [14] Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S., 2007, MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0, *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- [15] Saitou, N. and Nei, M., 1987, The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- [16] ชีระชัย ชนานันต์, 2553, พันธุศาสตร์โมเลกุล, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี, 148.
- [17] นฤมล ชนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และชีระชัย ชนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และ *rpoC1*, *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 22: 674-682.
- [18] สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ, เสาวนีย์ สุพทุธิธาดา และสุมน มาสุธน, 2538, การพัฒนาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อการจำแนกและรับรองพันธุ์มะม่วงและมังคุด, รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 45 น.
- [19] Wichan, E., Keizo, Y., Akira, S., Naoki, U. and Suranant, S., 1999, Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat-(SSR-) anchored primers, *Sci. Hort.* 82: 57-66.
- [20] Topik, H., Adi, P., Diah, K. and Wichan, E., 2012, Development *matK* gene as DNA barcode to assess evolutionary relationship of important tropical forest tree genus *Mangifera* (Anacardiaceae) in Indonesia and Thailand, *J. Teknol.* 59: 17-20.
- [21] Suparman, S., Adi, P. and Topik, H., 2013, Phylogenetic analysis of *Mangifera* based on *rbcl* sequences, chloroplast DNA, *Horticulture* 57: 235-240.