การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงในประเทศไทย

Using Nucleotide Sequences of *rpo*B Gene and *trn*H-*psb*A Intergenic Spacer Region for Analysis of Genetic Relationships among Mangoes in Thailand

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

ปิยดา บุสดี และธีระชัย ธนานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Narumol Thananantа*

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

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

Piyada Bussadee and Theerachai Thananantа

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

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

บทคัดย่อ

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของไทย โดยมะม่วงมีมากมายหลายพันธุ์ แต่มะม่วงที่สามารถส่งเป็นสินค้าออกไปยังต่างประเทศนั้นมีเพียงไม่กี่พันธุ์ เนื่องจากมะม่วงเป็นไม้ผลที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง อีกทั้งการจำแนกมะม่วงโดยใช้ลักษณะสัณฐานมักต้องใช้ระยะเวลาและมีความยุ่งยาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ทั้งนี้เพื่อการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต โดยรวบรวมมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทย จำนวน 18 พันธุ์ นำมาสกัดแยกดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะดังกล่าวด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW และ

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** narumolpla@yahoo.com
DOI 10.14456/tstj.2016.8

MEGA 6.0 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ไม่สามารถจำแนกมะม่วงทั้ง 18 พันธุ์ ออกจากกันได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นร่วมด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรและเหมาะสมสำหรับการจำแนกพันธุ์มะม่วง

คำสำคัญ : มะม่วง; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ยีน *rpo*B; ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

Abstract

Mango (*Mangifera indica* L.) is one of the important tropical fruits which are popularly grown in Thailand. There are a lot of mango cultivars, but only a few of them can be exported. The mango is a high genetic diversity and classification using morphological features often require long and complicated. This research was focused on identification of mangoes cultivars for conservation and improvement of mango cultivars in the future. Eighteen mangoes cultivars in Thailand were collected to study genetic relationships and identification. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplification of the chloroplast *rpo*B gene and *trn*H-*psb*A intergenic spacer region with each of universal primer pairs followed by DNA sequencing, and then compared by ClustalW for multiple sequences alignment and phylogenetic tree were constructed by MEGA 6.0. The results indicated that the nucleotide sequences of *rpo*B and *trn*H-*psb*A could not be distinguished all of 18 mango cultivars. Thus, it is suggested that the specific DNA sequences must simultaneously contain enough variability to be used for species identification. Although, used together with region-specific DNA sequences will be increase efficiency.

Keywords: mango; genetic relationship; *rpo*B gene; *trn*H-*psb*A intergenic spacer region

1. บทนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) อยู่ในวงศ์มะม่วง (Anacardiceae) มีชื่อสามัญว่า Mango เป็นไม้ผลพื้นเมืองของเอเชียเขตร้อน แต่พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ในหลายภูมิภาคของทวีปแอฟริกาและทั่วโลก รวม 90 ประเทศ [1,2] สำหรับประเทศไทยนั้นมะม่วงเป็นไม้ผลที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลาย เพราะเป็นพืชที่ปลูกง่าย สามารถบริโภคได้ทั้งผลดิบ ผลสุก หรือผ่านการแปรรูป [3] ดังนั้นจึงจัดเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย โดยมะม่วงมีชื่อท้องถิ่นหลายชื่อ ดังนั้นจึงมีความสับสนและยุ่งยากในการระบุพันธุ์ต่าง ๆ [4]

ปัจจุบัน การระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) หรือรหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode) เป็นเครื่องมือใหม่ทางชีวภาพ [5] ซึ่งมีแนวคิดมาจาก Hebert และคณะ ในปี ค.ศ. 2003 [6] โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอขนาดสั้น ๆ ใน บริเวณใดบริเวณหนึ่งหรือหลายบริเวณร่วมกัน สำหรับระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่ใช้เป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอนั้น จะต้องมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variability) ในระดับสปีชีส์ (species) หรือชนิด [7] เพื่อให้สามารถจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดออกจากกัน โดยใช้ไพรเมอร์สากล

(universal primer) เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอนั้น ๆ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) [8]

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ของมะม่วงในประเทศไทยโดยใช้ลำดับดีเอ็นเอจำเพาะ (specific DNA sequence) เนื่องจากมะม่วงมีพันธุ์ต่าง ๆ มากมาย โดยนอกจากมะม่วงพันธุ์เฉพาะทางการค้าแล้ว ยังมีมะม่วงพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา เนื่องจากมะม่วงเป็นพืชผสมข้าม (cross-pollinated plate) ซึ่งบ่อยครั้งที่มักพบว่ามะม่วงพันธุ์เดียวกัน แต่มาจากแหล่งเพาะปลูกที่ต่างกัน มักจะมีคุณภาพไม่เหมือนกัน ดังนั้นการตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอนอกจากจะทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแล้ว ยังเป็นประโยชน์ต่อการระบุหรือการจำแนกพันธุ์มะม่วงในระดับโมเลกุล (molecular identify) อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้เพื่อการอนุรักษ์และคุ้มครองพันธุ์มะม่วงของไทยด้วย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พันธุ์มะม่วง

มะม่วงที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เก็บรวมรวมภายในประเทศไทย จำนวน 18 พันธุ์ ได้แก่ โชคอนันต์ มะปริงป่า ทองดำ เจ้าคุณทิพย์ กะล่อน แรด ศรีสยาม ฟ้าลั่น เพชรบ้านลาด หนองแซง หนังกลางวัน มันขุนศรี แห้ว เขียวเสวย แก้ว น้ำดอกไม้ ทูลถวายทะวาย และอกร่อง

2.2 การสกัดแยกดีเอ็นเอ

สกัดแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [9] โดยบดใบมะม่วงปริมาณ 2-3 กรัม ให้ละเอียด เติมบัฟเฟอร์สกัด (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 และพอลิไวนิลไพรโรลิโดน (PVP, polyvinylpyrrolidone) ปริมาณ 0.3 กรัม เทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมเบตาเมอร์แคปโทเอทานอล (β-mercaptoethanol) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีการผสมด้วยการพลิกหลอดไปมาเป็นระยะ เมื่อครบเวลาจึงนำมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล (ethanol) ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วยบัพเฟอร์ทีอี (TE: 10mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วถ่ายสารละลายใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ RNase A (10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2.5 ไมโคร ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโคร ลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1

(chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมลิเนียร์พอลิอะครีลาไมด์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โซเดียมอะซีเตต พีเอช 5.2 (sodium acetate pH 5.2) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วยบัพเฟอร์ทีอี ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ [10]

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะ

เจือจางดีเอ็นเอของมะม่วง 18 พันธุ์ ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*B (Forward: 5′-AAG TGC ATT GTT GGA ACT GG-3′, Reverse: 5′-CCG TAT GTG AAA AGA AGT ATA-3′) และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A (*trn*H Forward: 5′-CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC-3′, *psb*A Reverse: 5′-GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C-3′) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 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 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.4 การวิเคราะห์ผล

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของมะม่วงที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยบริษัท Solgent (ประเทศเกาหลีใต้) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบความถูกต้องด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในมะม่วงแต่ละพันธุ์มาเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม Clustal W (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 6.0 (molecular evolutionary genetics analysis) [11] โดยเลือกการจัดกลุ่มแบบ neighbor-joining [12]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของมะม่วง 18 พันธุ์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวได้ทั้ง 18 พันธุ์ โดยผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส ยกเว้นผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของชิ้น

ดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในมะม่วงพันธุ์มะปริงป่า ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส

3.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในพืชอื่น ๆ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นั้นเป็นชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณที่ถูกต้อง หลังจากนั้นได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ยีน ของมะม่วงทั้ง 18 พันธุ์ ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยมีหมายเลขเฉพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

เมื่อเปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในมะม่วง 18 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม ClustalW แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B ไม่สามารถจำแนกมะม่วงทั้ง 18 พันธุ์ ออกจากกันได้ทั้งหมด เช่นเดียวกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A แต่สามารถจำแนกมะม่วงพันธุ์มะปริงป่าออกจากมะม่วงพันธุ์อื่น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B ให้ความหลากรูป (polymerphism) ระหว่างมะม่วงทั้ง 18 พันธุ์ คือ ตำแหน่ง 171 ซึ่งเกิดการกลาย (mutation) จากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบพิวรีนทรานสิชัน (purine transition) และให้ความจำเพาะกับมะม่วงพันธุ์มะปริงป่า อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาการแปลรหัส (translation) เป็นสายพอลิเพปไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 171 นี้เมื่อแปลรหัสจะไม่มีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโน จัดเป็นการกลายแบบพ้อง (synonymous mutation หรือ silent mutation) [13]

ตารางที่ 1 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในมะม่วง 18 พันธุ์

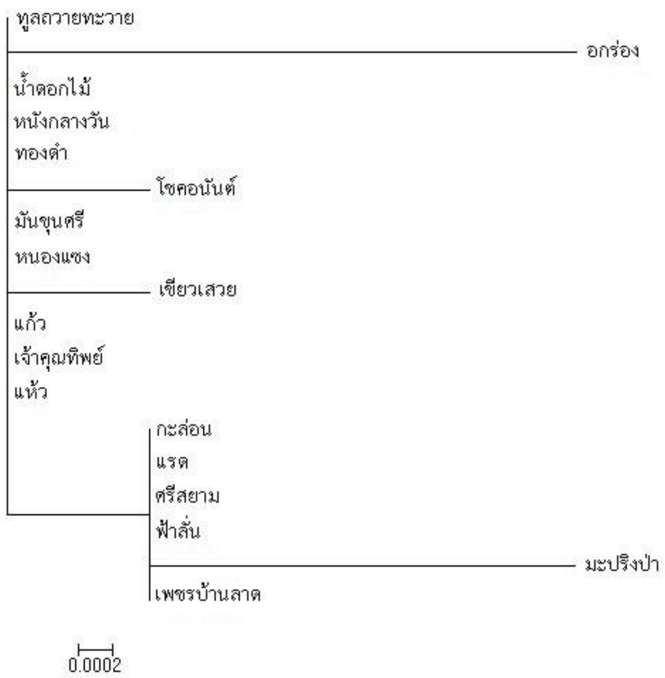
พันธุ์มะม่วง	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์	
	*rpo*C1	*rbc*L
โชคอนันต์	KR422626	KR071822
มะปริงป่า	KR422627	KR071823
ทองดำ	KR422628	KR071824
เจ้าคุณทิพย์	KR422629	KR071825
กะล่อน	KR422630	KR071826
แรด	KR422631	KR071827
ศรีสยาม	KR422632	KR071828
ฟ้าลั่น	KR422633	KR071829
เพชรบ้านลาด	KR422634	KR071830
หนองแซง	KR422635	KR071831
หนังกลางวัน	KR422636	KR071832
มันขุนศรี	KR422637	KR071833
แห้ว	KR422638	KR071834
เขียวเสวย	KR422639	KR071835
แก้ว	KR422640	KR071836
น้ำดอกไม้	KR422641	KR071837
ทูลถวายทะวาย	KR422642	KR071838
อกร่อง	KR422643	KR071839

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ให้ความหลากรูประหว่าง

มะม่วงทั้ง 18 พันธุ์ 3 บริเวณ ได้แก่ (1) ตำแหน่ง 221-527 มีการเปลี่ยนแปลงแบบอินเดล (insertion/deletion, indel) (2) ตำแหน่ง 539 มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) และ (3) ตำแหน่ง 602-609 มีการเปลี่ยนแปลงแบบอินเดล [13]

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน

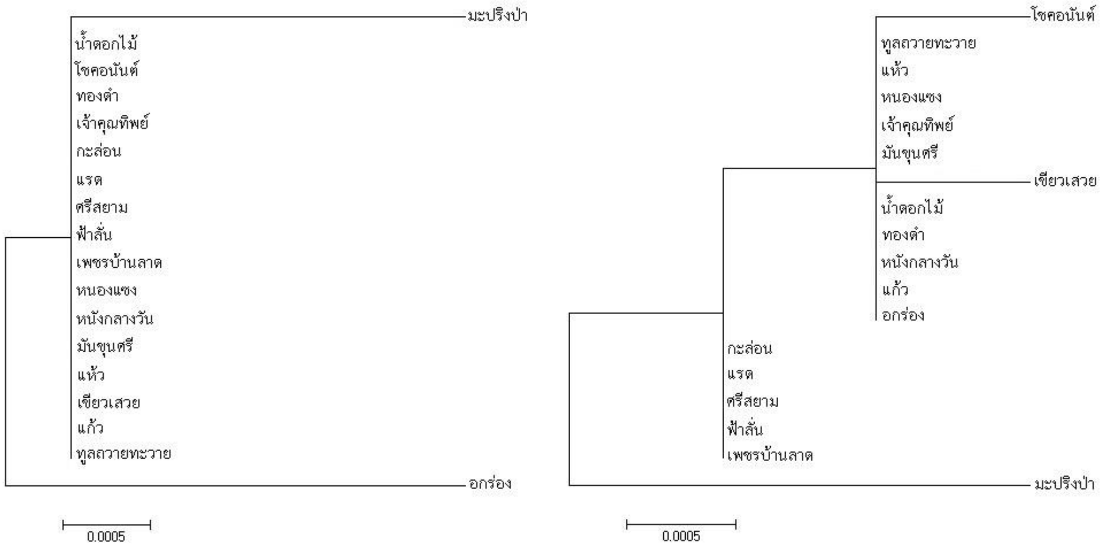
ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เพียงบริเวณใดบริเวณหนึ่งนั้น พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละบริเวณมีประสิทธิภาพในการจำแนกพันธุ์มะม่วงต่ำ จึงได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ มาวิเคราะห์ร่วมกัน แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งผลที่ได้จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนั้น พบว่ายังไม่สามารถจำแนกมะม่วงออกจากกันได้ครบทุกพันธุ์ อย่างไรก็ตามสามารถจำแนกมะม่วงพันธุ์มะปริงป่าได้ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน

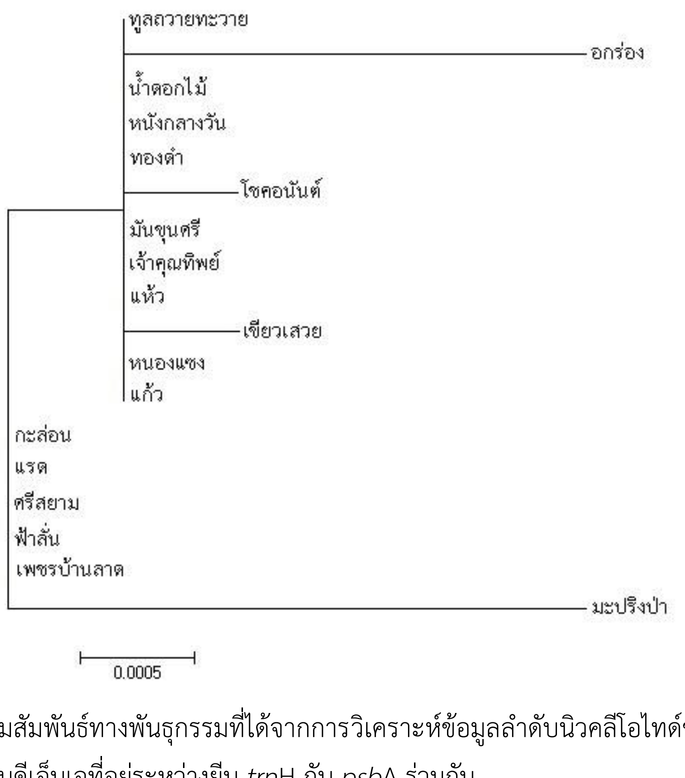
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1, *rbc*L, *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน

เนื่องจากผลการการวิจัยในครั้งนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง*ยีน trn*H กับ *psb*A นั้นสามารถจำแนกมะม่วงได้เพียง 1 พันธุ์ คือ มะปริงป่า ดังนั้นจึงได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณอื่น คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และ *rbc*L จากงานวิจัยครั้งก่อน [14] ที่เคยรายงานไว้แล้วมาวิเคราะห์ร่วมกัน



(ก) **(ข)**

รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1, *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน (ก) และการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L, *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1, *rbc*L, *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1, *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน พบว่าสามารถจำแนกมะม่วงได้ 2 พันธุ์ คือ มะปริงป่าและอกร่อง (รูปที่ 2ก)

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L, *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน พบว่าสามารถจำแนกมะม่วงได้ 3 พันธุ์ คือ เขียวเสวย โชคอนันต์ และมะปริงป่า (รูปที่ 2ข)

และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1, *rbc*L, *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน พบว่าสามารถจำแนกมะม่วงได้ 4 พันธุ์ คือ เขียวเสวย โชคอนันต์ มะปริงป่า และอกร่อง (รูปที่ 3)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1, *rbc*L, *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A คือบริเวณที่นิยมใช้เป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอสำหรับพืชโดยทั่วไป [15] แต่ในงานวิจัยนี้วิเคราะห์พันธุ์มะม่วงต่าง ๆ ที่อยู่ในสปีชีส์หรือชนิดเดียวกัน ดังนั้นจึงมีความใกล้ชิดกันและมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสูง ทำให้ยากต่อการจำแนกพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณใดบริเวณหนึ่ง ซึ่งต่างจากการจำแนกพืชที่ต่างชนิดกัน เช่น การจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย [16] การจำแนกกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม [17] การจำแนกกล้วยไม้สกุลกุหลาบ [18] การจำแนกพืชในวงศ์มะม่วง [19,20]

ผลการวิจัยครั้งนี้ พบว่าไม่สามารถจำแนกพันธุ์มะม่วงโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A นั้น เนื่องจากยีน *rpo*B ประกอบด้วยลำดับดีเอ็นเอขนาดสั้นและยังไม่ค่อยมีรายงานว่าเป็นบริเวณที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตำแหน่งเพื่อระบุชนิดของพืช [21] เช่นเดียวกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ซึ่งมีรายงานว่าเป็นบริเวณที่ใช้ระบุชนิดได้ในพืชบางชนิด [22] ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A จึงยังไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แม้ว่าจะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าวร่วมกับตำแหน่งจำเพาะบริเวณอื่น ได้แก่ ยีน *rbc*L และ *rpo*C1 ก็ยังไม่สามารถจำแนกมะม่วงทั้ง 18 พันธุ์ ออกจากกันได้ครบทุกพันธุ์

อย่างไรก็ตาม การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงบางตำแหน่งซึ่งมีขนาดเล็กมากเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดจีโนม (genome size) ของพืชทั้งหมด [23] ดังนั้นจึงไม่สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ดีเท่ากับเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่นิยมใช้ในการตรวจสอบทั้งจีโนมพืช ตัวอย่าง เช่น การจำแนกมะม่วงด้วยไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือเอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence repeat) และเอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) จากงานวิจัยของ Wichan และคณะ [4,24] หรือการจำแนกมะม่วงด้วยวิธีอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymerphic DNA) จากงานวิจัยของสุรินทร์ และคณะ [25] ซึ่งสามารถแยกมะม่วงแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้

4. สรุป

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในมะม่วง 18 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ ไม่เหมาะสำหรับการใช้จำแนกพันธุ์มะม่วง เนื่องจากมะม่วงแต่ละพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสูง

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์

ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจำแนกพันธุ์มะม่วงได้เพียง 1 พันธุ์ คือ มะปริงป่า อย่างไรก็ตาม ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ ดังกล่าว สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นในการนำไปพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการจำแนกพันธุ์มะม่วงต่อไป

5. รายการอ้างอิง

[1] Yakubu, M.T. and Salimon, S.S., 2015, Antidiarrhoeal activity of aqueous extract of *Mangifera indica* L. leaves in female albino rats, J. Ethnopharmacol. 163: 135-141.

[2] Ingrid, P.I., Perla, A.R., Carmen, H.B., Daniel, A. and Jacobo, V., 2015, Effects of postharvest ripening on the nutraceutical and physicochemical properties of mango (*Mangifera indica* L. cv. Keitt), Postharvest Biol. Technol. 103: 45-54.

[3] มนตรี นันทสิทธิ์, 2556, การปลูกมะม่วง, ธนธัชการพิมพ์, กรุงเทพฯ, 128 น.

[4] 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.

[5] Liu, Z., Zeng, X., Yang, D., Chu, G., Yuan, Z., and Chen, S., 2012, Applying DNA barcodes for identification of plant species in the family Araliaceae, Gene 499: 76-80.

[6] 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.

[7] Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2008, DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 105: 2761-2762.

[8] 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.

[9] 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.

[10] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Labolatory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1626 p.

[11] 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.

[12] Saitou, N. and Nei, M., 1987, The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.

[13] ธีระชัย ธนานันต์, 2553, พันธุศาสตร์โมเลกุล, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี, 148 น.

[14] ปิยดา บุสดี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 และ *rbc*L, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 983-993.

[15] Degtjareva, G.V., Logacheva, M.D., Samigullin, T.H., Terentieva, E.I. and Valiejo-Roman, C.M., 2012, Organization of chloroplast *psb*A-*trn*H intergenic spacer in dicotyledonous angiosperms of the family umbelliferae, Biochemistry 77: 1056-1064.

[16] นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของของยีน *mat*K และ *rpo*C1, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 664-673.

[17] นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่ไต่ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 523-530.

[18] นฤมล ธนานันต์, วริศรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 664-673.

[19] Topik, H., Shahkila, M.A. and Azman, A.S., 2013, Molecular biodiversity of selected mango cultivars based on DNA sequences of internal transcribed spacer region, Pakistan J. Biol. Sci. 16: 1072-1075.

[20] Suparman, S., Adi, P., Topik, H., 2013, Phylogenetic analisys of Mangifera base on *rbc*L sequences, chloroplast DNA, Sci. Papers. Ser. B Hort. 57: 235-240.

[21] นฤมล ธนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 674-682.

[22] Das, S., Dash, H., Mangwani, N., Chakraborty, J., and Kumari, S., 2014, Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms, J. Microbiol. Meth. 103: 80-100.

[23] Li, M., Wong, K., Chan, W., Li, J., But, P.P.H., Cao, H., and Shawa, P., 2012, Establishment of DNA barcodes for the identification of the botanical sources of the Chinese 'cooling' beverage, Food Control 25: 758-766.

[24] Wichan, E., Keizo, Y., Shinya, K. and Akira, S., 2000, Amplified fragment length polymorphism analysis for studying genetic relationships among Mangifera species in Thailand, J. Am. Soc. Hort. Sci. 125: 160-164.

[25] สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2538, การพัฒนาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อการจำแนกและรับรองพันธุ์มะม่วงและมังคุด, รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 45.