

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
และการจำแนกทุเรียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*
Assessment of Genetic Relationship and Identification of
Durian (*Durio zibethinus* Murr.)
Using Nucleotide Sequences of *rbcl* Gene

ทัศนีย์ สิงห์ศิริรักษ์ และธีระชัย ธานานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธานานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Tassanee Singhsilarak 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

ทุเรียนเป็นผลไม้เขตร้อนที่เจริญเติบโตได้ดีบริเวณใกล้แถบเส้นศูนย์สูตร จัดเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สามารถส่งออกขายภายนอกประเทศและทำรายได้สูง เนื่องจากทุเรียนเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ในประเทศไทยพบว่ามีทุเรียนมากกว่า 200 พันธุ์ ดังนั้นการจำแนกโดยเพียงลักษณะสัณฐานภายนอกจึงทำได้ยากและเกิดความผิดพลาดง่าย งานวิจัยนี้ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกทุเรียน 40 พันธุ์ โดยเลือกศึกษาในยีน *rbcl* แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 ผลการวิจัยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ไม่สามารถแยกความแตกต่างของทุเรียน 40 พันธุ์ ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะอื่นหรือวิเคราะห์ร่วมกันหลายบริเวณ ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์และประสิทธิภาพในการจำแนกให้สูงขึ้น

คำสำคัญ : ทุเรียน; ยีน *rbcl*; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก

Abstract

Durian (*Durio zibethinus* Murr.) is a tropical fruit that grows well near the equator. Besides being popular of local consumption, it is a major economic fruit of Thailand because it can be exported to abroad and produces enormous income. There are more than 200 cultivars of durian in Thailand, thus the identification by morphological characteristics is difficult and erroneous. This research, the nucleotide sequence of specific gene was selected to assess the genetic relationship and to identify all 40 durian cultivars using DNA sequences of *rbcl* gene. Then, phylogenetic tree was constructed by MEGA7. The results showed that *rbcl* genes could not be used to identify 40 cultivars of durian. Therefore, the nucleotide sequences of other specific genes or more genes should be analyzed, to enhance a variability of the nucleotide sequences and increase the efficiency.

Keywords: durian; *Durio zibethinus*; *rbcl*; genetic relationship; identification

1. คำนำ

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) เป็นไม้ผลเขตร้อนที่เติบโตได้ดีในบริเวณใกล้เส้นศูนย์สูตรและมีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งมีศูนย์กลางของความหลากหลายอยู่ในเกาะบอร์เนียว (Mendoza, 1941; Lim, 1990) ทุเรียนถือเป็นผลไม้พื้นเมืองของประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย และบรูไน (Orwa *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าทุเรียนจะไม่ได้มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย แต่ก็ปลูกได้หลายพื้นที่และถือเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญ เพราะสร้างรายได้ให้กับประเทศอย่างมหาศาล โดยพันธุ์ที่นิยมของผู้บริโภคและสามารถส่งออกไปขายยังต่างประเทศ ได้แก่ หมอนทอง ชะนี ก้านยาว กระดุมทอง และพวงมณี แม้ว่าในประเทศไทยพบทุเรียนมากกว่า 200 พันธุ์ก็ตาม (ทรงพล, 2551)

มีการรวบรวมพันธุ์ทุเรียนในประเทศไทย และมีการจำแนกทุเรียนเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกบ กลุ่มหลวง กลุ่มก้านยาว กลุ่มกำป็น กลุ่มทองย้อย และกลุ่มเบ็ดเตล็ด (หิรัญ และคณะ, 2541) โดยจำแนกตามลักษณะสัณฐาน (morphology) ของทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ทรงผล และหนามผล ซึ่ง

เป็นลักษณะค่อนข้างคงที่ หรือลักษณะประจำพันธุ์ (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544) ซึ่งการจำแนกพันธุ์ให้ตรงตามลักษณะทำได้ยากและเกิดความผิดพลาดได้ง่าย จึงต้องอาศัยความเชี่ยวชาญเฉพาะของบุคคล และเพื่อเพิ่มความแม่นยำจึงได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการศึกษา ลักษณะทางพันธุกรรมให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของตำแหน่งจำเพาะ (specific site)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะช่วงสั้น ๆ (150-800 คู่เบส) ซึ่งผ่านการประเมินว่ามีศักยภาพเพียงพอที่ใช้ระบุ (identification) ชนิดของสิ่งมีชีวิต จัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่ผสมผสานกับเครื่องมือทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) อาจเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงบริเวณเดียวหรือใช้หลายบริเวณร่วมกัน โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR, polymerase chain reaction) แล้วตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (วุฒิพงศ์, 2554)

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ 7 บริเวณ ที่อยู่ในคลอโรพลาสต์จีโนม

(chloroplast genome) ประกอบด้วย 4 ยีน และ 3 ชั้นส่วนระหว่างยีน (spacer) ที่มีศักยภาพและเหมาะสมสำหรับนำมาเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้แก่ *rpoC1*, *rbcL*, *matK*, *rpoB*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI* และ *tmH-psbA* (Kress *et al.*, 2005; Kress and Erickson, 2007; Chase *et al.*, 2007; Pennisi *et al.*, 2007; Lahaye *et al.*, 2008; Fazekas *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010)

งานวิจัยนี้ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ซึ่งมีการศึกษาแล้วว่าเหมาะสมในการจำแนกพืช (วูคิงค์, 2554) โดยยีน *ribulose-bisphosphate carboxylase (rbcL)* อยู่ในคลอโรพลาสต์ กำหนดการสร้างเป็นพอลิเปปไทด์ (polypeptide) หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) ของเอนไซม์รูบิสโก (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RubisCO) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในพืช (Gielly *et al.*, 1994)

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกพันธุ์ทุเรียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) และวิเคราะห์ผล จะเป็นประโยชน์ต่อการจำแนกพันธุ์ทุเรียนให้ชัดเจนและแม่นยำยิ่งขึ้น ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ การคัดเลือกพันธุ์เชิงการค้า รวมทั้งตรวจสอบเพื่อระบุพันธุ์ได้โดยไม่ต้องรอให้ทุเรียนออกดอกและรอให้ผลเจริญเติบโตเต็มที่

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างทุเรียน

ทุเรียนที่ใช้ในงานวิจัย จำนวน 40 พันธุ์ แบ่งเป็น 6 กลุ่ม (ตารางที่ 1)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบทุเรียน 40 พันธุ์ ด้วย

วิธีที่ประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1978) ตามวิธีของ วริศรา และคณะ (2557) แล้วนำมาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 % (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน

rbcL

เจือจางดีเอ็นเอของทุเรียน 40 พันธุ์ ที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้น 100 ng/μl แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) 100 ng/μl ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.1, 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM MgCl₂) โดยมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 2 mM และไพรเมอร์สากล (universal primer) ที่จำเพาะกับยีน *rbcL* (*rbcL*-F: 5'-TCA-CCA-CAA-ACA-GAA-ACT-AAA-GC-3' กับ *rbcL*-R: 5'-GGC-ACA-AAA-TAA-GAA-ACG-ATC-TC-3') ปริมาณ 250 nM (CBOL Plant Working Group, 2009) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (นฤมล และคณะ, 2557)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 % (จินต์ และคณะ, 2558)

ตารางที่ 1 ทุเรียน 40 พันธุ์ ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

กลุ่ม	ชื่อพันธุ์	กลุ่ม	ชื่อพันธุ์		
กบ	กบวัดกล้วย (Kop Watklual)	ลวง	ลวงทอง (Luang Thong)		
	กบเจ้าคุณ (Kop Choakhun)		ย่ามะหวาด (Yammawat)		
	กบชายน้ำ (Kop Chainam)		ชะนี (Chani)		
	กบหน้าศาล (Kop Nasan)		ชะนีน้ำตาลทราย (Chani Namtansai)		
	กบรัศมี (Kop Ratsami)		ชมพูปาน (Chomphu Phan)		
	กบพิบูล (Kop Phikun)		ชมพุศรี (Chompu Sri)		
	กบสุวรรณ (Kop Suwan)		ทองย้อย	นกหยิบ (Nokyip)	
เบ็ดเตล็ด	ห้าลูกไม่ถึงฝัว (Haluk Maithuengphua)	ทองย้อยฉัตร (Thongyoichat)			
	ทองแดง (Thongdeang)	ฉัตรสีทอง (Chat Sithong)			
	พวงมณี (Phuang Mani)	ธรณีไหว (Thoraniwai)			
	หลงลับแล (Longlap-lae)	ทับทิม (Taptim)			
	สาลิกา (Salika)	กำปัน		กำปันเหลือง (Kampan Lueang)	
	หลินลับแล (Linlap-lae)			กำปันเดิม (Kampan Doem)	
	กะเทยเนื้อขาว (Kathoei Nueakhao)			หมอนทอง (Monthong)	
	อีลีบนายทิพย์ (E-Lipnaitip)	กำปันพวง (Kampan Phuang)		ก้านยาว	ก้านยาววัดสัก (Kanyao Watsak)
	เม็ดในก้านยาว (Metnai Kanyao)	ก้านยาวสีนาค (Kanyao Si-nak)			
	จอกลอย (Chok-loi)	ก้านยาว (Kanyao)			
	เม็ลต์อารีย์ (Malet Ar-ri)	ทองสุข (Thongsuk)			
	ก้านสั้น (Kansan)	ตันไหญ่ (Tonyai)			
	กะเทยขั้วสั้น (Kathoei Khuasan)				

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ที่พบความแตกต่างในทุเรียน 40 พันธุ์

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ที่พบการเปลี่ยนแปลง
ทรานสเวอร์ชัน	27,29,30,41,42,45
พิวรีนทรานซิชัน	33

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ที่มีผลต่อการสร้างกรดอะมิโน

ตำแหน่ง	หมายเลขพันธุ์	การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน
27	3,35,36,37,38,40	T เป็น G	Ser เป็น Arg
29	3,36,37	T เป็น G	Val เป็น Gly
41,42	35	C เป็น G และ T เป็น G	Ala เป็น Gly

2.4 การวิเคราะห์ผล

ตรวจสอบปริมาณชนิดดีเอ็นเอของยีน *rbcl* ที่เพิ่มได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลีใต้) แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรวจสอบความถูกต้องโดยเปรียบเทียบข้อมูล นิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรวจสอบได้ทั้งหมดฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุเรียน 40 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0, <http://www.mega-software.net>) โดยเลือกการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood และกำหนดค่า bootstrap เป็น 1,000 รอบ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณชนิดดีเอ็นเอของยีน *rbcl*

เมื่อใช้ไพรเมอร์สากลสำหรับยีน *rbcl* เพิ่มปริมาณชนิดดีเอ็นเอในทุเรียน 40 พันธุ์ พบว่าเพิ่มปริมาณชนิดดีเอ็นเอของยีนได้ขนาด 661 คู่เบส ซึ่งมีขนาดตรงตามที่คาดไว้

3.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในทุเรียนทั้ง 40 พันธุ์ โดยเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ที่ได้จาก บริษัท Bioneer กับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าตรงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

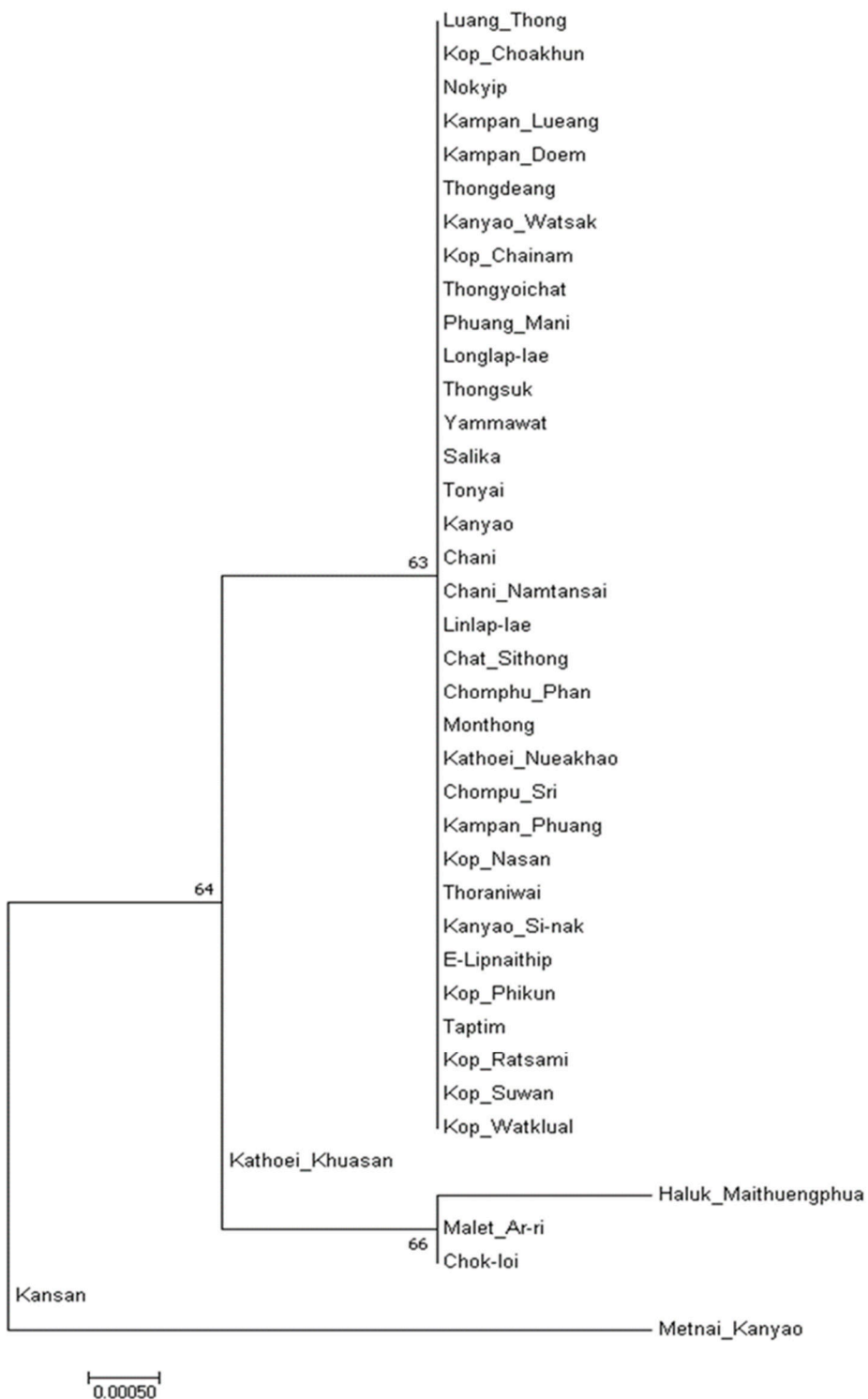
rbcl ในพืชอื่น จากนั้นได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยมีหมายเลขจำเพาะ (accession number) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 2

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในทุเรียนทั้ง 40 พันธุ์ พบว่าไม่สามารถจำแนกพันธุ์ทุเรียนออกจากกันทั้งหมด (รูปที่ 1) โดยจำแนกได้เพียง 4 พันธุ์ คือ กะเทยขั้วสั้น หัวลูกไม่ถึงผิว ก้านสั้น และเม็ดในก้านยาว ซึ่งทั้ง 4 พันธุ์ จัดอยู่ในกลุ่มเบ็ดเตล็ดดังที่สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติได้จัดกลุ่มตามลักษณะสันฐาน เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* พบว่ามีตำแหน่งที่เกิดการกลาย (mutation) ที่ให้ความหลากหลาย (polymorphism) จำนวน 7 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3) คิดเป็น 1.06 % ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด โดยพบ 2 รูปแบบ คือ พิวรีนทรานซิชัน (purine transition) และทรานสเวอร์ชัน (transversion)

3.4 การอภิปราย

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในทุเรียน 40 พันธุ์ ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของทุเรียนทั้งหมด มีเพียงบางพันธุ์เท่านั้นที่แยกได้ คือ กะเทยขั้วสั้น หัวลูกไม่ถึงผิว ก้านสั้น และเม็ดในก้านยาว เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในทุเรียนทั้ง 40 พันธุ์ พบตำแหน่งที่แตกต่างกัน 7 ตำแหน่ง และพบการกลาย 2 รูปแบบที่ทำให้เกิดความหลากหลาย ซึ่งจะเห็นว่าการจำแนกพันธุ์ทุเรียนโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* นั้นยังไม่เหมาะสมต่อการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เนื่องจากยีน *rbcl* ที่นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานมีขนาดสั้น (ประมาณ 500-700 คู่เบส) ทำ



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียน 40 พันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rbcL*

ให้มีความผันแปรเพียงเล็กน้อยในพืช (Kress and Erickson, 2007) โดย CBOL Plant Working Group ได้เสนอไว้ว่าควรวิเคราะห์ตำแหน่งจำเพาะร่วมกันหลายบริเวณ ตัวอย่างงานวิจัยที่เคยศึกษาในพืชชนิดอื่นแล้วพบว่า มีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อวิเคราะห์ตำแหน่งจำเพาะร่วมกันหลายบริเวณ ได้แก่ การจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* พบว่าจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ชัดเจนกว่าการใช้เพียงยีนเดียว (นฤมล และคณะ, 2559) และการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL* ในการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ในโกรเซอร์ซูเซ และลูกผสมจำนวน 21 ชนิด/พันธุ์ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* พบนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลาย 339 ตำแหน่ง (คิดเป็น 35.53 %) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* พบนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายเพียง 16 ตำแหน่ง (คิดเป็น 2.41 %) และเมื่อวิเคราะห์ร่วมกันสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการจำแนกมากถึง 71.4 % (ธีระชัย และคณะ, 2560) ซึ่งจะเห็นได้ว่าตำแหน่งจำเพาะขนาดยาวจะมีความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ได้มากกว่า

ทุเรียน 40 พันธุ์ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นทุเรียนที่จัดอยู่ในกลุ่มเบ็ดเตล็ด 13 พันธุ์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* สามารถจำแนกทุเรียน 4 พันธุ์ ในเบ็ดเตล็ด (คิดเป็น 30.8 %) โดยพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มเบ็ดเตล็ดถือว่าเป็นกลุ่มที่มีลักษณะไม่แน่ชัด บางลักษณะอาจเหมือนในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งใน 5 กลุ่ม และมีลักษณะที่ผันแปรออกไป (หิรัญ และคณะ, 2530) ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ในทุเรียนที่เกิดการกลายไปส่งผลให้ลักษณะภายนอกของทุเรียนเกิดความแตกต่าง เช่น ทุเรียนพันธุ์ห้าลูกไม่ถึงฝ่าที่ได้ชื่อว่าเป็นทุเรียนพันธุ์เล็กที่มีรสชาติอร่อย

การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้น

พบว่าเกิดการกลาย 2 รูปแบบ คือ ทรานสเวอร์ชัน และพิวรีนทรานซิชัน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลง 7 ตำแหน่ง และมีผลทำให้พอลิเพปไทด์เปลี่ยนแปลงด้วย (ตารางที่ 4) ได้แก่

ลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยน 1 ตำแหน่ง ณ ตำแหน่งที่ 27 เกิดการเปลี่ยนแปลงจากไทมีน (T) เป็นกวานีน (G) มีผลทำให้พอลิเพปไทด์เปลี่ยนจากเซอรีน (S) เป็นอาร์จินีน (R) โดยเซอรีนเป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีประจุ ส่วนอาร์จินีนเป็นกรดอะมิโนที่มีประจุบวก จัดเป็นการกลายแบบไม่พ้อง (missense mutation) และอาจมีผลต่อการทำงานของโปรตีน (ธีระชัย, 2553)

ลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยน 1 ตำแหน่ง ณ ตำแหน่งที่ 29 เกิดการเปลี่ยนแปลงจากไทมีน (T) เป็นกวานีน (G) มีผลทำให้พอลิเพปไทด์เปลี่ยนจากกวาลีน (V) เป็นไกลซีน (G) ซึ่งกวาลีนและไกลซีนเป็นพวกไม่มีขั้วทั้งคู่ จัดเป็นการกลายแบบเป็นกลาง (neutral mutation) และไม่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน (ธีระชัย, 2553)

ลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยน 2 ตำแหน่ง ณ ตำแหน่งที่ 41 และ 42 เกิดการเปลี่ยนแปลงจากไซโทซีน (C) เป็นกวานีน (G) และเบสไทมีน (T) เป็นกวานีน (G) ตามลำดับ มีผลทำให้พอลิเพปไทด์เปลี่ยนจากอะลานีน (A) เป็นไกลซีน (G) ซึ่งทั้งอะลานีนและไกลซีนเป็นพวกไม่มีขั้ว จัดเป็นการกลายแบบเป็นกลางและไม่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน (ธีระชัย, 2553)

ปัจจุบันการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะกำลังได้รับความนิยมและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ศึกษาวิวัฒนาการทั้งในสัตว์และพืช ได้แก่ การศึกษายีน *cox1*, *cox2*, *cox3*, *cob* และ *ATP6* ในรา (Min and Hickey, 2007) การศึกษายีน *matK*, *rbcL* และ *trnH-psbA* ในพืชสกุลหวาย (Yang et al., 2012)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพันธุ์ทุเรียนโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะนั้น มีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในทุเรียนที่ปลูกต่างพื้นที่ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* มีขนาด 1509 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ของ NCBI พบว่ามีความแตกต่างกันเล็กน้อย มีรายงานการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (random amplification polymorphic DNA, RAPD) จำแนกพันธุ์ทุเรียน โดยสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ ทุเรียนพื้นเมืองที่เป็นพันธุ์ดั้งเดิม และทุเรียนพันธุ์เพาะปลูก (อรอนงค์, 2549)

นอกจากมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะแล้ว ยังมีงานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นเพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียน เช่น การวิเคราะห์พันธุกรรมของทุเรียนพื้นบ้านในภาคใต้โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) ในทุเรียน 67 ต้น เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถเป็น 6 กลุ่มโดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม 0.52-0.95 (ฮุดดา และคณะ, 2557) การวิเคราะห์จัดจำแนกพันธุ์ทุเรียนโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) ในทุเรียน 130 พันธุ์ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มทุเรียนเป็น 2 กลุ่ม (จิตาภรณ์ และคณะ, 2549)

ทุเรียนที่ศึกษานั้นเป็นพืชชนิด (species) เดียวกันทั้ง 40 พันธุ์ จึงมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสูง หรือมีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ การจำแนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* จึงยังไม่เหมาะสม สอดคล้องกับงานวิจัยที่ประเมินความความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *rbcl* ในมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ (พืชชนิดเดียวกัน) (ปิยดา และคณะ, 2558) ซึ่งก็พบว่ามะม่วง 18 พันธุ์ สามารถ

แยกได้เพียง 3 พันธุ์ โดยให้ผลต่างจากการศึกษาในพืชต่างชนิด เช่น การศึกษาพืชเขตร้อนในท้องถิ่น 436 ชนิด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* สามารถแยกความแตกต่างของพืชได้ถึง 79.8 % แต่เมื่อวิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* พบว่าจำแนกได้ 100 % (Burgess *et al.*, 2011) แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเหมาะสมกับพืชต่างชนิดหรือต่างสกุล โดยสามารถจำแนกได้ดีกว่าพืชชนิดเดียวกัน และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะมากกว่าหนึ่งบริเวณให้ผลได้กว่าการใช้เพียงบริเวณเดียว

4. สรุป

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียน 40 พันธุ์ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* นั้น เมื่อเพิ่มปริมาณชนิดดีเอ็นเอของยีน *rbcl* พบว่าได้ชนิดดีเอ็นเอขนาด 661 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในพืชอื่น เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood พบว่าไม่สามารถจำแนกพันธุ์ทุเรียนทั้งหมดออกจากกัน จำแนกได้เพียง 4 พันธุ์ คือ กะเทยข้าวส้น หัวลูกไม้ ถึงผิว ก้านสั้น และเม็ดในก้านยาว ซึ่งเป็นพันธุ์ทุเรียนที่จัดอยู่ในกลุ่มเบ็ดเตล็ด ดังนั้นการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในทุเรียนโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ยังไม่เหมาะสม ควรวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะอื่น ๆ ร่วมด้วย หรือใช้เครื่องหมาย ดีเอ็นเอที่เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกพันธุ์ทุเรียนให้ดีขึ้น

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างใบทุเรียนจาก คุณชจร พงศ์สิขนิรันดร์ ซึ่งเป็นเจ้าของสวนบ้านเรา ตำบลกระแสน อำเภอกงไกรลาศ จังหวัดระยอง

6. รายการอ้างอิง

จินต์ ทองสม, ภัทรพร คุ่มภัย, ชีระชัย ธนानันต์ และ นฤมล ธนानันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้า หมูเข็ม โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และซีเอ็นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23(6): 994-1005.

จิตาภรณ์ สุขโหด, อินทรา จารุเพ็ง, ประไพ โมจิรินทร์, อภิรดี เพิ่มผล, อรุณณี สระแก้ว, ศิริวรรณ เทียนมงคล, ปิยรัชฎ์ ปริญาพงษ์ และพรชัย จุฑามาศ, 2549, การจัดจำแนกทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) โดยใช้เทคนิค AFLP, น. 405-410, การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย : สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว, โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, กรุงเทพฯ.

ทรงพล สมศรี, 2551, ทุเรียนไทยและการปรับปรุงพันธุ์ : กรณีศึกษาพันธุ์จันทบุรี 1 จันทบุรี 2 จันทบุรี 3, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ชีระชัย ธนานันต์, 2553, พันธุศาสตร์โมเลกุล, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี, 148 น.

ชีระชัย ธนานันต์, จุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมูไทรเฮอริซุเซ และลูกผสม ด้วย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl*, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 25(4): 579-590.

นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่โต๋ และชีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตา หมูสิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(4): 523-530.

นฤมล ธนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และชีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(5): 674-682.

นฤมล ธนานันต์, ภัทรา หงษ์ทองดี และชีระชัย ธนานันต์, 2559, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl*, Thai J. Sci. Technol. 5(2): 169-180.

ปิยดา บุสดี, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcl* และ *rpoC1*, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23(6): 983-993.

วิริสรา แทนสง่า, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3(2): 102-112.

วุฒิพงศ์ มหาคำ, 2554, DNA barcode ของพืช : หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้และข้อจำกัด, ว.พฤกษศาสตร์ไทย 3(1): 1-30.

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544, ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์ทุเรียน, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

- หิรัญ หิรัญประดิษฐ์ และทรงพล สมศรี, 2530, การคัด clone ทุเรียนพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน, รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2530, สถาบัน วิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- หิรัญ หิรัญประดิษฐ์, สุขวัฒน์ จันทรปราณี และ เสริมสุข สลักเพ็ชร์, 2541, เทคโนโลยีการผลิตทุเรียน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อรอนงค์ หนูชูเชื้อ, 2549, การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับองค์ประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ในทุเรียนต่างสายพันธุ์, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สุดา แก้วศรีสม, กรกช นาคคณอง, และจรัสศรี นวลศรี, 2557, การวิเคราะห์พันธุกรรมของทุเรียนพื้นบ้านในภาคใต้โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์, ว.แก่นเกษตร 42(3): 271-276.
- Burgess, K.S., Fazekas, A.J., Kesanakurti, P.R., Kesanakurti, P.R., Graham S.W., Husband B.C., Newmaster, S.G., Percy D.M., Hajibabaei M. and Barrett, S.C.H., 2011, Discriminating plant species in a local temperate flora using the *rbcL* + *matK* DNA barcode, *Method Ecol. Evol.* 2: 333-340.
- CBOL Plant Working Group, 2009, A DNA barcode for land plants, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 106: 12794-12797.
- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jorgensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pederson, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barraclough, T.G., Kelly, L. and Wilkinson, M., 2007, A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants, *Taxon* 56: 295-299.
- Chen, S.L., Yao, H., Han, J.P., Liu, C., Song, J.Y., Shi, L.C., Zhu, Y.J., Ma, X.Y., Gao, T., Pang, X.H., Luo, K., Li, Y., Li, X.W., Jia, X.C., Lin, Y.L. and Leon, C., 2010, Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species, *PLoS ONE* 5: 1-8.
- 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.
- Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., Percy, D.M., Hajibabaei, M., and Barrett, S.C.H., 2008, Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well, *PLoS ONE* 3: e2802.
- 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.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., and Janzen, D.H., 2005, Use of DNA barcodes to identify flowering plants, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102: 8369-8374.
- Kress, J.W. and Erickson, D.L., 2007, A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region, *PLoS ONE* 2: e508.
- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Papulin, F., Gigot, G., Maurin,

- O., Duthoit, S., Barraclough, T.G. and Savolainen, V., 2008, DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105: 2923-2928.
- Lim, T.K., 1990, Durian: Diseases and Disorders, Tropical Press, Kuala Lumpur, 95 p.
- Mendoza, D.R., 1941, Natural distribution of durians in the Philippines, Philip. J. Forest. 4: 27-35.
- Michael, J.B., 1997, *Durio*: A Bibliographic Review, IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) office for South Asia, New Delhi.
- Min, X. and Hickey, D.A., 2007, Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi, Mol. Ecol. Notes 7: 365-373.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. and Anthony, S., 2009, *Durio zibethinus*, Agroforestry Database version 4.0: 1-5.
- Pennisi, E., 2007, Wanted: A barcode for plants, Science 318: 190-191.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Yang, H.Q., Dong, Y.R., Gu, Z.J., Liang, N. and Yang, J.B., 2012, A preliminary assessment of *matK*, *rbcl* and *trnH-psbA* as DNA barcodes for *Calamus* (Arecaceae) Species in China with a note on ITS, Annales Botanici Fennici. 49: 319-330.