

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลินจีจากเครื่องหมายโมเลกุล
ไอเอสเอสอาร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL*

และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF*

Genetic Relationships among Lychee (*Litchi chinensis*
Sonn.) Cultivars Based on ISSR Markers, DNA Sequences of
rbcL Gene and *trnL-trnF* Intergenic Spacer Region

สิริมา สุวรรตน์, แสงทอง พงษ์เจริญกิต และยุพเยาว์ คบพิมาย*

สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

วินัย วิริยะอลงกรณ์

สาขาไม้ผล คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

จันทร์เพ็ญ สระระ

ฝ่ายปรับปรุงและพัฒนาพันธุกรรมพืชและสัตว์ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

ศรัณย์ จิณะเจริญ^A

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50300

Sirima Suwarat, Saengtong Pongjaroenkit and Yuppayao Kophimai*

Division of Genetics, Faculty of Science, Maejo University,
Nonghan, Sansai, Chiang Mai 50290

Winai Wiriya-Alongkorn

Division of Pomology, Faculty of Agricultural Production, Maejo University,
Nonghan, Sansai, Chiang Mai 50290

Junpen Sara

Division of Genetic Improvement and Development of Plants and Animal,
The Office of Agricultural Research and Extension, Maejo University, Nonghan, Sansai, Chiang Mai 50290

Saran Cheenacharoen^A

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University,
Changphuak, Muang, Chiang Mai 50300

Received: February 15, 2019; Accepted: February 28, 2019

บทคัดย่อ

ลิ้นจี่เป็นไม้ผลที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ปลูกกันมากในเขตภาคเหนือและภาคกลางของประเทศ พันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ พันธุ์ฮงฮวย พันธุ์โอวเฮียะ พันธุ์กิมเจง พันธุ์จักรพรรดิ และพันธุ์ค่อม ปัจจุบันภูมิอากาศมีการเปลี่ยนแปลงมากขึ้นส่งผลให้เกิดปัญหาการไม่ออกดอกติดผลของลิ้นจี่ ทำให้เกษตรกรบางส่วนล้มเลิกการปลูกลิ้นจี่ ซึ่งอาจเกิดการสูญหายของลิ้นจี่พันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นมหาวิทยาลัยแม่โจ้จึงได้รวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์ลิ้นจี่ไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ เพื่อเป็นการจัดทำฐานข้อมูลทางพันธุกรรม จึงมีความจำเป็นต้องใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกพันธุ์ งานวิจัยนี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ในการจำแนกลิ้นจี่จำนวน 23 พันธุ์ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 91 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายจำนวน 79 แถบ คิดเป็น 86.81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.529-1.000 และแบ่งลิ้นจี่ทั้ง 23 พันธุ์ เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม I เป็นพันธุ์ลิ้นจี่ภาคกลางทั้งหมด กลุ่ม II มีทั้งพันธุ์ภาคกลางและพันธุ์ภาคเหนือและกลุ่ม III เป็นพันธุ์ภาคเหนือ แต่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ลิ้นจี่ จำนวน 3 คู่ เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* พบว่าค่าความต่างทางพันธุกรรมระหว่างลิ้นจี่ 23 พันธุ์ อยู่ในช่วง 0.0000-0.0035 โดยพันธุ์จินแดงมีความต่างทางพันธุกรรมจากพันธุ์อื่น ๆ เมื่อวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลำไยเป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม พบว่าสามารถแยกพันธุ์ลิ้นจี่ออกจากลำไย แต่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ลิ้นจี่ ยกเว้นพันธุ์จินแดง

คำสำคัญ : ลิ้นจี่; เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์; ยีน *trnL-trnF*; ยีน *rbcl*

Abstract

Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) is an economically important fruit crop in Thailand, mainly cultivating in the northern and central part of the country. The popular cultivars are Hong Huai, Ohia, Kimjeng, Chakraphat and Khom. Currently, climate changes cause on-off flowering of lychee, and therefore many farmers have stopped growing the crop which may lead to a loss of traditional cultivars. Meajo University thus have collected and conserved many lychee cultivars in the germplasm field. In establishing a genetic database, it is necessary to classify lychee cultivars using molecular markers. This research aimed to genetically identify 23 lychee cultivars using 20 ISSR (inter-simple sequence repeat) markers and DNA sequences of *rbcl* gene together with *trnL-trnF* intergenic spacer region. The results showed that ISSR markers produced 91 bands, 79 (86.81 %) of which were polymorphic. The genetic relationship analysis revealed the similarity coefficients among lychee cultivars ranged from 0.529-1.000, and the lychee samples were categorized into 3 groups: group I consisted of cultivars grown in the central part of the country; group II consisted of cultivars from central and northern part and group III composed of those from the northern part. However, three cultivar pairs were not genetically separated. Analysis of DNA sequences of *rbcl* gene and *trnL-trnF* intergenic spacer region showed the genetic distance coefficients varied from 0.0000-0.0035, where Jeen Daeng cultivar was

different from other cultivars. When analyzing genetic relationships using longan as an outgroup, lychee cultivars were separated from longan but among lychee cultivars could not be distinguished, except Jeen Daeng cultivar.

Keywords: *Litchi chinensis*; ISSR marker; *trnL-trnF* gene; *rbcl* gene

1. คำนำ

ลิ้นจี่เป็นไม้ผลเขตร้อน (subtropical fruit) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Litchi chinensis* Sonn. อยู่ในวงศ์ Sapindaceae เช่นเดียวกับเงาะและลำไย นิยมเรียกว่า Lychee หรือ Litchi มีถิ่นกำเนิดทางภาคใต้ของสาธารณรัฐประชาชนจีน แถบมณฑลกวางตุ้งและฝูเจี้ยน (Groff, 1921) สำหรับในประเทศไทยมีการนำลิ้นจี่เข้ามาปลูกช่วงปลายศตวรรษที่ 17 (Subhadrabandhu, 1990) และปลูกกันอย่างแพร่หลาย พบมากในเขตภาคเหนือและเขตภาคกลางของประเทศ พันธุ์ลิ้นจี่ที่นิยมปลูก ได้แก่ พันธุ์ฮงฮวย พันธุ์โอเอียะ พันธุ์กิมเจง พันธุ์จักรพรรดิ และพันธุ์ค่อม ถือได้ว่าลิ้นจี่เป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย นอกจากนี้ยังพบว่าลิ้นจี่มีสารสำคัญ ได้แก่ สารต้านโรคมะเร็ง (Wang *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2012) สารต้านการอักเสบ (Huang *et al.*, 2014) และสารต้านอนุมูลอิสระ (Yang *et al.*, 2006) เป็นต้น ลิ้นจี่เป็นพืชที่ต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการออกดอก แต่จากสภาพอากาศที่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำให้ลิ้นจี่มีปัญหาเกี่ยวกับการออกดอกติดผล ส่งผลให้เกษตรกรเปลี่ยนไปทำสวนไม้ผลชนิดอื่นที่ให้ผลผลิตที่ดีกว่าลิ้นจี่ ซึ่งอาจทำให้ลิ้นจี่บางพันธุ์หายไปได้ ทั้งนี้สาขาไม้ผล มหาวิทยาลัยแม่โจ้ได้มีการรวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์ลิ้นจี่ไว้ทั้งหมด 22 พันธุ์ แต่ยังไม่มีการจัดทำฐานข้อมูลเกี่ยวกับพันธุกรรมของลิ้นจี่ที่รวบรวมไว้

การจำแนกพันธุ์ลิ้นจี่มีหลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ วิธีฐานฐานวิทยา เป็นการจำแนกโดยศึกษาโครงสร้างส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ลักษณะของลำต้น ใบ

ดอก ผล เมล็ด เป็นต้น (ชินวัณน์, 2541; Madhou *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2016) วิธีเซลล์พันธุศาสตร์ จำแนกลิ้นจี่จากความแตกต่างของจำนวน ขนาด และรูปร่างของโครโมโซมในระยะเมทาเฟส การศึกษาลิ้นจี่ 19 พันธุ์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ $2n=30$ (ชินวัณน์, 2541) วิธีเครื่องหมายโมเลกุลได้รับความนิยมเนื่องจากมีความแม่นยำและไม่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถจำแนกพันธุ์ลิ้นจี่ ได้แก่ ไอโซไซม์ (Isozyme) (ชินวัณน์, 2541; Aradhya *et al.*, 1995; Degani *et al.*, 1995) อาร์เอฟพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) (Anuntalabhochai *et al.*, 2002; Tongpamnak *et al.*, 2002; Manoj *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2015) แฮตอาร์เอฟพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) (Wangspa *et al.*, 2005; Cutler *et al.*, 2006; Chundet *et al.*, 2007) เอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence repeat) (Viruel and Hormaza, 2004; Mingfang *et al.*, 2006; Madhou *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2011; Madhou *et al.*, 2013) ไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat) (Degani *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2015; Bajpai *et al.*, 2016) เอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) (Tongpamnak *et al.*, 2002; Ganjun *et al.*, 2003) และสไนป์ส์ (SNP, single-nucleotide polymorphism) (Liu *et al.*, 2015)

นอกจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อจำแนกสิ่งมีชีวิตแล้ว ยังใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจำแนกสิ่งมีชีวิตด้วย โดยนิยมเลือกบริเวณที่มีความ

ผันแปรทางพันธุกรรมสูง แต่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve sequence) ตัวอย่าง เช่น ยีน *ribulose-bisphosphate carboxylase (rbcL)* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง large subunit ของเอนไซม์ ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RUBISCO) (Gielly and Taberlet, 1994) เกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในพืช ยีน *rbcL* มีขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส (ปรีชา, 2543) นอกจากนี้ยังมีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน *trnL* (UAA)-*trnF* (GAA) ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตอีกด้วย (Taberlet *et al.*, 1991)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลินจี่พันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน *trnL-trnF* ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการจำแนกพันธุ์ลินจี่ การจัดการทรัพยากรพันธุกรรม ลินจี่และการปรับปรุงพันธุ์ลินจี่ในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างใบลินจี่ 22 พันธุ์ จากแปลงรวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์ลินจี่ สาขาไม้ผล คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และใบลินจี่พันธุ์โกมินทร์จากแปลงเกษตรกร อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้ลำไยเป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) ชื่อพันธุ์ลินจี่และลำไยแสดงในตารางที่ 1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนใช้วิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) สารสกัดดีเอ็นเอประกอบด้วย 2 % (w/v) CTAB, 0.98 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 1 % (w/v) PVP-40, 0.5 % (w/v) sodium metabisulfite และ 1 % (v/v) β -mercaptoethanol ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความ

เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

2.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 10-40 นาโนกรัม ไพเรเมอร์เข้มข้น 0.40 ไมโครโมลาร์ และ 1x MyTaq Red mix (Bioline United Kingdom) โดยใช้ไพเรเมอร์ทั้งหมด 20 ไพเรเมอร์ (Degani *et al.*, 2003) ดังตารางที่ 2 ใช้สภาวะอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที อุณหภูมิที่จำเพาะของแต่ละไพเรเมอร์ นาน 15 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 40 รอบ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ถ่ายภาพด้วยเครื่อง Molecular Imager Gel Doc™ XR + with Image Lab™ Software (Bio-Rad) โดยแต่ละไพเรเมอร์ทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อยืนยันการทำซ้ำได้

การวิเคราะห์ผล

ให้สัญลักษณ์แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและสามารถทำซ้ำได้เป็น 1 หากไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 0 นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Nei และ Li (1979) โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรม FreeTree

(Hampel *et al.*, 2001) เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ แสดงผลแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วย UPGMA และทำซ้ำจำนวน 2,000 ครั้ง (bootstrap) โปรแกรม TreeView (Page, 1996)

ตารางที่ 1 ชื่อพันธุ์ลิ้นจี่ลำไยและหมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) ของยีน *rbcl* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ชื่อภาษาไทย	ชื่อภาษาอังกฤษ	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์	
		<i>rbcl</i>	<i>trnL-trnF</i>
1. กวางเจา	Kwangjao	MK189224	MK189249
2. สาแหรกทอง	Saraekthong	MK189232	MK189257
3. โอวเฮียะ	Ohia	MK189231	MK189256
4. จีนใหญ่	Jeen Yai	MK189219	MK189244
5. กะโหลกใบอ้อ	Kalok Bai-or	MK189221	MK189246
6. กิมเจง	Kimjeng	MK189223	MK189248
7. จักรพรรดิ	Chakraphat	MK189215	MK189240
8. ช่อระกำ	Chorrakham	MK189214	MK189239
9. ฮงฮวย	Hong Huai	MK189217	MK189242
10. สำเภาทอง	Samphaothong	MK189234	MK189259
11. ไทย	Thai	MK189235	MK189260
12. กรอบแก้ว	Krobkaeo	MK189227	MK189252
13. สำเภาแก้ว	Samphaokhaeo	MK189233	MK189258
14. นครพนม 1	Nakhon Phanome 1	MK189230	MK189255
15. บริวสเตอร์	Brewster	MK189213	MK189238
16. กะโหลกใบใหม่	Kalok Baimai	MK189220	MK189245
17. หัวจีน	Haewjeen	MK189216	MK189241
18. เขียวหวาน	Khiaowan	MK189229	MK189254
19. กระโถนทองพระโรง	Kratone Thongphrarong	MK189228	MK189253
20. ค่อม	Khom	MK189225	MK189250
21. กะโหลกใบยาว	Kalok Bai-yao	MK189222	MK189247
22. จีนแดง	Jeen Daeng	MK189218	MK189243
23. โกมินทร์	Komin	MK189226	MK189251
24. ลำไย พันธุ์จัมโบ้ 19	Jumbo 19	MK189236	MK189261
25. ลำไย พันธุ์เพชรสาคร 9	Pech Sakorn 9	MK189237	MK189262

ตารางที่ 2 รายละเอียดของไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์และแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	Ta (°C)	ขนาดแถบ (คู่เบส)	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ ความหลากหลาย	เปอร์เซ็นต์ของความหลากหลาย
1	808	(AG) ₈ C	58	300-1,200	3	2	66.67
2	809	(AG) ₈ G	58	500-1,300	6	6	100.00
3	810	(GA) ₈ T	55	400-3,000	5	5	100.00
4	817	(CA) ₈ A	58	450-2,000	8	8	100.00
5	828	(TG) ₈ A	58	600-850	4	4	100.00
6	834	(AG) ₈ YT	55	600-1,500	5	5	100.00
7	835	(AG) ₈ YC	50	400-1,800	9	9	100.00
8	836	(AG) ₈ YA	55	300-900	4	3	75.00
9	842	(GA) ₈ YG	55	300-1,300	9	9	100.00
10	844	(CT) ₈ GC	50	1,100-1,500	2	0	0.00
11	845	(CT) ₈ RG	45	900	1	0	0.00
12	847	(CA) ₈ RC	58	500-1,500	4	2	50.00
13	855	(AC) ₈ YT	55	600-2,000	3	3	100.00
14	856	(AC) ₈ YA	58	300-2,000	5	5	100.00
15	864	(ATG) ₆	50	600-1,600	7	5	71.43
16	867	(GGC) ₆	NA	NA	NA	NA	NA
17	880	(GGAGA) ₃	50	450-1,600	7	6	85.71
18	888	BDB(CA) ₇	NA	NA	NA	NA	NA
19	889	DBD (AC) ₇	50	600-1,100	4	2	50.00
20	890	VHV (GT) ₇	55	650-1,200	5	5	100.00
รวม					91	79	86.81
เฉลี่ย					5.06	4.39	77.71

*R คือ A หรือ G; Y คือ C หรือ T; B คือ C หรือ G หรือ T; D คือ A หรือ G หรือ T; H คือ A หรือ C หรือ T; V คือ A หรือ C หรือ G; *NA คือ ไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสม

2.3 การศึกษาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trnL-trnF*

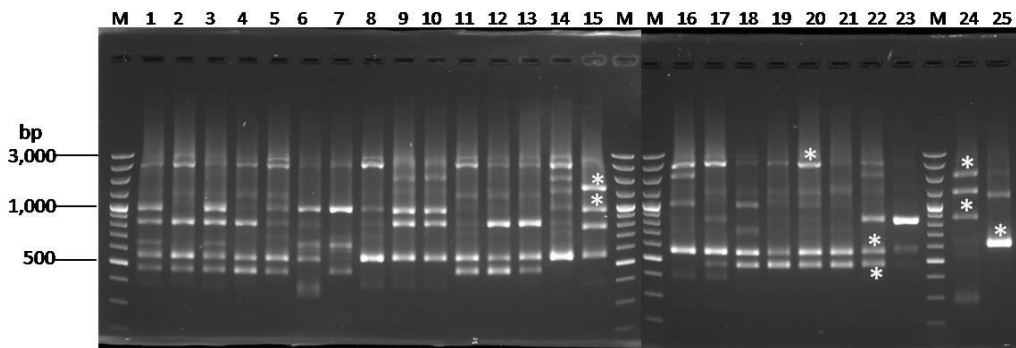
ทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์สปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ 40 นาโนกรัม 1X Phusion Flash master mix (Thermo Scientific) ไพรเมอร์สำหรับยีน *rbcL* คือ *rbcL*-F:

5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC-3' (Levin *et al.*, 2003) และ *rbcL*-R: 5'-GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG-3' (Kress and Erickson, 2007) ไพรเมอร์สำหรับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* คือ *trnL-trnF*-F: 5'-GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC-3' และ *trnL-trnF*-R: 5'-ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG-3' (Amundsen

and Warnke, 2012) ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 30 รอบ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และนำไปตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิลีคโตรโฟเรซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First Base ประเทศมาเลเซีย

การวิเคราะห์ผล

เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ลินจีทั้ง 23 พันธุ์ และลำไย 2 พันธุ์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งด้าน forward และ reverse มาตรวจสอบความสอดคล้องด้วยโปรแกรม Genestudio 2.2.0.0 (Genestudio, Inc., Suwanee, GA, USA) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพันธุ์ลินจีและลำไย ด้วยโปรแกรม Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) แล้วแสดงผลในโปรแกรม GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997) เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ นำผลที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์มาหาค่าความต่างทางพันธุกรรมและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) โดยทดสอบโมเดลที่เหมาะสมก่อนนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) โดยทำซ้ำจำนวน 2,000 ครั้ง (bootstrap) (Felsenstein, 1985)



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอไอเอสเอสอาร์ในลินจี 23 พันธุ์ และลำไย 2 พันธุ์ ที่ได้จากไพรเมอร์ 817 (M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน; หมายเลข 1-25 คือ ลินจีและลำไยเรียงลำดับตามตารางที่ 1; * แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในตัวอย่างลินจีและลำไย จำนวน 8 แถบ)

3. ผลการวิจัย

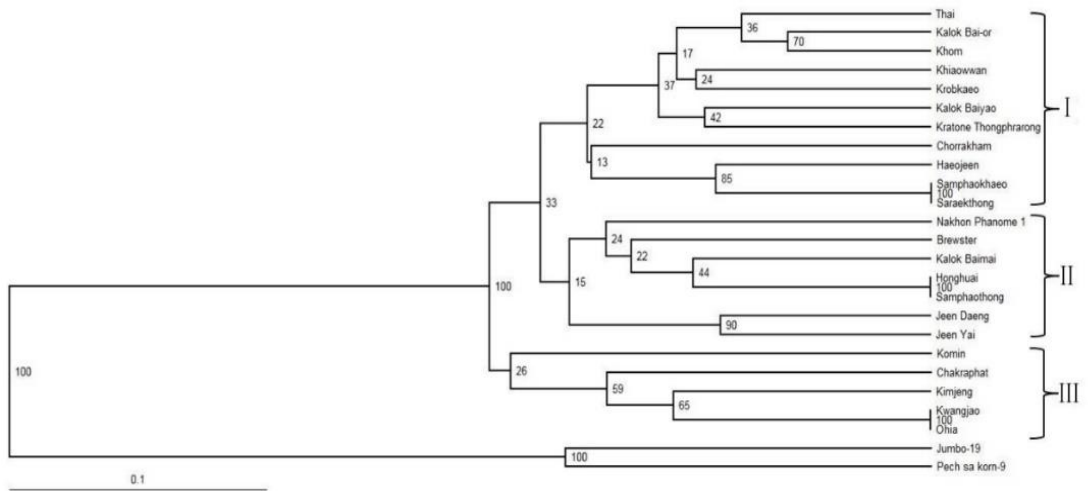
3.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมจากเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ 20 ไพรเมอร์ พบว่า 18 ไพรเมอร์

สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนเหมาะสำหรับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เช่น รูปที่ 1 ซึ่งเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 817 ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในตัวอย่างลินจีและลำไย จำนวน 8 แถบ (แสดงด้วย *) ส่วน

ดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวทั้ง 23 พันธุ์ ขนาดประมาณ 540 และ 440 คู่เบส ตามลำดับ โดยที่ขนาดแถบ ดีเอ็นเอของลีนจีแต่ละพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถอ่าน ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และบริเวณระหว่าง ยีน *trnL-trnF* ความยาว 506 และ 378 คู่เบส ตาม ลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ในลีนจีพบความผันแปรเพียง 1 ตำแหน่ง ที่ ตำแหน่ง 358 พันธุ์ที่มีความแตกต่างจากพันธุ์อื่น

คือ พันธุ์จีนแดง โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์จากกวานีน (guanine, G) เป็นอะดีนีน (adenine, A) ซึ่งเป็นการแทนที่นิวคลีโอไทด์แบบ ทรานซิชัน (transition) ดังรูปที่ 3 (A) เมื่อพิจารณา การแปลรหัส (translation) เป็นกรดอะมิโนของยีน *rbcL* พบว่าตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับ นิวคลีโอไทด์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโน ซึ่งเป็นการกลายแบบพ้อง (synonymous mutation หรือ silent mutation) (ธีระชัย, 2553)



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในลีนจี 23 พันธุ์ ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ จำนวน 18 ไพรเมอร์ โดยการจัดกลุ่มแบบ UPGMA

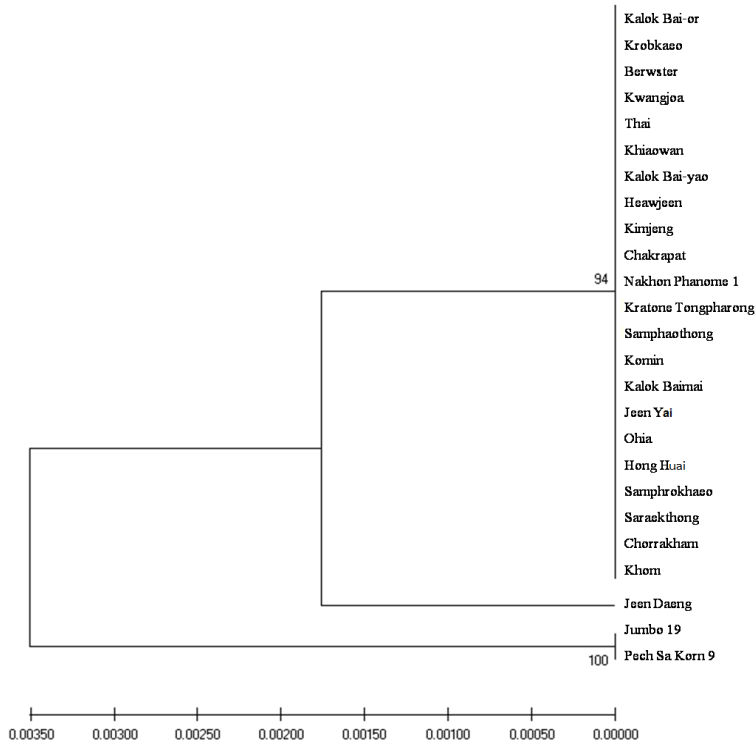
เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* พบความผันแปร 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง 164 นิวคลีโอไทด์กวานีน เปลี่ยนเป็นอะดีนีน ซึ่งเป็นการแทนที่นิวคลีโอไทด์ แบบทรานซิชัน ตำแหน่ง 167 นิวคลีโอไทด์อะดีนีน เปลี่ยนเป็นกวานีน ซึ่งเป็นการแทนที่นิวคลีโอไทด์ แบบทรานซิชัน และพบอินเดล (indel) ที่ตำแหน่ง 201-206 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ TTTTAG ดังรูปที่ 3 (B)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* มาวิเคราะห์ร่วม

กัน พบว่าค่าความต่างทางพันธุกรรมระหว่างลีนจี 23 พันธุ์ อยู่ในช่วง 0.0000-0.0035 โดยที่พันธุ์จีนแดงมีค่าความต่างทางพันธุกรรมจากพันธุ์อื่น ๆ ส่วนอีก 22 พันธุ์ ไม่มีความต่างทางพันธุกรรม เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยโมเดล ที่เหมาะสม คือ Tamura 3-parameter method (Tamura., 1992) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* สามารถแยก กลุ่มของลีนจีออกจากลำไย และแยกพันธุ์จีนแดง ออกจากลีนจีพันธุ์อื่น ๆ แต่ไม่สามารถแยกพันธุ์ ลีนจีที่เหลืออีก 22 พันธุ์ ออกจากกัน ดังรูปที่ 4

	358		164	167	201	206
Kalok Bai-or	A	GGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC	B	TGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Krobkako		GGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		TGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Berwstar		GGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		TGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Kwanggoa		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Thai		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Khiaowan		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Kalok Bai-yao		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Heawjeen		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Kimjong		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Chakrapat		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Nakhon Phanome 1		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Khom		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Kratone Tongpharong		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Samphaothong		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Komin		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Kalok Baimai		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Jeen Yai		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Ohia		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Hong Huai		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Samphrokhao		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Saakthong		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Chorrakham		CTAGAGGATCTACGATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Jeen Daeng		CTAGAGGATCTACGAATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Jumbo 19		CTAGAGGATCTACGAATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT
Pech sa Korn 9		CTAGAGGATCTACGAATCCCTCCCGCGTATTCGAAAAC		CCGATTGCGCAATCCATATGATTGCTCATACTGAAACTTACAAG	-----	TTTTCTT

รูปที่ 3 ความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* (A) และบริเวณระหว่างยีน *tmL-trmF* (B) ในลินจีและลำไย



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในลินจี 23 พันธุ์ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และบริเวณระหว่างยีน *tmL-trmF* โดยใช้ลำไย 2 พันธุ์ เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม

4. วิจารณ์ผล

4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมจากเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบ่งลินจีทั้ง 23 พันธุ์ เป็น 3 กลุ่ม โดยการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในงานวิจัยนี้ พบว่าลินจีพันธุ์

กิมเจง พันธุ์จักรพรรดิ และพันธุ์โอวเฮียะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (กลุ่ม III) เหมือนกับการจัดกลุ่มลินี่ของ Cutler และคณะ (2006) ที่พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสการ์ (SCAR, sequence characterized amplified region) จากเครื่องหมายโมเลกุลแอสตาร์ทเอพีดีซึ่งเชื่อมโยงกับอุณหภูมิชักนำการออกดอกของลินี่ ในงานวิจัยนี้ยังพบว่าลินี่พันธุ์บริวสเตอร์และพันธุ์ฮงฮวยอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (กลุ่ม II) และพันธุ์ค่อมกับพันธุ์สำเภากวอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (กลุ่ม I) เช่นเดียวกับการจัดกลุ่มของ Tongpamnak และคณะ (2002) ที่ศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลินี่ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี แต่การวิจัยนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ลินี่ 3 คู่ ออกจากกัน คือ (1) พันธุ์กวางเจากับโอวเฮียะ โดยทั้ง 2 พันธุ์ นี้มีลักษณะของผลที่คล้ายกัน แต่ลักษณะของใบแตกต่างกัน (วิชา, 2546) ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ทั้ง 18 ไพรเมอร์ ไม่พบความแตกต่างระหว่าง 2 พันธุ์ นี้ (2) พันธุ์สำเภากวกับพันธุ์สาแทรกทอง ทั้ง 2 พันธุ์ มีลักษณะของผลที่แตกต่างกัน โดยพันธุ์สำเภากวมีลักษณะของผลเป็นรูปหัวใจ แต่พันธุ์สาแทรกทองมีลักษณะของผลเป็นรูปไข่กลับแกมขอบขนาน (วิชา, 2546) แต่ไม่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ และ (3) พันธุ์ฮงฮวยกับพันธุ์สำเภากว โดยทั้ง 2 พันธุ์ มีลักษณะต่างกันอย่างสิ้นเชิงของเปลือกลำต้น ลักษณะของกิ่ง และลักษณะการแตกกิ่ง (วิชา, 2546) ในงานวิจัยนี้พบว่ายังไม่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของทั้ง 2 พันธุ์

รายงานของ Tongpamnak และคณะ (2002) สามารถแยกพันธุ์สาแทรกทองกับพันธุ์สำเภากวออกจากกันโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพีและอาร์เอพีดี จากรายงานของ Wangspa และคณะ (2005) พบว่าสามารถแยกพันธุ์โอวเฮียะกับพันธุ์กวางเจาออกจากกันโดยใช้

เครื่องหมายโมเลกุลแอสตาร์ทเอพีดี และจากรายงานของ วิชา (2546) ที่ทำฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์ของลินี่ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าลินี่พันธุ์ฮงฮวยกับพันธุ์สำเภากวมีความแตกต่างกันที่ลักษณะของกิ่ง (branch) โดยที่พันธุ์ฮงฮวยมีกิ่งลักษณะค่อนข้างแบนและบิด (almost flatten and twist) ส่วนพันธุ์สำเภากวมีกิ่งลักษณะกลม (round) แต่ทั้งนี้ขึ้นกับสภาพแวดล้อมลักษณะอาจเปลี่ยนแปลงไปได้ ดังนั้นหากต้องการจำแนกลินี่ทั้ง 3 คู่ นี้ควรเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ให้มากขึ้น หรือใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น และอาจใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมด้วย

ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างลินี่ทั้ง 23 พันธุ์ อยู่ในช่วง 0.529-1.000 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.764 ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Bajpai และคณะ (2016) ที่ศึกษาลินี่ในประเทศอินเดียโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี เอสเอสอาร์ และไอเอสเอสอาร์ พบว่าลินี่ในประเทศอินเดียมีฐานพันธุกรรมแคบซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์อยู่ในช่วง 0.63-0.90 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.765 ทำให้ทราบว่าฐานพันธุกรรมลินี่ในแปลงรวบรวมพันธุ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้นั้น มีฐานพันธุกรรมแคบเช่นเดียวกับรายงานของ Bajpai และคณะ (2016)

3.2 ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF*

การวิจัยนี้พบความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* เพียง 1 และ 3 ตำแหน่ง ตามลำดับ ใกล้เคียงกับรายงานของ ปิยดา และคณะ (2558) ที่จำแนกมะม่วง 18 พันธุ์ ในประเทศไทยด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* พบตำแหน่งที่มีความผันแปรเพียง 5 ตำแหน่ง และยังไม่สามารถจำแนกพันธุ์มะม่วงออกจากกันทั้งหมด ซึ่งต่างจากรายงานของ สุรเชษฐ และคณะ

(2558) ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วง 5 พันธุ์ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ความยาว 654 คู่เบส พบตำแหน่งที่มีความผันแปร 62 ตำแหน่ง และสามารถจำแนกพันธุ์มะม่วงทั้งหมดออกจากกัน สำหรับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ในการทดลองนี้พบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์น้อย ต่างจากรายงานของ Baraket และคณะ (2009) ที่ศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ในพืช Tunisain fig (*Ficus carica* L.) ขนาด 430-464 คู่เบส พบบริเวณที่มีความผันแปร 34 ตำแหน่ง สามารถจำแนก Tunisain fig จำนวน 20 พันธุ์ ออกจากกันเป็น 15 แฮพโลไทป์ (haplotype)

ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ในการจำแนกพืชในระดับพันธุ์ที่อยู่ในชนิด (species) เดียวกันยังไม่มีประสิทธิภาพพอ สอดคล้องกับ นฤมล และคณะ (2557) ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสี 10 พันธุ์ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* พบว่าแบ่งข้าวมีสีเป็น 2 กลุ่ม แต่ไม่สามารถแยกข้าวภายในกลุ่มเดียวกันออกจากกัน โดยทั่วไปการใช้ยีนในคลอโรพลาสต์เหมาะกับการจำแนกพืชต่างชนิดแต่อยู่ในสกุลเดียวกันมากกว่าการจำแนกระดับพันธุ์ ซึ่งเห็นได้จากรายงานของ สุพัตตรา และคณะ (2556) และ Lithanatudom และคณะ (2017) ที่สามารถจำแนกพืชในสกุล *Barleria* และ *Democapus* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnL-trnF* และการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *trnL-I* และ *trnL-trnF* ร่วมกัน

5. สรุป

การจำแนกลิ้นจี่ 23 พันธุ์ โดยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ จำนวน 20 ไพรเมอร์ มี 18 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน จำนวน 91

แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 79 แถบ คิดเป็น 86.81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถจำแนกลิ้นจี่ออกเป็น 3 กลุ่ม พันธุ์ภาคกลาง พันธุ์ภาคเหนือและภาคกลาง และพันธุ์ภาคเหนือ แต่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ลิ้นจี่ 3 คู่ คือ พันธุ์สำเภาแก้ว กับพันธุ์สาแหรกทอง พันธุ์ฮงฮวยกับพันธุ์สำเภาทอง พันธุ์กวางแจกกับพันธุ์โอวเฮียะ ถือได้ว่าลิ้นจี่แต่ละคู่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงมาก หรืออาจเป็นพันธุ์เดียวกัน และจากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างลิ้นจี่ทั้ง 23 พันธุ์ ในงานวิจัยนี้อยู่ในช่วง 0.529-1.000 ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลิ้นจี่ในแปลงรวบรวมพันธุกรรมนี้มีความหลากหลายน้อย การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *trnL-trnF* ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลิ้นจี่ทั้ง 23 พันธุ์ สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ความยาว 506 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ความยาว 378 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rbcL* มีความผันแปรเพียง 1 ตำแหน่ง ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน *trnL-trnF* มีความผันแปร 3 ตำแหน่ง ค่าความต่างทางพันธุกรรมระหว่างลิ้นจี่ 23 พันธุ์ อยู่ในช่วง 0.0000-0.0035 โดยที่พันธุ์จินแดงมีค่าความต่างจากพันธุ์อื่น ๆ 0.0035 เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าสามารถแยกพันธุ์ลิ้นจี่ออกจากลำไย และแยกพันธุ์จินแดงออกจากลิ้นจี่พันธุ์อื่น ๆ แต่ไม่สามารถแยกลิ้นจี่อีก 22 พันธุ์ ออกจากกัน ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ตำแหน่ง นี้ ยังไม่เพียงพอต่อการจำแนกพันธุ์ลิ้นจี่ จึงควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่นร่วมด้วย

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนการวิจัย ประจำปี

งบประมาณ 2560 และขอขอบคุณทุนศิษย์ก้นกุฏิ ประจำปี พ.ศ. 2559 ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

7. รายการอ้างอิง

ชินวัฒน์ ยัพวัฒนพันธุ์, 2541, จำแนกลิ้นจี่โดยวิธี สันฐานวิทยาอิเล็กทรอนิกส์และเซลล์พันธุศาสตร์, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 109 น.

ธีระชัย ธนानันต์, 2553, พันธุศาสตร์โมเลกุล, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี, 148 น.

นฤมล ธนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *rpoC1*, Thai J. Sci. Technol. 5: 674-862.

ปิยดา บุสดี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การจำแนกมะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *rbcL*, Thai J. Sci. Technol. 6: 983-993.

ปรีชา ประเทพ, 2543, พันธุศาสตร์ยุคใหม่ : เทคโนโลยีดีเอ็นเอเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรม, อภิชาติการพิมพ์, มหาสารคาม, 105 น.

วิชา ธิติประเสริฐ, 2546, ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์พืช : ลิ้นจี่, สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ, 220 น.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, วิภารัตน์ ศิริพงษ์, ชัยวัฒน์ ฤทธิ์เดชากุล, ดวงทิพย์ อภิรัตน์มนตรี และวินัย สมประสงค์, 2556, ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุล *Barleria* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnL-trnF*, Thai J. Genet. S(1): 222-225.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง, เบญจพร ศรีสุวรรณ และกาญจน์ คุ่มทรัพย์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในมะม่วงบางสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL*, น. 2803-2807, ใน การนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ เครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 17, มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม, พิษณุโลก.

Aradhya, M.K., Zee, F.T. and Manshardt, R.M., 1995, Isozyme variation in litchee (*Litchi chinensis* Sonn.), Sci. Hort. 36: 21-35.

Amundsen, K. and Warnke, S., 2012, Agrostis species relationships based on *trnL-trnF* and *atpI-atpH* intergenic spacer regions, HortScience 47: 18-24.

Anuntalabhochai, R., Chundet, R., Chiangda, J. and Apavatjirut, P., 2002, Genetic diversity within lychee based on RAPD analysis, Acta Hort. 575: 253-259.

Bajpai, A., Muthukumar, M., Singh, A., Nath, V. and Ravishankar, H., 2016, Narrow genetic base of Indian litchi (*Litchi chinensis*) cultivars based on molecular markers, Ind. J. Agric. Sci. 86: 448-455.

Baraket, G., Olfa, S., Khaled, C., Messaoud, M., Mohamed, M., Mokhtar, T. and Amel, S.H., 2009, Chloroplast DNA analysis in Tunisian fig cultivars (*Ficus carica* L.): Sequence variations of the *trnL-trnF* intergenic spacer, Biochem. Syst. Ecol. 36: 828-835.

Chundet, R., Cutler, R.W., Tasanon, M. and Anuntalabhochai, S., 2007, Hybrid detection in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars using HAT-RAPD markers,

- ScienceAsia 33: 307-311.
- Cutler, R.W., Chundet, R., Handa, T. and Anuntalabhochai, S., 2006, Development of sequence characterized DNA markers linked to a temperature dependence for flower induction in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars, *Sci. Hort.* 107: 264-270.
- Degani, C., Beiles, A., El-Batsri, R., Goren, M. and Gazit, S., 1995, Identifying lychee cultivars by isozyme analysis, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 307-312.
- Degani, C., Deng, J., Beiles, A., El-Batsri, R., Goren, M. and Gazit, S., 2003. Identifying lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars and their genetic relationships using inter simple sequence repeat (ISSR) markers, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 838-845.
- 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.
- Fan, Q., Chen, S., Zhou, R., Xiang, X., Liao, W. and Shi, S., 2011, Genetic variation of wild litchi (*Litchi chinensis* Sonn. subsp. *chinensis*) revealed by microsatellites, *Conserv. Genet.* 12: 753-760.
- Felsenstein, J., 1985, Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, *Evolution* 39: 783-791.
- GanJun, Y., Heqiang, H., Dacheng, C., Ziran, H., Changhd, C. and Yanping, Q., 2003, Studies on genetic relationship among litchi varieties by using AFLP, *Acta Hort. Sinica* 30: 399-403.
- Gielly, L. and Taberlet, P., 1994, The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: Non coding versus *rbcl* sequences, *Mol. Biol. Evol.* 11: 769-777.
- Groff, G.W., 1921, *The Lychee and Longan*, Orange Judd, New York, 188 p.
- Hapl, V., Pavlíček, A. and Flegr, J., 2001, Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 731-735.
- Hsu, C.P., Lin, C.C., Huang, C.C., Lin, Y.H., Chou, J.C., Tsia, Y.T. and Chung, Y.C., 2012, Induction of apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal carcinoma by litchi seed extract, *BioMed Res. Int.* 2012(341497): 1-7.
- Huang, F., Zhang, R., Yi, Y., Tang, X., Zhang, M., Su, D. and Wei, Z., 2014, Comparison of physicochemical properties and immune modulatory activity of polysaccharides from fresh and dried litchi pulp, *Molecules* 19: 3909-3925.
- Kress, W.J. 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(6): e508.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K., 2018, MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.
- Levin, R.A., Wagner, W.L., Hoch, P.C., Nepokroeff, M., Pires, J.C., Zimmer, E.A. and Sytsma, K. J., 2003, Family-level

- relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcl* and *ndhF* data, Amer. J. Bot. 90: 107-15.
- Lithanatudom, S.K., Chaowasku, T., Nantarat, N., Jaroenkit, T., Smith, D.R. and Lithanatudom, P., 2017, A first phylogeny of the genus *Dimocarpus* and suggestions for revision of some taxa based on molecular and morphological evidence, Sci. Rep. 7(6716): 1-11.
- Liu, W., Xiao, Z., Bao, X., Yang, X., Fang, J. and Xiang, X., 2015, Identifying litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars and their genetic relationships using single nucleotide polymorphism (SNP) markers, PLoS ONE 10(8): e0135390.
- Long, Y., Cheng, J., Mei, Z., Zhao, L., Wei, C., Fu, S. and Fu, J., 2015, Genetic analysis of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) in southern China by improved random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR), Mol. Biol. Rep. 42: 159-166.
- Manoj, K., Meetu, G., Divya, S., Manoj, P., Prasad, U.S. and Sarin, N.B., 2010, Genetic relatedness among Indian litchi accessions (*Litchi chinensis* Sonn.) by RAPD markers, Int. J. Agric. Res. 5: 805-815.
- Madhou, M., Bahorun, T. and Hormaza, J.I., 2010, Phenotypic and molecular diversity of litchi cultivars in Mauritius, Fruits 65(3): 141-152.
- Madhou, M., Normand, F., Bahorun, T. and Hormaza, J.I., 2013, Fingerprinting and analysis of genetic diversity of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) accessions from different germplasm collections using microsatellite markers, Tree Genet. Genomes 9: 387-396.
- Mingfang, L.I., Xueqing, Z., Yongqiang, Z., Xiangshe, W., Suyu, L., Lei, L.I. and Xingrong, W.U., 2006, Development and characterization of SSR markers in lychee (*Litchi chinensis*), Mol. Ecol. Notes 6: 1205-1207.
- Nei, M. and Li, W.H., 1979, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76: 5269-5273.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr. and Deerfield, D.W., 1997, GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation, Eur. Mol. Biol. Network News 4: 1-4.
- Page, R.D.M., 1996, TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers, Comput. Appl. Biosci. 12: 357-358.
- Sneath, P.H. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification, Freeman, San Francisco. 573 p.
- Subhadrabandhu S., 1990, Lychee and Longan Cultivation in Thailand, Rumthai Publication, Bangkok, 40 p.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J., 1991, Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA, Plant Mol. Biol. 17: 1105-1109.
- Tamura, K., 1992, Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-

- content biases, *Mol. Biol. Evol.* 9: 678-687.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G., 1997, The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucl. Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Tongpamnak, P., Patanatarata, A., Srinives, P. and Babprasert, C., 2002, Determination of genetic diversity and relationships among Thai litchi accessions by RAPD and AFLP markers, *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 36: 370-380.
- Viruel, M.A. and Hormaza, J.I., 2004, Development, characterization and variability analysis of microsatellites in lychee (*Litchi chinensis* Sonn., Sapindaceae), *Theor. Appl. Genet.* 108: 896-902.
- Wangspa, R., Cutler, R. W., Sitthiprom, S., Chundet, R., Dumampai, N. and Anuntalabhochai, S., 2005, DNA fingerprint database of some economically important Thai Plants: *Litchi chinensis* Sonn. *Dimocarpus longan* Lour. and *Peuraria* spp., *ScienceAsia* 31: 145-149.
- Wu, J., Zhang, C., Chen, J., Cai, C., Wang, L., Fu, D. and Ou, L., 2016, Morphological diversity within litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) based on leaf and branch traits, *Sci. Hort.* 207: 21-27.
- Wang, X., Yuan, S., Wang, J., Lin, P., Liu, G., Lu, Y. and Wei, Y., 2006, Anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against human breast cancer *in vitro* and *in vivo*, *Toxicol. Appl. Pharm.* 215: 168-178.
- Yang, B., Wang, J., Zhao, M., Liu, Y., Wang, W. and Jiang, Y., 2006, Identification of polysaccharides from pericarp tissues of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit in relation to their antioxidant activities, *Carbohydr. Res.* 341: 634-638.