การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 ในมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์[1*], สุวลักษณ์ อะมะวัลย์[2] , กาญจนา พฤษพันธ์[3] , ประพิศ วองเทียม[2] และยิ่งยศ พาลุกา[1]

[1]ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร, ขอนแก่น
[2]ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร, ระยอง
[3]สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร
*ผู้รับผิดชอบบทความ: email theerawut6949@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดของมันสำปะหลังจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 พันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ศึกษาจำนวน 17 พันธุ์ มีข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ถูกต้องตรงตามพันธุ์ ตัวอย่างเหล่านี้ถูกเก็บรักษาพรรณไม้แห้งไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์ถูกนำมาใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์สากลที่จำเพาะบริเวณของยีน *ITS*2 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ได้ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอจากทุกตัวอย่างมีขนาด 317 คู่เบส มีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) บนฐานข้อมูลสากล GenBank 99.05-100 เปอร์เซ็นต์ มีตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์จำนวน 5 ตำแหน่ง ซึ่งแสดงถึงความเป็นเอกลักษณ์ของพันธุ์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ตรวจสอบความถูกต้องแล้วจะถูกเก็บไว้ที่ฐานข้อมูลสากล GenBank เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ยางพาราเป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม พบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม และแยกพันธุ์ห้านาที ระยอง 3 และระยอง 72 ออกจากพันธุ์อื่น ๆ ได้ การนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากมันสำปะหลังที่เก็บมาจากแหล่งปลูกต่างๆ จำนวน 50 ตัวอย่าง ที่มีลักษณะประจำพันธุ์ตรงกับพันธุ์ระยอง 72 และ เกษตรศาสตร์ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากล GenBank พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50 ที่เก็บไว้ในฐานข้อมูล แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* เป็นบริเวณที่มีความเหมาะสมในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดชนิดหนึ่งของมันสำปะหลังได้ สามารถนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อเป็นเครื่องมือจำแนกระดับพันธุ์ของมันสำปะหลัง แต่ควรใช้ร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดอื่น ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนก และนำเอาไปใช้ประโยชน์ในงานวิจัยโดยเฉพาะด้านงานการอนุรักษ์พันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์

คำสำคัญ: มันสำปะหลัง ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Nucleotide Sequence Analysis of *ITS*2 Gene in Cassava for DNA barcode

Theerawut Wongwarat[1*], Suwaluk Amawan[2], Kanchana Pruesapan[3], Prapit Wongtiem[2] and Yingyot Palukar[2]

[1]Khon kaen Field Crops Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Department of Agriculture, Khon kaen

[2]Rayong Field Crops Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Department of Agriculture, Rayong

[3]Plant Varieties Protection Office, Department of Agriculture, Bangkok

*corresponding author: theerawut6949@gmail.com

Abstract

This research aimed to study of construct DNA barcode based on nucleotide sequence of *ITS*2 gene. In this study, 17 cassava cultivars were recorded the characteristics that their decided the correct naming of each cultivar. These cultivars were made herbarium specimen and remained in Bangkok Herbarium (BK), Department of Agriculture. DNA extracts from each cultivar used as a template for amplified and universal primer, matching ITS2 region using polymerase chain reaction technique. The sequences length of DNA fragment were 317 base pairs in all samples. Sequencing analysis was compared with GenBank. The nucleotide sequences showed a value of 99.05 to 100 percent similarity of gene among *M. esculenta* Crantz. The *ITS2* sequences found the variation among cassava cultivars contain unique signatures at 5 nucleotide positions. All sequences were validated and deposited in GenBank. When analysis the phylogenetic tree using rubber as an outgroup, results presented that could effective divided of 3 groups and distinguished Hanatee, Rayong 3 and Rayong 72 from cassava cultivars. 50 samples from several crops have accurate characteristics as Rayong 72 and Kasetsart 50. All samples were collected and were successfully DNA extracted and nucleotides sequenced. The *ITS*2 nucleotide sequences were determined alignment search tool of GenBank. The result found that nucleotide sequence data were highly similar (100 percent) to deposit nucleotide sequences of Rayong 72 and Kasetsart 50 into GenBank. Results suggested that *ITS2* sequences facilitates independent assessment one of DNA barcode as an effective tool for cassava cultivar identification. However, a combination with other DNA barcode could increase effective identification. This research information can be applied to research, especially plant genetic conservation and breeding.

Keywords: cassava, nucleotide sequences, DNA barcode

1. บทนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* CrantZ) เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตทั้งอาหารมนุษย์ อาหารสัตว์ สิ่งอุปโภค เครื่องมือทางการแพทย์ และพลังงานทดแทน ซึ่งมีตลาดอุตสาหกรรมรองรับผลผลิตทางการเกษตร ผลผลิตมันสำปะหลังปี พ.ศ. 2563 คาดว่ามีพื้นที่เก็บเกี่ยว 8.75 ล้านไร่ ผลผลิต 31.104 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 3.56 ตัน เมื่อเทียบปี พ.ศ. 2562 พื้นที่เก็บเกี่ยวและผลผลิต เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.93 และร้อยละ 0.08 ตามลำดับ แต่ผลผลิตต่อไร่ลดลงร้อยละ 0.84 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) เนื่องจากราคาหัวมันสำปะหลังสดมีแนวโน้มสูงขึ้นจึงมีแรงจูงใจที่สำคัญทำให้มีพื้นที่การผลิตมันสำปะหลังเพิ่มขึ้น การผลิตมันสำปะหลังเพื่อให้ได้ผลผลิตต่อไร่สูงนั้นเกษตรกรจำเป็นต้องใช้พันธุ์ที่เหมาะกับพื้นที่ และท่อนพันธุ์มีคุณภาพที่ดี การจำแนกพันธุ์มันสำปะหลังโดยใช้คุณลักษณะประจำพันธุ์ 50 ลักษณะ (Fukuda et al., 1998) มีคุณลักษณะเด่นที่นำมาใช้ 10 ลักษณะ แบ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์หลังการเพาะปลูกที่อายุ 4 เดือน 6 ลักษณะ และก่อนเก็บเกี่ยวที่อายุ 11 เดือน 4 ลักษณะ เห็นได้ว่าต้องใช้ระยะเวลานาน และต้องอาศัยความเชี่ยวชาญเฉพาะทางในการพิสูจน์พันธุ์ นอกจากนี้ยังอาจเกิดความเคลื่อนคลาดจากความไม่สม่ำเสมอของตัวอย่างเนื่องจากสภาพแวดล้อม วิธีเครื่องหมายโมเลกุลได้รับความนิยมเนื่องจากมีความแม่นยำและไม่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ซึ่งปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์ร่วมกับนักอนุกรมวิธานพืชได้นำเสนอการทำดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับช่วยเร่งการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐานนั้นได้มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านหลักเกณฑ์ 3 ประการ (CBOL Plant Working Group, 2009) ได้แก่ 1) ความเป็นสากล (universality) 2) คุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence quality) และ 3) ประสิทธิภาพในการแยกพืชแต่ละชนิดออกจากกัน (species discrimination) การเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 จัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดของมันสำปะหลังจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 ตัวอย่างมันสำปะหลัง ที่ใช้ในงานวิจัยนี้แบ่งเป็น

- พันธุ์มันสำปะหลังที่ได้การรับรองพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร ได้แก่ พันธุ์ระยอง 1 ระยอง 2 ระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 7 ระยอง 9 ระยอง 11 ระยอง 86-13 ระยอง 60 ระยอง 72 และระยอง 90
- พันธุ์มันสำปะหลังที่เป็นพันธุ์จากความร่วมมือกันระหว่างกรมวิชาการเกษตรและสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ได้แก่ พันธุ์พิรุณ 1 และ พิรุณ 2
- พันธุ์มันสำปะหลังที่ได้รับการปรับปรังพันธุ์จากแหล่งอื่น ๆ ได้แก่ พันธุ์พิรห้วยบง 60 ห้วยบง 80 และเกษตรศาสตร์ 50
- พันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ พันธุ์ห้านาที
- ตัวอย่างนอกกลุ่มที่ศึกษา (outgroup) ใช้ยางพารา (*Hevea brasiliensis* (Kunth) Muell. Arg.)

3.2 การเก็บข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์และจัดทำพรรณไม้แห้ง

บันทึกลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ แบ่งเป็นหลังการเพาะปลูกที่อายุ 4 เดือน 5 ลักษณะ ได้แก่ 1) สียอดอ่อน 2) สีของใบอ่อน 3) ขนที่ยอดอ่อน 4) สีก้านใบ 5) รูปร่างของแฉกที่อยู่กลางใบ ก่อนเก็บเกี่ยวที่อายุ 11 เดือน 4 ลักษณะ ได้แก่ 6) สีของลำต้น 7) การมีขั้วของหัว 8) สีผิวเปลือกชั้นนอกของหัว 9) สีเนื้อของหัว ซึ่งดำเนินการปฏิบัติตามคู่มือการบันทึกข้อมูลของกรมส่งเสริมการเกษตร (2559) จัดทำการเก็บรักษาหลักฐานอ้างอิง

งานวิจัยของมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์ ในรูปตัวอย่างพรรณไม้แห้งไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร (Bangkok Herbarium, BK)

3.3 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำใบมันสำปะหลังมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผงแล้วใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA extraction GF-1, vivantis) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้การวัดค่าการดูดกลืนแสง นำสารสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างทั้งหมดมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 ng/ul จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR บริเวณยีน *ITS*2 ด้วยไพรเมอร์ ITS3 (5´-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3') / ITS4 (5´-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White et al., 1990) ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis หลังจากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Illumina Hiseq (illumine) ด้วย เทคนิค BT-Sequencing (Barcode taq sequencing base on Next generation sequencing ตามกรรมวิธีของบริษัท Celemics ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม ClustalW2 ด้วยวิธี Multiple alignment ให้ถูกต้องตรงกันทุกตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบให้เห็นความผันแปรทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอ นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 (Molecular Evolution Genetics Analysis) ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 ซ้ำ

3.5 การทดสอบระบุพันธุ์มันสำปะหลัง

การเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังในแหล่งปลูกที่ต่าง ๆ จำนวน 50 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณมาตรฐาน *ITS*2 เก็บบันทึกข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ แล้วนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานบนฐานข้อมูลสากล GenBank เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด

4. ผลการวิจัย

4.1 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง

จากการบันทึกลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังจากตัวอย่างต้นที่เก็บมาสกัดดีเอ็นเอ พบว่า 1) สียอดอ่อน สามารถแบ่งออกได้เป็น 7 สี ดังนี้ สีเขียวอ่อน สีเขียว สีม่วงอมเขียว สีม่วงอมน้ำตาล สีม่วง สีเขียวอมม่วง และสีน้ำตาลอมเขียว 2) สีของใบอ่อน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 สี ดังนี้ สีเขียวอ่อน สีเขียวอมม่วง และสีม่วง 3) ขนที่ยอดอ่อน สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ ดังนี้ มีขน และไม่มีขน 4) สีก้านใบ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 สี ดังนี้ สีเขียวอ่อน สีเขียวอมชมพู สีเขียวอมแดง และสีแดงเข้ม 5) รูปร่างของแฉกที่อยู่กลางใบ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 รูปแบบ ดังนี้ ใบหอกปลายมน ใบแหลมแบบใบหอก ใบหอก และใบหอกกลับ 6) สีของลำต้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 สี ดังนี้ สีเขียวเงิน สีเขียวอมน้ำตาล สีน้ำตาลอมเหลือง สีน้ำตาลอมส้ม และสีน้ำตาลอ่อน 7) การมีขั้วของหัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ ดังนี้ มีขั้วของหัว และไม่มีขั้วของหัว 8) สีผิวเปลือกชั้นนอกของหัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 สี ดังนี้ สีน้ำตาลอ่อน สีขาวครีม สีน้ำตาล และสีน้ำตาลเข้ม 9) สีเนื้อของหัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 สี ดังนี้ สีขาว สีขาวครีม และสีเหลืองอ่อน ข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์ถูกต้องตรงตามลักษณะประจำพันธุ์ตามเกณฑ์การจำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2559). ตัวอย่างเหล่านี้ได้ถูกดำเนินการเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้งเพื่อใช้เป็นพันธุ์ไม้อ้างอิงงานวิจัยไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร ซึ่งมีหมายเลขอ้างอิง (voucher specimen) ดังตารางที่ 1

4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง 17 พันธุ์ และยางพารา ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ ITS3/4 ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน *ITS*2 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะได้ทั้งหมด (ผลสำเร็จ 100 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่าบริเวณของดีเอ็นเอดังเหล่านี้ทำได้ง่ายมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูง มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 317 คู่เบส เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของด้วยโปรแกรม Blastn ในฐานข้อมูลสากล พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 ในทุกพันธุ์มีความเหมือนกันกับมันสำปะหลัง (*M. esculenta* Crantz) 99.05-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งข้อมูลนี้ยืนยันได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความถูกต้องและมีความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูลสากล GenBank และได้รับหมายเลขเฉพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หมายเลขอ้างอิงพรรณไม้แห้ง และหมายเลขเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 ของมันสำปะหลัง 17 พันธุ์.

พันธุ์มันสำปะหลัง	หมายเลขอ้างอิง	หมายเลขเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2
ระยอง 1	01-001	MK809337
ระยอง 2	01-002	MK809338
ระยอง 3	01-003	MK809339
ระยอง 5	01-004	MK809340
ระยอง 7	01-005	MK809341
ระยอง 9	01-006	MK809342
ระยอง 11	01-007	MK809343
ระยอง 86-13	01-008	MK809344
ระยอง 60	01-009	MK809345
ระยอง 72	01-010	MK809346
ระยอง 90	01-011	MK809347
เกษตรศาสตร์ 50	01-012	MK809348
ห้วยบง 60	01-013	MK809349
ห้วยบง 80	01-014	MK809350
พิรุณ 1	01-015	MK809351
พิรุณ 2	01-016	MK809352
ห้านาที	01-017	MK809353

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์จำนวน 5 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่ผันแปรรูปแบบไพริมิดินทรานสิชัน ทรานสเวอร์ชัน พิวรินทรานสิชัน จำนวน 2 ตำแหน่ง (ตำแหน่ง T97C และ T290C), 1 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ A120C) และ 2 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ A148G และ A249G) ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าตำแหน่งที่ T290C สามารถแบ่งพันธุ์มันสำปะหลังออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ตำแหน่งที่ 290 เป็น T ได้แก่ ระยอง 2 ระยอง 3 ระยอง 7 ระยอง 60 ระยอง 90 เกษตรศาสาตร์ 50 ห้วยบง 60 และพิรุณ 2 ในขณะที่ตำแหน่งที่ T97C แสดงเอกลักษณ์

จำเพาะพันธุ์ระยอง 72 ตำแหน่งที่ A120C แสดงเอกลักษณ์จำเพาะพันธุ์ห้านาที ตำแหน่ง A148G และ A249G แสดงเอกลักษณ์จำเพาะพันธุ์ระยอง 3

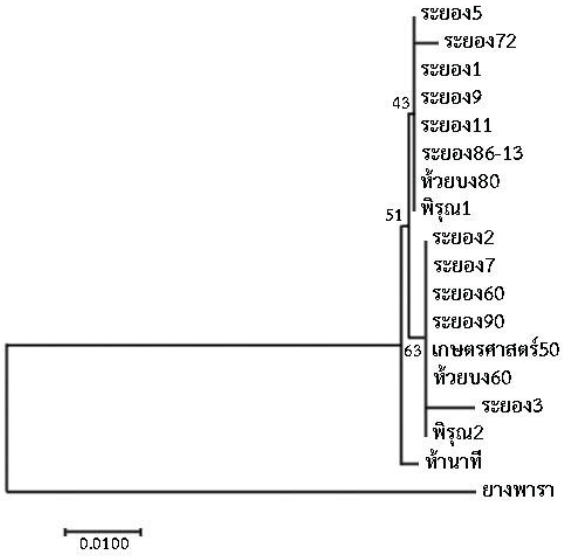
ตารางที่ 2 รูปแบบความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2*

รูปแบบความผันแปรทางพันธุกรรม	**พันธุ์มันสำปะหลัง**
pyrimidine transitions (T97C)	ระยอง 72
	พันธุ์อื่น ๆ
transversions (A120C)	ห้านาที
	พันธุ์อื่น ๆ
purine transitions (A148G)	ระยอง 3
	พันธุ์อื่น ๆ
purine transitions (A249G)	ระยอง 3
	พันธุ์อื่น ๆ
pyrimidine transitions (T290C)	ระยอง 2, ระยอง 3, ระอง 7, ระยอง 60, ระยอง 90, เกษตรศาสาตร์ 50, ห้วยบง 60, พิรุณ 2
	พิรุณ 1, ระยอง 5, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 86-13, ระยอง 72, ห้วยบง 80, พิรุณ 1, ห้านาที

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* ของมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์ และใช้ยางพาราเป็นตัวอย่างนอกกลุ่มมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 ซ้ำ พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 1) ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มันสำปะหลังพันธุ์ห้านาทีซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองที่นิยมปลูกเพื่อรับประทานถูกแยกออกจากพันธุ์มันสำปะหลังอื่น ๆ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ระยอง 1 ระยอง 5 ระยอง 9 ระยอง 86-13 ห้วยบง 80 พิรุณ 1 และระยอง 72 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ระยอง 2 ระยอง 7 ระยอง 60 ระยอง 90 เกษตรศาสตร์ 50 ห้วยบง 60 พิรุณ 2 เมื่อพิจารณาภายในกลุ่มจะเห็นได้ว่าพันธุ์ระยอง 3 และ ระยอง 72Neighbor-joining โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 ซ้ำ

4.3 การทดสอบระบุพันธุ์มันสำปะหลัง

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่อายุประมาณ 4-5 เดือน จากแหล่งปลูกในพื้นที่อำเภอน้ำพอง และอำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 50 ตัวอย่าง ตั้งชื่อว่า unknown 01-50 จากการบันทึกลักษณะประจำพันธุ์ พบว่าลักษณะปรากฏที่บันทึกข้อมูลได้มีความคล้ายคลึงกันมาก ยกเว้นสีก้านใบ unknown 01-40 ก้านใบมีสีแดงเข้ม ส่วน unknown 41-50 ก้านใบมีสีแดง ซึ่งตรงกับลักษณะประจำพันธุ์ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50 เก็บใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอและใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS3/4 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะมีผลสำเร็จสูง 100 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลสากล GenBank พบว่าตัวอย่าง unknown 01-40 มีความเหมือนกันกับ *M. esculenta* Crantz ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ตรงกับข้อมูลดีเอ็นเอหมายเลขเฉพาะ (GenBank accession number) MK809346 ซึ่งเป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และ unknown 41-50 มีความเหมือนกันกับ *M. esculenta* Crantz ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งข้อมูลตรงกับข้อมูลดีเอ็นเอหมายเลขเฉพาะ (GenBank accession number) MK809348 ซึ่งเป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50



ภาพที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจำนวน 16 พันธุ์และยางพาราเป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 วิเคราะห์โดยโปรแกรม MEGA ด้วยวิธี neighbor-joining

5. สรุปผลการวิจัย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะมีผลสำเร็จ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าบริเวณของดีเอ็นเอนี้ทำได้ง่ายมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูง มีความผันแปรทางพันธุกรรม 5 ตำแหน่ง รูปแบบไพริมิดินทรานสิชัน ทรานสเวอร์ชัน และพิวรินทรานสิชัน จำนวน 2 1 และ 2 ตำแหน่ง ตามลำดับ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ามันสำปะหลังถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม สามารถแยกพันธุ์ห้านาที ระยอง 3 ระยอง 72 ออกจากกลุ่มได้ และสามารถแยกยางพาราที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่มได้ แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 มีประสิทธิภาพในการแยกมันสำปะหลังระดับพันธุ์ได้ การทดสอบการระบุพันธุ์มันสำปะหลัง พบว่าตัวอย่างที่เก็บมา (unknown) มีลักษณะประจำพันธุ์ที่ปรากฏและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 ตรงกันกับข้อมูลดีเอ็นเอมาตรฐานอ้างอิงบนฐานข้อมูล GenBank 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *ITS*2 จึงมีประสิทธิภาพสามารถใช้เป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดชนิดหนึ่งของมันสำปะหลังได้

6. อภิปรายผลการวิจัย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 มีคุณลักษณะสำคัญ 3 ประการ ได้แก่ 1) เป็นบริเวณดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ได้ง่าย มีผลสำเร็จสูง 100 เปอร์เซ็นต์ 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์มีคุณภาพ เมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลสากล GenBank พบว่ามีความเหมือนสูงถึง 99.05-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยืนยันได้ว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง และ 3) มีประสิทธิภาพในการแยกพันธุ์ มันสำปะหลังที่ใช้ในงานวิจัยนี้อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน จึงมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันสูงทำให้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ยาก แต่ผลของความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ามันสำปะหลังแยกได้เป็น 3 กลุ่ม และสามารถแยกพันธุ์ห้านาที ระยอง 3 ระยอง 72 ออกจากกลุ่มได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *ITS*2 พบมีความหลากหลายมากกว่าส่วนของยีนอื่น ๆ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการระบุความจำเพาะของสายพันธุ์บัวได้ (ณัฐชา แสงศรี และคณะ, 2562) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

*ITS*2 ในมะเขือมีความผันแปรทางพันธุกรรมมากกว่ายีน *mat*K และ *rbcL* และให้ผลสอดคล้องกับการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ *ITS*2 นั้นสามารถจัดจำแนกมะเขือได้ดีกว่ายีนอื่น ๆ (วิกานดา พรหมณี, 2560) ก่อนรายงานผลงานวิจัยนี้ได้มีรายงานการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรีย ด้วยไพรเมอร์ trn-Phe และ trn-F ในมันสำปะหลังจำนวน 18 พันธุ์ พบว่า ไม่สามารถแยกความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ได้ (ยุรนันท์ ทรวงทองหลาง และชูตา, 2560) ดังนั้นผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 มีความเหมาะสมในการเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดชนิดหนึ่งของมันสำปะหลังได้ชนิดหนึ่งของมันสำปะหลังได้

7. ข้อเสนอแนะ

การแยกพันธุ์พืชที่มีระดับชนิดหรือมีสปีชีส์เดียวกันโดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นทำได้ยาก เนื่องจากมีความผันแปรทางพันธุกรรมต่ำ ดังนั้นการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุและแยกพันธุ์มันสำปะหลังนั้นจำเป็นต้องใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 2 ยีนขึ้นไป จึงควรทำการศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่น ๆ ทั้งในคลอโรพลาสและนิวเคลียร์ไรโบโซมอลดีเอ็นเอเพิ่มเติม เพื่อหาตำแหน่งที่มีอัตราการผันแปรที่สามารถจำแนกระดับพันธุ์ได้มากขึ้นต่อไป

8. เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. (2559). **การจำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง**. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: ซันแพคเกจจิ้ง(2014).

ณัฐชา แสงศรี จตุพร กุลอึ้ง และวิภา หงส์ตระกูล. (2562). การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ไรโบโซมอลไอทีเอสในบัวประดับสกุล Nymphaea ของประเทศไทย. **วารสาร Thai Journal of Science and Technology**, 8 (3); 258-270.

ยุรนันท์ ทรวงทองหลาง และ ชูตา บุญภักดี. (2560). ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ไม่มีความแปรปรวน. **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา**, 22 (ฉบับพิเศษ), 433-438.

วิกานดา พรหมณี. (2560). **การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุลมะเขือ (*Solanum* L.) ในประเทศไทย**. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการทางเภสัชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2564). **ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร**. ค้นเมื่อ 12 พฤษภาคม 2564 จาก http://www.oae.go.th/view/1/รายละเอียดสถานการณ์ผลิตและการตลาด.

CBOL plant work group. (2009). A DNA barcode for land plants. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America, 106; 12794-12797.

Fukuda, W.M.G., Guevara, C.L., Kawuki, R. and Ferguson M.E. (1998). Selected morphological and agronomic descriptors for the characterization of cassava. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria.

Ritland, C. E., Ritland, K. and Straus. (1993). Variation in the ribosomal internal transcribed spacer (*ITS*1 and *ITS*2) among eight taxa of the Mimulus guttatus species complex. **Molecular biology and evolution** 10(6): 1273-1288.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols-A Guide to Methods and Applications. Innis, M.A., Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. and White, T.J. (Ed). **Academic Press** (315-322).