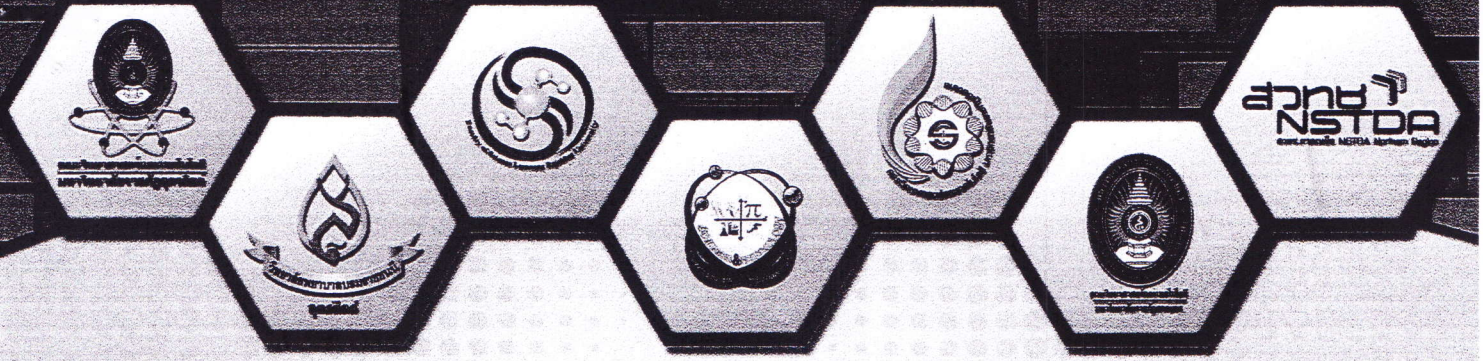




การประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงานวิจัย

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระดับชาติ ครั้งที่ 1

“วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีก้าวไกลสู่ประชาคมอาเซียน”

(Science and Technology towards ASEAN)

วันที่ 3 กรกฎาคม 2558 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์



จัดโดย

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

ร่วมกับ

วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนี อุดรดิตถ์

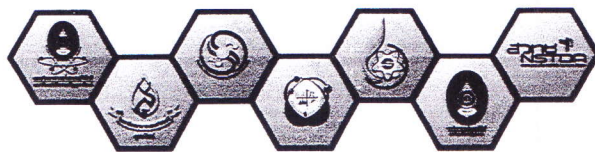
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

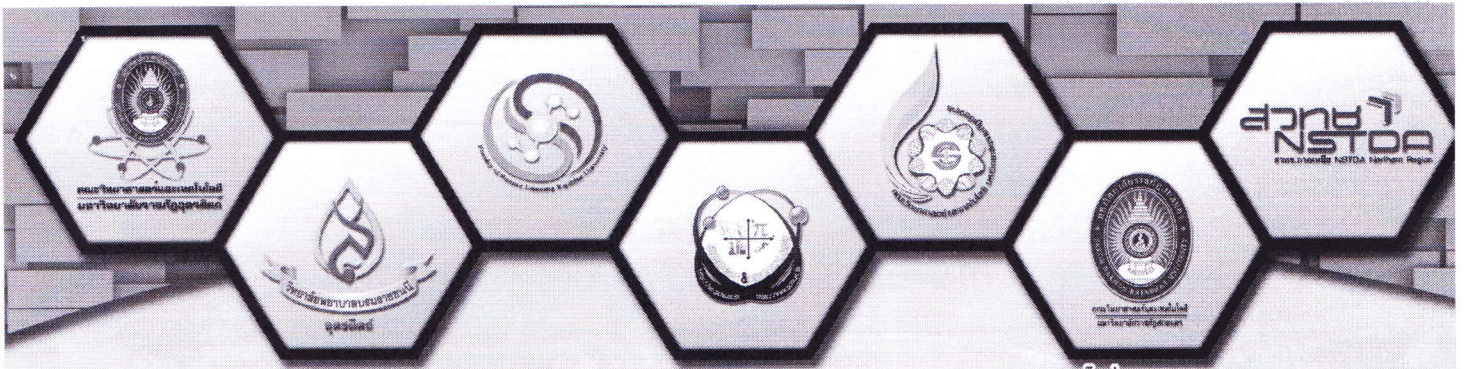
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏชัยภูมิ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ภาควิชา



เรื่อง	หน้า
54.การสำรวจชนิดของเห็ดเออคโตไมคอร์ไรซาในเขตป่าชุมชนนิคมสหกรณ์ปากท่า ตำบลปากท่า อำเภอฟากท่า จังหวัดอุตรดิตถ์ (รัชนิกร อ้อยแก้ว และ วันวิสาข์ แฝงฟัก)	53
55.การเปรียบเทียบ สมบัติด้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในชา จากปลายยอดผักหวานบ้านที่กระตุ้นด้วยรังสียูวีซี 5 นาที่ (ชญานัญญภัทร์ สิริชาติ และ รัชนี เพ็ชรช้าง)	54
56.การสกัดสารแคปไซซินอย่างหยาบจากพริกด้วยกระบวนการหมักเอทานอลจากเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (นริกันต์ เชียงกา และ กิตติ เมืองดุ่ม)	55
57.การผลิตอาหารปลาสวยงามจากสาหร่ายไคเพื่อการพัฒนาศีของปลา (อกนิษฐ์ รัตนน้ำหิน และ กิตติ เมืองดุ่ม)	56
58.ศึกษาสมบัติด้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ การใช้ประโยชน์ จากปลายยอดมะรุ้ม ด้วยรังสียูวีซี 5 นาที่ในการทำชา (กรกนก สุทธการ และ รัชนี เพ็ชรช้าง)	57
59.ความหลากหลายและการใช้ประโยชน์ของวงศ์ย่อยไผ่ในป่าวนเกษตร อำเภอลับแล จังหวัด อุตรดิตถ์ (นฤมล แสงชาติ และ พัทธชัย ปิ่นนาค)	58
60.ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดพืชสมุนไพรบางชนิด (นิตยา พลหาญ และ กชกร ลาภมาก)	59
61.การใช้สื่อมัลติมีเดียในการเพิ่มศักยภาพการเรียนการสอน เรื่อง การแพร่และกระบวนการ ออสโมซิสในสิ่งมีชีวิต (สุรเชษฐ เอี่ยมสำออง และ กาญจน์ คุ่มทรัพย์)	60
62.การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเห็ดกินได้บางชนิดต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (วิมานภรณ์ ศิริโชติกุล และ กชกร ลาภมาก)	61
63.ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเหง้าพืชสมุนไพรบางชนิด (สิรินยา ปาโจต และ กชกร ลาภมาก)	62
64.การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มะขาม 10 พันธุ์ ปลุกด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ และการใช้ยีน <i>rbcl</i> (นายสุรเชษฐ เอี่ยมสำออง และ เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ)	63
65.ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของน้ำหมักชีวภาพเพื่อใช้บริโภคในพื้นที่ อำเภอดรอน จังหวัดอุตรดิตถ์ (จันทิมา สาหล้า และสุทธิดา วิทณาลัย)	64



การประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงานวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระดับชาติ ครั้งที่ 1
 “วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีก้าวไกลสู่ประชาคมอาเซียน”

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มะขาม 10 พันธุ์ปลูกด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์และการใช้ยีน *rbcl*
 The nucleotide sequence analysis of 10 cultivars of tamarind Using by Microsatellite and *rbcl* gene.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง, รศ.ดร.เบญจพร ศรีสุวรรณ
 หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขาม 10 พันธุ์ปลูก ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ พบว่า สามารถจัดกลุ่มมะขามได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ และเปรี้ยวพื้นเมือง กลุ่มที่ 2 มะขามพันธุ์ปลูก สีทอง ชันดี น้ำผึ้ง และกลุ่มที่ 3 มะขามพันธุ์ปลูกประกายเพชร หมิ่นจง อินทลัม ศรีชมพู และประกายทอง และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน โดยใช้โปรแกรม BioEdit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method ได้ผลคือ มะขามถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยมีความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จากมะขามพันธุ์ปลูกสีทอง น้ำผึ้ง ชันดี ประกายเพชร อินทลัม หมิ่นจง ประกายทอง ศรีชมพู เปรี้ยวยักษ์ และเปรี้ยวพื้นเมือง ตามลำดับ เมื่อหาความสัมพันธ์ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl* ร่วมกัน พบว่า มะขามพันธุ์ปลูกบางส่วนที่มีลักษณะความสัมพันธ์ที่คล้ายกันในการวิเคราะห์ทั้งสองแบบ อย่างไรก็ตาม พบว่า มีการจัดลำดับความคล้ายคลึงกันระหว่างมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกที่ไม่ตรงกัน ซึ่งการทดลองดังกล่าวอาจเกิดข้อจำกัดบางประการเกี่ยวกับประสิทธิภาพของเครื่องมือทางโมเลกุลที่ใช้ เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีความแปรปรวนน้อยในวิธีหนึ่ง แต่กลับมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีความแปรปรวนมากในอีกวิธีหนึ่ง จึงทำให้ผลการทดลองอาจไม่สามารถให้คำตอบได้อย่างชัดเจน จึงต้องมีการทบทวนและวางแผนเพื่อค้นหาวិธีการในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อให้สอดคล้องกับการศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมให้มีความเหมาะสมและสามารถจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

บทนำ

การใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม ได้แก่ เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมของสิ่งมีชีวิต สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้โดยที่ให้มีอัตราการเกิดซ้ำขึ้นซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ในไลสosome หนึ่ง ประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง มีตั้งแต่ 1-6 เบส ในจีโนมของพืชเขตร้อนส่วนใหญ่ เช่น มะขาม ข้าวโพด จะพบลำดับเบสซ้ำ (GT)_n และ (AG)_n ในปริมาณมาก นอกจากนี้ ยังมียีนบางชนิดที่สามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ ได้แก่ ยีน *rbcl* เป็นยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมที่ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ RuBP กับ CO₂ ในวัฏจักรคัลวิน (Calvin's cycle) (Soltis & Soltis, 1998) ความยาวของยีน *rbcl* มีความแปรผันเล็กน้อยในพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปมีความยาวเฉลี่ย 1,400 คู่เบส (Ford et al., 2009) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อสร้าง DNA barcode จะใช้เพียงบางส่วนของยีนที่มีความยาวตั้งแต่ 500-700 คู่เบส จากลักษณะเฉพาะนี้ สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้

วัตถุประสงค์

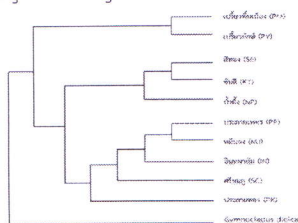
ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จากจีโนมของมะขามด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ และการหาลำดับของยีน *rbcl* จากมะขาม 10 พันธุ์ ในจังหวัดเพชรบูรณ์เพื่อหาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูก

ระเบียบวิธีวิจัย

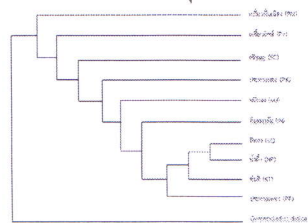
สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อมะขาม วัดปริมาณและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ ออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับไมโครแซทเทลไลท์ และยีน *rbcl* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลปฏิกิริยา PCR ด้วย Agarose gel วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) วิเคราะห์ผลด้วย Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method

ผลการทดลอง

จากผลการทดลอง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ และใช้โปรแกรม CLUSTAL X (1.83) ในการทำ multiple alignment และใช้โปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1 สามารถแบ่งมะขามออกเป็นกลุ่มดังนี้คือ



ภาพที่ 1 แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะขามที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์



ภาพที่ 2 แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะขามจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*

เอกสารอ้างอิง

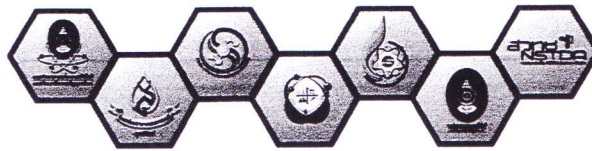
- CBOL Plant working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 106: 12794-12797.
 Chase, W. M., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, M.J., Kesavakurthi, P. R., Haidar, N. And Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. Philosophical Transactions of the Royal Society B 360: 1889-1895.
 Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser.41:95-98.

ตารางที่ 1 แสดงการจัดกลุ่มพันธุ์มะขามระหว่างการจัดกลุ่มด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์และการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl*

ลำดับ	ชื่อพันธุ์ปลูก	กลุ่ม	ยีน	ยีน
1.	เปรี้ยวพื้นเมือง (PM)	1	สีทอง (ST)	1
2.	เปรี้ยวยักษ์ (PY)	1	น้ำผึ้ง (NP)	1
3.	สีทอง (ST)	2	ชันดี (SD)	1
4.	ชันดี (SD)	2	ประกายเพชร (PP)	1
5.	หมิ่นจง (MJ)	2	อินทลัม (IT)	2
6.	ประกายเพชร (PP)	2	ศรีชมพู (SC)	2
7.	อินทลัม (IT)	2	ประกายทอง (PT)	2
8.	ศรีชมพู (SC)	2	น้ำผึ้ง (NP)	2
9.	ประกายทอง (PT)	2	ชันดี (SD)	2
10.	น้ำผึ้ง (NP)	2	เปรี้ยวยักษ์ (PY)	2
11.	ชันดี (SD)	2	เปรี้ยวพื้นเมือง (PM)	2

สรุปผลการทดลองทดลอง

จากการศึกษา พบว่า มะขามพันธุ์ปลูกบางส่วนที่มีลักษณะความสัมพันธ์ที่คล้ายกันในการวิเคราะห์ทั้งสองแบบ แต่มีบางส่วนหนึ่งที่ไม่ผลไม่ตรงกัน ซึ่งอาจเกิดข้อจำกัดขึ้นบางประการเกี่ยวกับประสิทธิภาพของเครื่องมือทางโมเลกุลที่ใช้ ซึ่ง Chase และคณะ (2005) ได้รายงานไว้ถึงแม้ว่ายีน *rbcl* จะเป็นข้อมูลที่ดี มีเก็บอยู่เป็นจำนวนมากในฐานข้อมูล Genbank แต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็น DNA barcode ได้ เนื่องจากไม่สามารถใช้ได้ในพืชบางกลุ่ม และในส่วนของ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ยังมีข้อจำกัดคือ คืออาจเกิดการโคลนไมโครแซทเทลไลท์ และการหาลำดับเบส เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่ชนกับกับไมโครแซทเทลไลท์ และปัญหาที่พบอยู่บ่อยๆ คือ การวิเคราะห์ผลค่อนข้างยาก หากได้แถบดีเอ็นเอที่เป็นหลายแถบ (stutter bands) อาจทำให้การอ่านแถบดีเอ็นเออาจผิดพลาดได้ (He et al., 2003; สุทธิพร, 2546) ในการศึกษาลักษณะดังกล่าว นอกจากจะอาศัยเทคนิคข้างต้น อาจยังต้องศึกษาจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นเพื่อให้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของมะขามและพืชชนิดอื่นๆ สามารถทำการจำแนกลักษณะทางวิวัฒนาการได้อย่างถูกต้องและชัดเจนต่อไป



การประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงานวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระดับชาติ ครั้งที่ 1

[Poster Presentation]

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มะขาม 10 พันธุ์ปลูก
ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์และการใช้ยีน *rbcl*

The nucleotide sequence analysis of 10 cultivas of tamarind
Using by Microsatellite and *rbcl* gene

นายสุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง : รศ.ดร.เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก มะขามถูกจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการโดยการศึกษาดีเอ็นเอบริเวณไมโครแซทเทลไลท์ พบว่า สามารถจัดกลุ่มมะขามได้ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ และเปรี้ยวพื้นเมือง กลุ่มที่ 2 มะขามพันธุ์ปลูกสีทอง ชันดี น้ำผึ้ง และกลุ่มที่ 3 มะขามพันธุ์ปลูกประกายเพชร หมิ่นจง อินทผาลัม ศรีชมพู และประกายทอง และเมื่อทดสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน *rbcl* จากมะขามทั้งหมดจำนวน 10 พันธุ์ปลูก โดยใช้โปรแกรม BioEdit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method ได้ผลคือ มะขามถูกแบ่งออกเป็น ลักษณะความใกล้ชิดกัน โดยเริ่มจากมะขามพันธุ์ปลูกสีทอง น้ำผึ้ง ชันดี ประกายเพชร อินทผาลัม หมิ่นจง ประกายทอง ศรีชมพู เปรี้ยว-ยักษ์ และเปรี้ยวพื้นเมือง เมื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ และการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl* ร่วมกัน พบว่า มีมะขามพันธุ์ปลูกบางส่วนที่มีลักษณะความสัมพันธ์ที่คล้ายกันในการวิเคราะห์ทั้งสองแบบ อย่างไรก็ตาม การทดลองดังกล่าวอาจเกิดข้อจำกัดขึ้นบางประการเกี่ยวกับประสิทธิภาพของเครื่องมือทางโมเลกุลที่ใช้ เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีความแปรปรวนน้อยในวิธีหนึ่ง แต่กลับมีการเพิ่มปริมาณได้ในบริเวณที่มีความแปรปรวนมากในอีกวิธีหนึ่ง จึงทำให้ผลการทดลองอาจไม่สามารถให้คำตอบได้อย่างชัดเจน จึงต้องมีการทบทวนและวางแผนเพื่อค้นหาวิธีการในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อให้สอดคล้องกับการศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมให้มีความเหมาะสมและสามารถจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

คำสำคัญ : มะขาม, ไมโครแซทเทลไลท์, ยีน *rbcl*

ชื่อผลงานการวิจัย : การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มะขาม 10 พันธุ์ปลูกด้วยเทคนิค ไมโครแซทเทลไลต์และการใช้ยีน *rbcl*
: The nucleotide sequence analysis of 10 cultivars of tamarind Using by Microsatellite and *rbcl* gene.

ชื่อผู้วิจัย : นายสุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง
: รศ.ดร.เบญจพร ศรีสุวรรณาศ

Abstract:

The study of evolutionary relationships for each species planted tamarind. Tamarind grouped relationship evolves by studying the DNA microsatellites Patel light that can be grouped as follows: group 1, Preao yak and Preao puen muang, group 2 tamarind planting See tong, Khuntee and Num pueng, group 3 tamarind planting Pra kai phet, Muen jung, Intapalum, Sri chom poo and Pra kai tong. And test evolutionary relationship with Sequence analysis of the *rbcl* gene, a total of 10 varieties of tamarind grown using BioEdit by Neighbor-Joining/UPGMA method has been divided into a tamarind. A close up start by planting See tong, Num pueng, Khuntee, Pra kai phet, Intapalum, Muen jung, Pra kai tong, Sri chom poo, Preao yak and Preao puen muang. The relationship between the evolution of Micro Satellite pour water. And sequence analysis, gene by *rbcl* gene together showed a tamarind cultivars, some of which have a similar relationship to analyze both However, such experiments may be restrictions on certain about their performance. using molecular tools such as DNA in a little variability in the way. But with the increase in area is considerable variability in the way. Therefore, the results might not be able to answer clearly. Need to review and plan to find ways to develop molecular markers to conform to the genetic maps to be appropriate and phylogenetic classification of tamarind efficiency even further.

Keywords: Tamarind, Microsatellite, *rbcl* gene.

บทคัดย่อ :

จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก มะขามถูกจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการโดยการศึกษาดีเอ็นเอบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ พบว่า สามารถจัดกลุ่มมะขามได้ ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ และเปรี้ยวพื้นเมือง กลุ่มที่ 2 มะขามพันธุ์ปลูก สีทอง ชันดี น้ำผึ้ง และกลุ่มที่ 3 มะขามพันธุ์ปลูกประกายเพชร หมิ่นจง อินทผาลัม ศรีชมพู และประกายทอง และเมื่อทดสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน *rbcl* จากมะขามทั้งหมดจำนวน 10 พันธุ์ปลูก โดยใช้โปรแกรม BioEdit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method ได้ผลคือ มะขามถูกแบ่งออกเป็น ลักษณะความใกล้ชิดกัน โดยเริ่มจากมะขามพันธุ์ปลูกสีทอง น้ำผึ้ง ชันดี ประกายเพชร อินทผาลัม หมิ่นจง ประกายทอง ศรีชมพู เปรี้ยวยักษ์ และเปรี้ยวพื้นเมือง เมื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์ และการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl* ร่วมกัน พบว่า มีมะขามพันธุ์ปลูกบางส่วนที่มีลักษณะความสัมพันธ์ที่คล้ายกันในการวิเคราะห์ทั้งสองแบบ อย่างไรก็ตาม การทดลองดังกล่าวอาจเกิดข้อจำกัดขึ้นบางประการเกี่ยวกับประสิทธิภาพของเครื่องมือทางโมเลกุลที่ใช้ เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีความแปรปรวนน้อยในวิธีหนึ่ง แต่กลับมีการเพิ่มปริมาณได้ในบริเวณที่มีความแปรปรวนมากในอีกวิธีหนึ่ง จึงทำให้ผล

การทดลองอาจไม่สามารถให้คำตอบได้อย่างชัดเจน จึงต้องมีการทบทวนและวางแผนเพื่อค้นหาวิธีการในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อให้สอดคล้องกับการศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมให้มีความเหมาะสมและสามารถจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

คำสำคัญ : มะขาม, ไมโครแซทเทลไลต์, ยีน *rbcl*

บทนำ :

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การจำแนกสายพันธุ์พืช เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ เพื่อการรวบรวมพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาตำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม ไมโครแซทเทลไลต์ เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมของสิ่งมีชีวิต สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดีโดยที่โพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ในโลкусหนึ่งๆ ประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง มีตั้งแต่ 1-6 เบส ในจีโนมของพืชเขตร้อนส่วนใหญ่ เช่น มะขาม ข้าวโพด จะพบลำดับเบสซ้ำ (GT)_n และ (AG)_n ในปริมาณมาก จากลักษณะเฉพาะนี้ สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้

rbcl เป็นยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมที่ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) เอนไซม์ RubisCO ที่สมบูรณ์ หน่วยย่อยขนาดใหญ่และขนาดเล็กรวมตัวกัน จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ RuBP กับ CO₂ ในวัฏจักรคัลวิน (Calvin's cycle) (Soltis & Soltis, 1998) ความยาวของยีน *rbcl* มีความแปรผันเล็กน้อยในพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปมีความยาวเฉลี่ย 1,400 คู่เบส (Ford *et al.*, 2009) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อสร้าง DNA barcode จะใช้เพียงบางส่วนของยีนที่มีความยาวตั้งแต่ 500-700 คู่เบส

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์จากจีโนมิกดีเอ็นเอของมะขามด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์ หรือการหาลำดับของยีน *rbcl* จากมะขาม 10 พันธุ์ เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ปลูกในจังหวัดเพชรบูรณ์
2. ศึกษาลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *rbcl* ที่ได้จากมะขามซึ่งยีนดับกล่าวมีความแตกต่างกันในระดับพันธุ์ปลูก

ขอบเขตของการวิจัย

1. การทดลองนี้ใช้มะขาม จากจังหวัดเพชรบูรณ์เท่านั้น ทั้งต้นที่เจริญในธรรมชาติและเจริญในเรือนทดลอง
2. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีน *rbcl* และดีเอ็นเอบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์
3. หาความสัมพันธ์หรือความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก

กรอบความคิดในงานวิจัย/สมมุติฐานการวิจัย

เนื่องจากลำดับเบสบริเวณไมโครแซทเทลไลต์และยีน *rbcl* มีความจำเพาะและระดับความแปรปรวนที่ค่อนข้างสูงขึ้นเมื่อสิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากขึ้น ซึ่งคาดว่าเครื่องหมายทางโมเลกุลนี้จะสามารถใช้จำแนกความแตกต่างและบอกถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ

สกัดดีเอ็นเอโดยวิธีของ Dolye & Dolye (1987) ทำได้โดยนำตัวอย่างใบอ่อนของมะขามมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.2 กรัม นำใส่โกร่งและเติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมตัวอย่างบดตัวอย่างให้เป็นผงจนละเอียด เติมสารละลาย Extraction buffer 500 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย 0.1 M Tris – HCl, 0.05 M EDTA, 0.1 M NaCl และ 0.5% SDS) ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Proteinase K 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในระหว่างที่บ่มให้พลิกกลับหลอดไปกลับมาเบาๆ เป็นครั้งคราว เติมสารละลาย Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25: 24: 1) 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปกลับมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนบนใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ เติม Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25: 24: 1) 500 ไมโครลิตร อีกครั้ง กลับหลอดไปกลับมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนบนใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ เติม Isopropanol ที่แช่เย็นจัด 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปกลับมาเบาๆ นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งล้างตะกอนด้วย 100% ethanol และเติมสารละลาย 70% Ethanol: 10 mM Ammonium Acetate 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปกลับมาเบาๆ เทสารที่เหลือทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง โดยทิ้งไว้ประมาณ 2 - 3 ชั่วโมง เติมสารละลาย TE buffer 40 ไมโครลิตร และเติม RNase A 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 40 นาที และเก็บไว้ที่ -20 °C

2. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

2.1 วิธี Gel electrophoresis ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบความสว่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder) 0.8 % agarose gel นำมาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง

2.2 วิธีวัดการดูดกลืนแสง วัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer และคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ} = 50 \times A_{260} \times \frac{\text{ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด } (\mu\text{L})}{\text{ปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้ } (\mu\text{L})}$$

ความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอหาจากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm (A_{260}/A_{280}) ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ควรมีอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.6 -1.8 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.6 แสดงว่าดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์อื่นๆ และถ้ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อนอยู่

3. การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.1 การหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเป็นแม่แบบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทดสอบใช้ดีเอ็นเอของมะขามทั้ง 10 พันธุ์โดยทดสอบจากปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่ปริมาณ 50 นาโนกรัม เป็นแม่แบบ โดยเลือกไพรเมอร์ 1 เส้น เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเป็นแม่แบบของปฏิกิริยาอาร์เอฟพีดี และนำผลผลิตของอาร์เอฟพีดีมาตรวจสอบผลด้วย 1.5 % agarose gel

3.2 ตรวจหาไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์ 20 คู่ มาทดสอบกับดีเอ็นเอหนึ่งตัวอย่าง เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และทดลองปรับเปลี่ยนสภาวะในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยปฏิกิริยา PCR มีส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR

4. การวิเคราะห์ผล

4.1 การคำนวณหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอ โดยวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณหาขนาดน้ำหนักของโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่าง จากนั้นเปรียบเทียบขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่างจากระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน

4.2 เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพันธุ์มะขามที่มีความสามารถทนเค็มระดับต่างกัน จะถูกคัดเลือกเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องต่อไป

4.3 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (% Polymorphism: P) โดยเปลี่ยนขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอเป็นข้อมูลตัวเลข 0 และ 1 โดยเปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่น้ำหนักโมเลกุลหนึ่งให้คะแนนเป็น 0 เมื่อไม่พบชิ้นดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น 1 เมื่อพบชิ้นดีเอ็นเอ นับชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณมาทั้งหมด และจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์มะขาม นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรม

5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)

ในขั้นตอนปฏิกิริยาพีซีอาร์นี้ เป็นขั้นตอนในการนำ cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR มาเพิ่มปริมาณให้มากขึ้น การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เริ่มจากเตรียม master mix ที่ประกอบด้วย 1x PCR Buffer, dNTP, forward primers, reverse primers, *Taq* DNA polymerase, DNase - RNase free water การเตรียมสารละลายต่างๆ ทำได้โดยปิเปตสารแต่ละชนิดลงในหลอดทดลองใหม่เพื่อเตรียมเป็น master mix เนื่องจากสารละลายทั้งหมดเสื่อมสภาพได้ง่าย จึงควรปฏิบัติงานอย่างรวดเร็วและระมัดระวัง และสารทุกชนิดต้องอยู่ในความเย็นขณะปฏิบัติงาน โดยเฉพาะ *Taq* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีการเสื่อมสภาพได้ง่ายและเพื่อไม่ต้องการให้เกิดปฏิกิริยาก่อนการเติม DNA จึงควรเติม *Taq* DNA polymerase นีลงในปฏิกิริยาเป็นอันดับสุดท้ายใน master mix ก่อนการเติม DNA เมื่อเตรียม master mix เรียบร้อยแล้ว ทำการปิเปตสารลงในหลอดทดลองแต่ละตัวอย่าง หลังจากนั้นเติม DNA แต่ละตัวอย่างลงไปและเริ่มปฏิกิริยาด้วยเครื่อง thermal cycler

6. การตรวจผลปฏิกิริยา PCR ด้วย Agarose gel

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วย agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมนลงในช่อง agarose gel ที่ละตัวอย่างจนครบ และเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA /*Hind*III ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ทราบขนาดและปริมาณที่แน่นอน จากนั้นทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง electrophoresis โดยใช้แรงดันไฟฟ้า 75 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที นำไปตรวจผลบนเครื่องฉาย UV (UV Transilluminator) และบันทึกภาพการเรือง

แสงของดีเอ็นเอด้วยกล้อง polaroid camera เนื่องจากในการทดลองนี้ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 200 bp และ 246 bp การตรวจสอบจึงต้องใช้ความเข้มข้นของ agarose gel ให้มากขึ้นเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์

7 . การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint analysis)

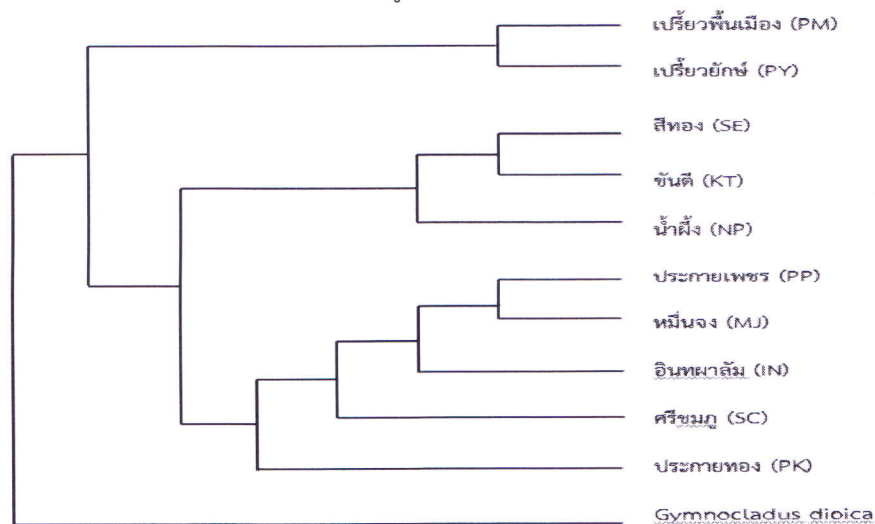
เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของมะขาม 5 พันธุ์ปลูก ของ *Tamarindus indica* L. (accession no. Z70160) โดยใช้โปรแกรม 'Multiple sequence alignment with hierarchical clustering' (Corpet, 1989) และ BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT (Hall, 1999) ลงทะเบียน (submitted) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างผ่านทางฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ/EMBL/GenBank)

8. การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree

มะขามทั้งหมดจำนวน 19 พันธุ์ปลูก มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกันโดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.0 ในการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *rbcl* ระหว่างพันธุ์ปลูกมะขามข้างต้น ใช้โปรแกรม CLUSTAL X (1.83) ในการทำ multiple alignment และใช้โปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1

ผลการวิจัย

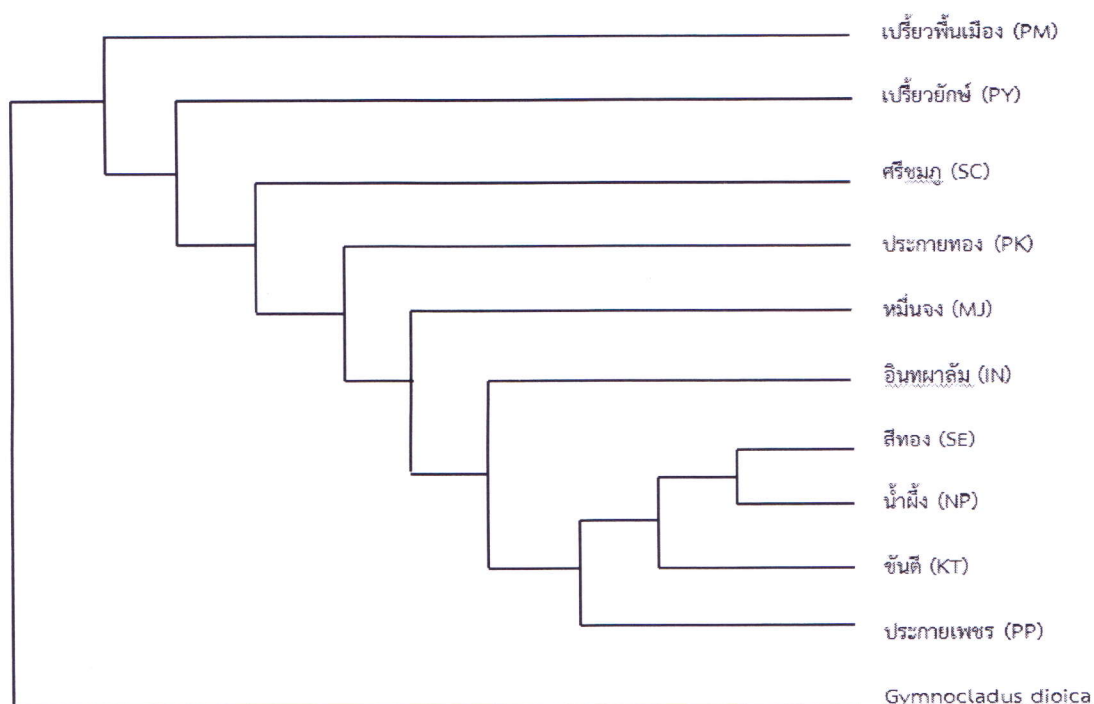
จากผลการทดลอง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ และใช้โปรแกรม CLUSTAL X (1.83) ในการทำ multiple alignment และใช้โปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1 สามารถแบ่งมะขามออกเป็นกลุ่มดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ และเปรี้ยวพื้นเมือง กลุ่มที่ 2 มะขามพันธุ์ปลูก สีทอง ชันดี น้ำผึ้ง และกลุ่มที่ 3 มะขามพันธุ์ปลูกประกายเพชร หมิ่นจง อินทผลาลัม ศรีชมพู และประกายทอง ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แผนภาพความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของมะขามที่ได้จากการวิเคราะห์จากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ โดยใช้โปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1

และจากการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *rbcl* โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.0 ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1 ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 2 สามารถให้ผลการวิเคราะห์โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของมะขามมีความใกล้เคียงกันที่สุดคือ มะขามพันธุ์ปลูกสี

ทอง น้ำผึ้ง ขันตี ประกายเพชร อินทผาลัม หมื่นจง ประกายทอง ศรีชมภู เปี้ยวยักษ์ และเปี้ยว ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แผนภาพความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของมะขามที่ได้จากการวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* โดยโปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1

เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่าง 2 วิธีการ สามารถจัดกลุ่มมะขามในแต่ละพันธุ์ปลูกได้โดยเทียบจากตารางที่ 11 ซึ่งแสดงถึงการจัดกลุ่มร่วมกันระหว่างเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์และการใช้ความจำเพาะของลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcl* ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการจัดกลุ่มพันธุ์มะขามระหว่างการจัดกลุ่มด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์และการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl*

ลำดับ	เทคนิคไมโครแซทเทลไลต์	กลุ่มที่	การวิเคราะห์ด้วยยีน <i>rbcl</i>	กลุ่มที่
1.	เปี้ยวพื้นเมือง (PM)	1	สีทอง (SE)	1
2.	เปี้ยวยักษ์ (PY)	1	ศรีชมภู (SC)	2
3.	สีทอง (SE)	2	ขันตี (KT)	1
4.	ขันตี (KT)	2	เปี้ยวยักษ์ (PY)	2
5.	น้ำผึ้ง (NP)	2	เปี้ยวพื้นเมือง (PM)	2
6.	ประกายเพชร (PP)	3	หมื่นจง (MJ)	2
7.	หมื่นจง (MJ)	3	น้ำผึ้ง (NP)	1
8.	อินทผาลัม (IN)	3	อินทผาลัม (IN)	2
9.	ศรีชมภู (SC)	3	ประกายทอง (PK)	2
10.	ประกายทอง (PK)	3	ประกายเพชร (PP)	1

อภิปราย

จากผลการทดลอง พบว่า ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามจำนวน 10 พันธุ์ปลูก ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ และเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl* ร่วมกัน พบว่า มีมะขาม พันธุ์ปลูกบางส่วนที่มีลักษณะความสัมพันธ์ที่คล้ายกันในการวิเคราะห์ทั้งสองแบบ เช่นในพันธุ์ปลูกสีทอง ขันดี และน้ำผึ้ง ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์และเปรี้ยวพื้นเมืองถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่มี บางส่วนที่ให้ข้อมูลไม่ตรงกันในส่วนของการลำดับความใกล้เคียงเช่น เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์จัดมะขามพันธุ์ปลูกสีทอง อยู่ใกล้เคียงกับขันดี มากกว่าน้ำผึ้ง ในขณะที่การวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl* จัดมะขามพันธุ์ปลูกสีทอง อยู่ใกล้เคียงกับน้ำผึ้ง มากกว่าขันดี จากสิ่งที่เกิดขึ้นดังกล่าว อาจเกิดข้อจำกัดขึ้นบางประการเกี่ยวกับ ประสิทธิภาพของเครื่องมือทางโมเลกุลที่ใช้ เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีความแปรปรวนน้อยในวิธีหนึ่ง แต่กลับมีการเพิ่มปริมาณได้ในบริเวณที่มีความแปรปรวนมากในอีกวิธีหนึ่ง จึงทำให้ผลการทดลองอาจไม่สามารถตอบโจทย์ที่ต้องการทราบได้อย่างชัดเจนนัก ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบดีเอ็นเอ 7 บริเวณในพลาสมิดเพื่อประเมินความเหมาะสมในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ *atpF-atpH* spacer, ยีน *matK*, ยีน *rbcl*, ยีน *rpoB*, ยีน *rpoC1*, *psbK-psbI* spacer และ *trnH-psbA* spacer เกณฑ์ที่ใช้ประกอบการพิจารณาความเหมาะสมคือ การได้มาซึ่งลำดับดีเอ็นเอ คุณภาพของข้อมูล และความสามารถในการจำแนกสปีชีส์ จากการศึกษาครั้งนี้ PWG สรุปว่าบริเวณที่เหมาะสมสำหรับเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชคือ *rbcl* และ *matK* โดยต้องใช้ข้อมูลจากทั้งสองยีนร่วมกันในการระบุชนิดพืช (2-locus barcode) (CBOL Plant Working Group, 2009) อย่างไรก็ตามคณะกรรมการระดับสูงของ CBOL สรุปยืนยันว่า *rbcl* และ *matK* ได้รับความเห็นชอบในการถูกกำหนดให้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชทุก แต่คณะกรรมการยังคงเห็นควรว่าการศึกษาดีเอ็นเอบริเวณอื่น สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะยังเป็นประโยชน์ในการเป็นข้อมูลสำรองสำหรับความต้องการในบางกรณีที่ข้อมูลจาก *rbcl* และ ไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกสปีชีส์พืชบางกลุ่ม (CBOL, 2009)

สำหรับในกลุ่มพืช ยังไม่สามารถระบุบริเวณที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode ได้แน่นอน ตัวอย่างการศึกษาเพื่อหาข้อสรุปเกี่ยวกับดีเอ็นเอที่ควรใช้เป็น DNA barcode ได้แก่ ในปี ค.ศ 1999 Hilu และ Alice ได้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Poaceae โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *matK* พบว่ายีนนี้ถดถอยให้กรดอะมิโนจำนวนไม่เท่ากันใน และพบการเพิ่มหรือการขาดหายไปของลำดับเบสในบริเวณอนุรักษ นอกจากนี้นี้ยังได้มีการศึกษาบริเวณอื่น เช่น ยีน *rbcl* และ บริเวณ ITS โดย Chase และคณะ (2005) จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่า ถึงแม้ว่าข้อมูลลำดับเบสของยีน *rbcl* และ บริเวณ ITS จะเป็นข้อมูลที่ดี และมีเก็บอยู่เป็นจำนวนมากในฐานข้อมูล Genbank แต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็น DNA barcode ได้ เนื่องจากไม่สามารถใช้ได้ในพื้นที่บางกลุ่ม และพบว่ายีน *matK* มีอัตราการแทนที่ของลำดับเบสที่สูงกว่ายีนอื่น เช่น สูงกว่ายีน *rbcl* 2-3 เท่า ทำให้มีตำแหน่งที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์มากกว่า จึงทำให้เหมาะสมในการนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับสกุลและชนิด และน่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็น DNA barcode เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากการประชุมโดยนักวิทยาศาสตร์ ในเดือน มกราคม พ.ศ. 2550 จัดที่ New York Botanical Garden ซึ่งได้ข้อสรุปว่า ดีเอ็นเอในพลาสมิดบริเวณ *matK* น่าจะเป็นบริเวณหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode สำหรับการระบุพืช แต่ยังคงต้องทำการทดสอบเพื่อประเมินศักยภาพสำหรับการใช้งานจริงต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน *matK* ในแง่ของการนำมาใช้เป็น DNA barcode ซึ่งจากเหตุผลดังกล่าวนี้ จึงต้องมีการทบทวนและวางแผนเพื่อค้นหาวิธีการในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อให้สอดคล้องกับการศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมให้มีความเหมาะสมและสามารถจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงลักษณะความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามและพันธุ์ปลูกที่สามารถจำแนกได้เบื้องต้นถึงความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการ อย่างไรก็ตาม ในการจะศึกษาลักษณะดังกล่าว นอกจากจะอาศัยเทคนิคข้างต้น อาจยังต้องศึกษาจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น หรือลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนอื่นร่วมด้วย หรือแม้กระทั่ง การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะภายนอกอื่นประกอบด้วย เพื่อให้การหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของมะขามและพืชชนิดอื่นๆ สามารถทำการจำแนกลักษณะทางวิวัฒนาการได้อย่างถูกต้องและชัดเจนเพื่อเป็นแนวทางในการใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตได้อย่างถูกต้องต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- CBOL Plant working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 106: 12794-12797.
- Chase, W. M., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, M.J, Kesanakurthi, P. R., Haidar, N. And Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. Philosophical Transactions of the Royal Society B 360: 1889-1895.
- Corpet, D.E., Lumeau, S., Corpet, F., 1989. Minimum antibiotic levels for selecting a resistance plasmid in a gnotobiotic animal model. Antimicrob. Agents Chemother., 33: 535-540.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh leaf Tissue. Photochemical Bulletin 19:11-15
- Ford, C. S., Ayres, K. L., Toomey, N., Haider, N., Stahl, J. V. A., Kelly, L. J., Wikström, N., Hollingsworth, P. M., Duff, R. J., Hoot, S. B., Cowan, R. S., Chase, M. W. and Wilkinson, M. J. 2009. Botanical Journal of the Linnean Society 159: 1-11.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Hilu, K.W. & Liang, H. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in Plant systematics. American Journal of Botany 84: 830-839.
- Soltis, D.E. & Soltis, P.S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for Phylogenetic analysis. In: Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing. D.E., Soltis, P.S. Soltis & J.J. Doyle (Eds.), pp.1-42. Kluwer Academic Publishers, Boston.