ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ไม่มีความแปรปรวน

No Nucleotide Sequence Variation at Non-Coding Mitochondrial DNA of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

ยุรนันท์ ทรวงทองหลาง และ ชูตา บุญภักดี*

Yuranun Thuangtonglang and Chuta Boonphakdee*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University

Received : 11 June 2017

Accepted : 15 August 2017

Published online : 22 August 2017

บทคัดย่อ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่ยังไม่มีรายงานการศึกษา เพื่อพิจารณาใช้เป็นเครื่องหมายชีวโมเลกุลในการระบุสายพันธุ์ โดยศึกษากับมันสำปะหลังจำนวน 18 สายพันธุ์ เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 368 คู่เบส ด้วยคู่ไพรเมอร์ trn-Phe และ trn-F ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์พบว่าบริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลังทุกตัวอย่างมีขนาดเท่ากับ 268 คู่เบส ไม่มีลำดับเบสที่แตกต่างกันและผลการศึกษาร่วมกับพืชในวงศ์ Euphorbiaceous เดียวกันอีก 2 ชนิด คือ ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และละหุ่ง (*Ricinus communis*) พบความแตกต่างจำนวน 10 และ 33 คู่เบส ตามลำดับ และพืชต่างวงศ์อีก 1 ชนิด คือถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.)) พบความแตกต่างจำนวน 32 คู่เบส ดังนั้นบริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเครื่องหมายชีวโมเลกุลในระดับสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง

คำสำคัญ : ดีเอ็นเอ มันสำปะหลัง ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ พีซีอาร์

***Corresponding author. E-mail** : chuta@buu.ac.th

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important economic crop of Thailand. The purpose of this study is to investigate the non-coding mitochondrial DNA region of cassava that has not yet been reported for use as a molecular marker for cultivar identification. In this study, 18 cassava cultivars were used to obtain the 368-bp segment using trn-Phe and trn-F primers in the Polymerase Chain Reaction. The non-coding mitochondrial DNA region of all samples were 268 base pairs, with no nucleotide difference. Comparison between sequences of other members within Euphorbiaceous (same family as cassava), Para rubber (*Hevea brasiliensis*) and castor bean (*Ricinus communis*), revealed 10 and 33 base pairs being different, respectively. Moreover, when compared to mung bean (*Vigna radiata* (L.)), out of Euphorbiaceous family, found 32 base pairs different. Therefore, the non-coding mitochondrial DNA region is not suitable for cassava identification at the cultivar level.

Keywords : DNA, cassava, mitochondrial DNA, PCR

บทนำ

มันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของมนุษย์ที่มีราคาถูกกว่าพืชผลิตแป้งชนิดอื่นๆ (Lebot, 2009) การจำแนกสายพันธุ์ของมันสำปะหลังมีประโยชน์ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีตรงตามความต้องการ เช่น ผลผลิตสูง มีคุณสมบัติต้านทานต่อโรคและแมลง เป็นต้น ปัจจุบันนี้การนำเทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) หรือ พีซีอาร์ (PCR) มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและศึกษาข้อมูลพันธุกรรมพืช เพื่อใช้ระบุชนิดหรือสายพันธุ์ได้รับความนิยมมากขึ้น ซึ่งให้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำกว่าการจำแนกแบบดั้งเดิมที่ใช้แต่เพียงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก และข้อความพันธุกรรมนอกจากจะจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ออกจากกันแล้ว ยังบอกได้ถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Archak, 2000; Duangjit, 2011)

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในพืช มีโครงสร้างของจีโนมเป็นลักษณะวงแหวนเกลียวคู่ มีขนาดต่างกันมากประมาณ 200 - 2,400 กิโลเบส (Ward *et al*.,1981; Palmer 1985; Pring & Lonsdale 1985) ยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีบริเวณถอดรหัสสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน tRNA และ rRNA เรียกว่า coding DNA sequence และมีบริเวณที่ไม่มีการถอดรหัส เรียกว่า non-coding DNA หรือ non-functional DNA ในพืชเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn-Phe* และ *trn-F* คือ ส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนส่วนใหญ่ ซึ่งมีลำดับเบสเหมือนหรือคล้ายกันได้หลายซ้ำ เรียกว่า repeated sequence ทำหน้าที่สร้างเสถียรภาพให้กับ coding DNA sequence ปัจจุบันถูกนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอพาหะและเป็นเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) (Anand *et al*., 2014)

ดังนั้น การนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาค่อนข้างน้อย อีกทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของมันสำปะหลัง ยังไม่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank จึงเป็นที่น่าสนใจที่อาจพบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ และสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์หรือระบุสายพันธุ์ของมันสำปะหลังได้ นอกจากนี้จะทำให้ทราบถึงความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ ของมันสำปะหลังอีกด้วย ซึ่งจะเป็นการต่อยอดภูมิปัญญาทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ได้ต่อไป ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ จึงเริ่มต้นศึกษาด้วยการออกแบบไพรเมอร์

และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายพันธุ์ต่างๆ ของมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นข้อมูลบ่งบอกความเป็นเอกลักษณ์ในระดับสายพันธุ์ของพืชชนิดนี้ได้

วิธีดำเนินการการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลัง

ทำการเก็บตัวอย่างใบอ่อนของมันสำปะหลัง จากสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 18 สายพันธุ์ นำมาสกัดเป็นจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จ SP Plant DNA Kit (Omega bio-tek, USA) จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่อง NanaDrop™ 2000/2000C spectrophotometer และเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2X GoTaq™ Green MasterMix 10 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังแต่ละตัวอย่าง (แยกหลอด) 200 นาโนกรัม ไพรเมอร์ที่จำเพาะในบริเวณยีน *trn-Phe* (5'- AATCCTTGTGTCAGTGGTTCG) และ *trn-F* (5'- ATTCGAACCTATGGCCCTCT) ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพารา (GenBank accession no. AP014526) ข้างละ 0.2 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปราศจาก Nuclease ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวนทั้งหมด 30 รอบ โดยมีขั้นตอน Pre-denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที ขั้นตอน Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน Final Extention 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วย 1.0 % agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.5 SB buffer ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 60 โวลต์ นาน 60 นาที แล้วทำการตรวจสอบดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยชุด gel documentation (Syngene international Ltd., England)

3. การอ่านลำดับเบส

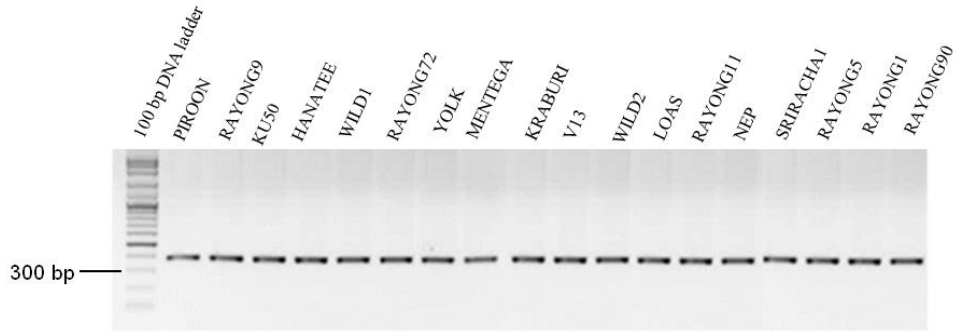
นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์สำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Genenaid International, Taiwan) ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีอ่านโดยตรง จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องด้วยตาโดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.0 และนำข้อมูลไปเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายพันธุ์ของมันสำปะหลังและที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านระบบเครือข่ายอินเตอร์เนต (www.ncbi.nlm.nih.gov/) ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ด้วยการทำ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal X version 2.0

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

เมื่อเพิ่มปริมาณบริเวณ non-coding ของมันสำปะหลัง จำนวน 18 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *trn-Phe* และ *trn-F* พบว่าได้ผลผลิตที่มีขนาด 368 คู่เบส เท่ากันทุกสายพันธุ์ (ภาพที่ 1) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding พบว่ามีขนาดเท่ากับ 268 คู่เบส ที่มีลำดับเบสเหมือนกันทั้งหมด (ภาพที่ 2) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และละหุ่ง (*Ricinus communis*) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกันกับมันสำปะหลัง พบจำนวนลำดับเบสในบริเวณ non-coding มีความแตกต่างกัน 10 และ 33 คู่เบส ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงผล) โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.063 และ 0.158 ตามลำดับ (ตารางที่1) และกับพืชต่างวงศ์ คือ ถั่วเขียว *Vigna radiata* (L.) มีลำดับเบสต่างกันจำนวน 32 คู่เบส (ไม่ได้แสดงผล)

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.092 แสดงว่าบริเวณ non-coding ของพืช มีความแปรปรวนน้อย ผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Jeffrey *et al.* (1988) ที่พบว่าในไมโทคอนเดรียลจีโนมของพืชสกุล *Brassica* และ *Raphanus* มีความแปรปรวนต่ำมาก เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Kress & Erickson (2005) ที่ระบุว่าการใช้ไมโทคอนเดรียลจีโนมเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชนั้นมีข้อจำกัดเนื่องจากวิวัฒนาการของจีโนมพืชจะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงที่ต่ำกว่าในสัตว์สอดคล้องกับ Petcha *et al.* (2016) ที่ศึกษาความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลจีโนมพบว่าไม่เพียงพอที่จะใช้จำแนกพืชในระดับสายพันธุ์ได้

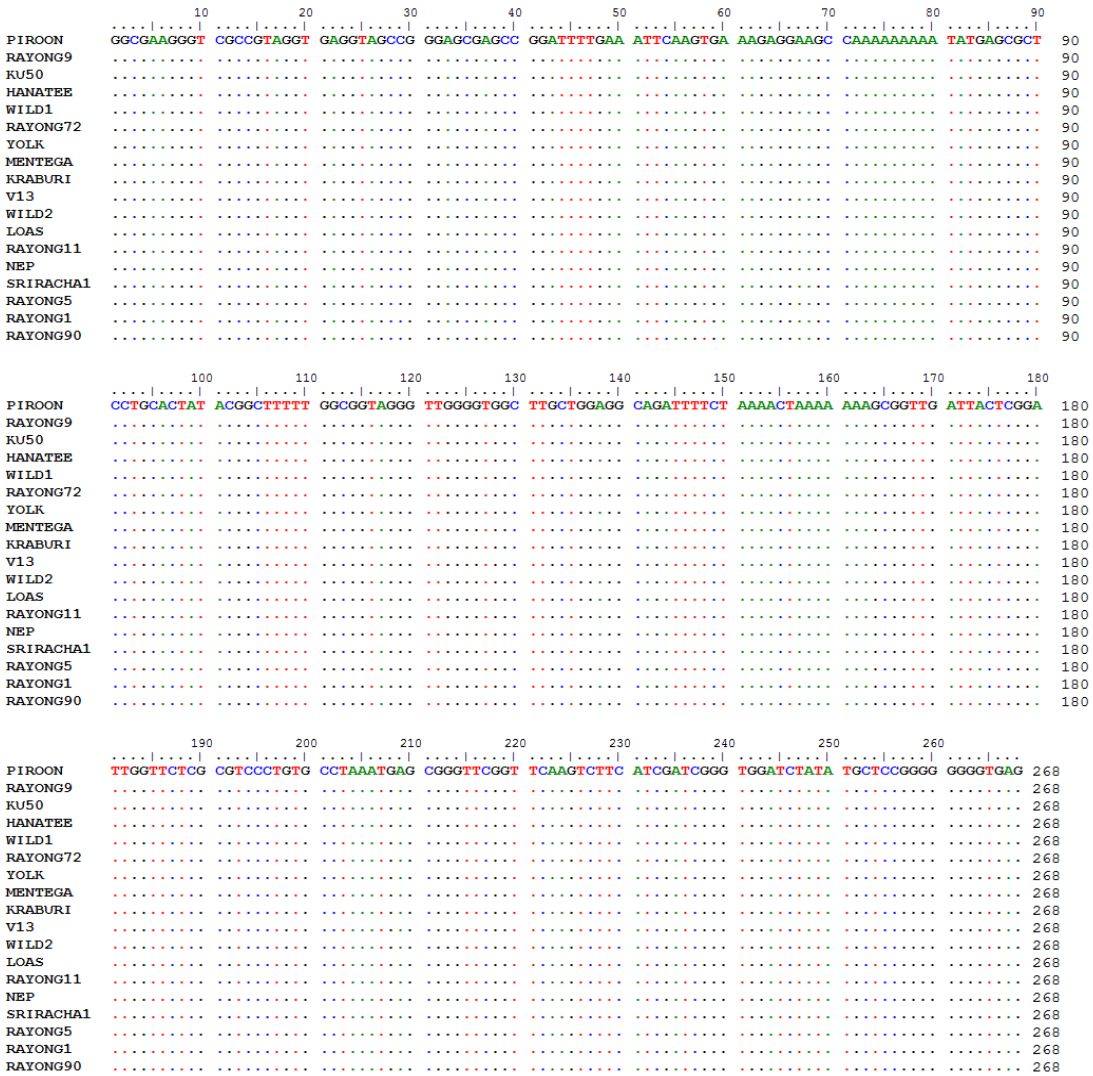
มันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ ที่ปลูกในประเทศไทยคาดว่ามีแหล่งกำเนิดเดียวกัน คือประเทศบราซิลเนื่องจากพบการกระจายตัวและความแปรปรวนของสายพันธุ์มากมายในบริเวณดังกล่าว (Wongtiem, 2012) มันสำปะหลัง 18 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาครั้งนี้ทราบข้อมูลแหล่งที่มาของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์น้อยมาก เมื่อพิจารณาร่วมกับรายงานการศึกษาของ Wongtiem (2012) สามารถแบ่งมันสำปะหลังออกเป็นเป็น 3 กลุ่มใหญ่ตามแหล่งที่มา คือ 1) สายพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ HANATEE, RAYONG1, WILD1 และ WILD2 2) สายพันธุ์จากต่างประเทศ ได้แก่ YOLK และ MENTEGA 3) สายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดยผสมข้ามสายพันธุ์ ได้แก่ PIROON, KU50, RAYONG5, RAYONG11, RAYONG9, RAYONG72, RAYONG90 และ SRIRACHA1 และ 4)สายพันธุ์ที่ไม่ทราบข้อมูลแหล่งที่มา ได้แก่ NEP, V13 และ LOAS ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าทุกสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาจีโนมของไมโทคอนเดรียในพืชมีวิวัฒนาการน้อยมากเนื่องจากกลไกการซ่อมแซมตัวเองของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพสูงกว่าไมโทคอนเดียลดีเอ็นเอของสัตว์ กล่าวคือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงหรือแทนที่ของลำดับเบสบริเวณ non-coding บริเวณดังกล่าวจะมีความสามารถในการจัดเรียงลำดับเบสให้เป็นแบบเดิมได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ (Christensen, 2014) แต่อย่างไรก็ตาม ควรทำการศึกษาในบริเวณ non-coding ของพืชชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมมากขึ้นเป็นลำดับต่อไป และหากพบว่าภายในพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กัน ลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่มีความแปรปรวนหรือมีความแปรปรวนต่ำ บริเวณ non-coding จะมีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์หรือการระบุชนิดของพืชได้ ดังเช่นที่ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างมันสำปะหลังกับยางพาราและละหุ่งได้ เป็นต้น



ภาพที่ 1 ผลผลิต PCR ของ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 18 สายพันธุ์ ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 SB buffer ที่ความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

ตารางที่ 1 ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของมันสำปะหลังกับพืชในวงศ์ Euphorbiaceae และต่างวงศ์คือ Vitaceae และ Fabaceae

Species	*M. esculenta*	*H. brasiliensis*	*R. communis*	*V. radiata*	*V. vinifera*
M. esculenta	0.000				
H. brasiliensis	0.063	0.000			
R. communis	0.158	0.102	0.000		
V. radiata	0.092	0.059	0.148	0.000	
V. vinifera	0.186	0.132	0.214	0.137	0.000



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 268 คู่เบส ของมันสำปะหลังจำนวน 18 สายพันธุ์ สัญลักษณ์จุด (.) คือลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันในตำแหน่งตรงกัน

สรุปผลการวิจัย

บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ที่อยู่ระหว่างยีน *trn-Phe* และ *trn-F* ทุกสายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 268 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์มีลักษณะอนุรักษ์ไม่พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของมันสำปะหลังที่นำมาทดสอบทั้ง 18 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับยางพาราและละหุ่งที่จัดอยู่ในวงศ์เดียวกัน พบลำดับเบสแตกต่างกัน 10 และ 33 คู่เบส ตามลำดับ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.063 และ 0.158 ตามลำดับ ดังนั้นบริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ระบุเอกลักษณ์ในระดับสายพันธุ์ แต่หากมีการศึกษาในพืชชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมมากขึ้นและให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับมันสำปะหลังดังการศึกษาครั้งนี้ บริเวณ non-coding จะสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในระดับชนิดหรือระดับสูงกว่าชนิดได้

เอกสารอ้างอิง

Anand, P., Samit, R., & Amit, R. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies - A Review. *Phylogenetics and Evolutionary Biology, 2,* 1-9.

Archak, S. (2000). Plant DNA Fingerprinting: An Overview. *Ag Biotech Net*, *2*, 1-6.

Christensen, A.C. (2014). Plant Mitochondrial Genome Evolution can be Explained by DNA Repair Mechanisms.*Genome Biology and Evolution*, *5*(6), 1079-1086.

Duangjit, S. (2011). Mitochondrial DNA and Forensic Application. *Forensic Medicine Journal*, *4*(1), 53-65.

Jeffrey, D.P., & Laura, A.H. (1988). Plant Mitochondrial DNA Evolves Rapidly in Structure, but Slowly in Sequence. *Journal of Molecular Evolution, 28*, 87-97.

Kress, J.W., & Erickson, D.L. (2008). DNA Barcodes: Genes, Genomics, and Bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 105*, 2761-2762.

Lebot, V. (2009). The Tropical Root and Tuber Crops: Cassava, Sweet Potato, Yams and Aroids. *The Centre for Agriculture and Bioscience International*, *17*, 143.

Palmer, J.D. (1985). Evolution of Chloroplast and Mitochondrial DNA in Plants and Algae. *Plenum,*131-240.

Petcha, N., Maensiri, D., & Saensouk, S. (2016). Assessment of rpoB and rpoC1 Plastid DNA Regions for Their Suitability as DNA Barcodes for Identification of Plants in the Genus *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae). *The 12th National Graduate Research Conference*, 552-563.

Pring, D.R., & Lonsdale, D.M. (1985). Moleccular Biology of Higher Plant Mitochondrial DNA. *International Review of Cytology*, *97*, 1-46.

Ward, B.L., Anderson, R.S., & Bendich, A.J. (1981). The Mitochondrial Genome is Large and Variable in a Family of Plants (Cucurbitaceae). *Cell, 25*, 793-803.

Wongtiem, P. (2012). Morphological Studies of Genetic Resources of *Ex Situ* and *In Situ* Cassava. Rayong Field Crops Research Center. Department of Agriculture. Thailand.