บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเงาะในวังสวนบ้านแก้ว

การสำรวจและเก็บตัวอย่างส่วนประกอบของต้นเงาะในพื้นที่วังสวนบ้านแก้ว บริเวณพระตำหนักเทาเป็นต้นเงาะที่สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ทรงปลูกไว้ 1 ต้น เมื่อครั้งเสด็จพระราชดำเนินมาจังหวัดจันทบุรีพร้อมกับพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 9 เมื่อวันที่ 17 พฤศจิกายน พ.ศ.2499 แสดงให้เห็นว่าปัจจุบัน (พ.ศ.2560) ต้นเงาะที่ทรงปลูกนี้มีอายุถึง 61 ปี ซึ่งนับว่าเป็นต้นเงาะที่มีอายุยืนมาก (ภาพที่ 4.1)

ภาพที่ 4.1 ต้นเงาะทรงปลูกของสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถในรัชกาลที่ 9 (ภาพถ่ายเมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม 2560)

จากการสัมภาษณ์เจ้าหน้าที่ดูแลสำนักศิลปวัฒนธรรมและพัฒนาท้องถิ่นของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี กล่าวว่า ต้นเงาะที่ทรงปลูกเป็นเงาะพันธุ์บางยี่ขัน มีการตัดยอดออกในช่วงที่ต้นเริ่มเป็นสาว (ให้ผลผลิตครั้งแรก) เพื่อไม่ให้ต้นสูงมากเกินไปและเพื่อให้แตกกิ่งก้านสาขาเป็นทรงพุ่ม โดยมีการดูแลรดน้ำและให้ปุ๋ยอย่างต่อเนื่อง แต่มิได้มีการตัดแต่งกิ่งตามลักษณะของการปลูกเงาะโดยทั่วไป และไม่ค่อยให้ผู้ใดเข้าไปดำเนินการหรือปรับแต่งโครงสร้างของต้น เนื่องจากเห็นว่าเป็นต้นเงาะที่ราชินีในรัชกาลที่ 9 ทรงปลูกไว้จึงเกรงว่าจะไปทำให้ต้นเงาะได้รับผลกระทบได้ จึงอาจเป็นเหตุให้ต้นเงาะทรงปลูกมีลักษณะภายนอกที่แตกต่างไปจากต้นเงาะทั่วไป ซึ่งการบ่งชี้สายพันธุ์ของต้นไม้ในพื้นที่วังสวนบ้านแก้วในอดีตเป็นการพูดบอกต่อกันมา ยังไม่มีข้อมูลบันทึกเป็นลายลักษณ์อักษรชัดเจนในช่วงเวลาสมัยนั้น จึงอาจทำให้มีการบ่งชี้สายพันธุ์ผิดพลาดจากคนรุ่นหลังได้

จากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นเงาะที่ทรงปลูกมีลักษณะเป็นทรงพุ่ม ความสูงจากพื้นดินถึงปลายยอดประมาณ 3 เมตร ความยาวเส้นรอบวงของโคนต้นวัดได้ 175 เซนติเมตร เส้นรอบวงของลำต้นก่อนแตกกิ่งสาขาอยู่ระหว่าง 74 – 83 เซนติเมตร เส้นรอบวงของกิ่งสาขาอยู่ระหว่าง 42 – 59 เซนติเมตร และเส้นรอบวงของกิ่งสาขาย่อยอยู่ระหว่าง 21.5 – 30.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.2)

ภาพที่ 4.2 ลักษณะทรงพุ่ม โคนของลำต้น และการแตกกิ่งสาขาของต้นเงาะที่สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถทรงปลูกในพื้นที่วังสวนบ้านแก้ว

ลักษณะของใบ มีสีเขียวเข้ม เป็นใบประกอบแบบขนนก ปลายใบคู่ รูปร่างใบแบบทรงรี (Elliptic) รูปใบป้อม กลางใบกว้างกว่าส่วนอื่นของใบ ฐานใบแหลมและเรียวไปยังปลายที่แหลม (Acute) ปลายใบเรียวแหลม (Acuminate) การจัดเรียงตัวของใบแบบตรงข้าม (Opposite) ความกว้างของใบอยู่ระหว่าง 3.5 – 7.5 เซนติเมตร ความยาวของใบอยู่ระหว่าง 8.0 – 17.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.3 (ก))

ลักษณะของผล รูปร่างผลแบบรูปขอบขนาน (Oblong) ผลอ่อนมีสีเขียว แล้วค่อยเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จนเมื่อผลสุกมีสีแดง โคนขนมีสีแดง ปลายขนมีสีเขียวอมเหลือง เปลือกบาง เนื้อภายในสีขาวฉ่ำน้ำ รสหวานอมเปรี้ยว เนื้อติดเมล็ด ไม่ล่อน (ภาพที่ 4.3 (ข-ค))

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ลักษณะของเมล็ด มีรูปร่างยาวรี (Obovoid Elongated) สีเปลือกเมล็ดเป็นสีน้ำตาล มีเยื่อสีขาวหุ้มเมล็ด สีเมล็ดเป็นสีขาว ความยาวประมาณ 2.5 – 3.0 เซนติเมตร ความกว้างประมาณ 0.8 – 1.2 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.3 (ง))

ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของของต้นเงาะที่สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถทรงปลูกในพื้นที่วังสวนบ้านแก้ว (ก) ใบ (ข) ผลอ่อน (ค) ผลสุก และ (ง) เมล็ด

2. การบ่งชี้สายพันธุ์เงาะโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

2.1 การออกแบบไพรเมอร์และหาสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์

จากการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับพืชในกลุ่มของเงาะและสายพันธุ์ใกล้เคียงจากฐานข้อมูล GenBank (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้น พบบริเวณที่ศึกษาในสายพันธุ์ของพืชกลุ่มเงาะและสายพันธุ์ใกล้เคียงมีจำนวนไม่มากนัก โดยเลือกบริเวณของลำดับเบสที่เป็นแบบอนุรักษ์ (Flanking region) ครอบบริเวณที่มีลำดับเบสที่เป็นแบบเอกลักษณ์ในระดับสายพันธุ์มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ คือ บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งเป็นบริเวณที่แทรกอยู่ภายในชุดยีน ribosomal rRNA (18S rRNA – 5.8S rRNA – 26S rRNA) ที่อยู่ในนิวเคลียร์จีโนม มีอยู่ 2 บริเวณ คือ ITS1 และ ITS2 (วุฒิพงศ์ มหาคำ, 2554) โดยลำดับเบสของไพรเมอร์ในชุดที่ 1 (ตารางที่ 4.1) มีขนาดของ ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ลำดับเบสของบริเวณ ITS ในการออกแบบไพรเมอร์ IL คู่กับ IR จะได้ผลผลิตของพีซีอาร์ขนาด 451 คู่เบส และไพรเมอร์ IL คู่กับ IRC จะได้ผลผลิตของดีเอ็นเอขนาด 760 คู่เบส ซึ่ง ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีลำดับเบสอยู่ในบริเวณของ 5.8S rRNA – ITS2

ตารางที่ 4.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ชุดที่ 1 บริเวณ ITS

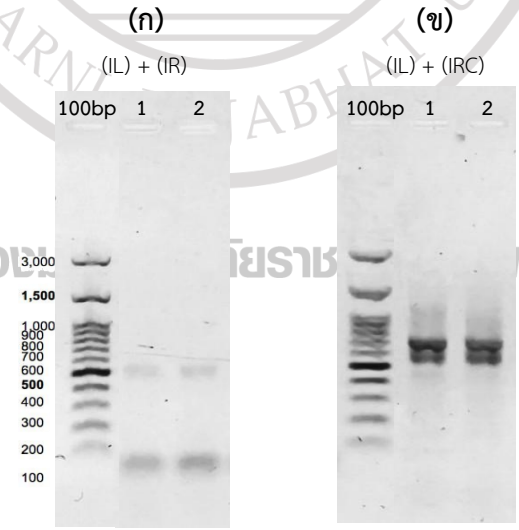
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ชื่อบริเวณ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5’ --> 3’)
ITS	IL	GTA GGT GAA CCT GCG AAA GG
	IR	GAC TCT TAT TTG GGC CAA CC
	IRC	CTC GCC GTT ACT AGG GGA AT

2.2 การสกัดดีเอ็นเอและการทำเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

หลังจากออกแบบไพรเมอร์แล้ว จึงนำใบอ่อนของต้นเงาะที่สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถทรงปลูกในพื้นที่วังสวนบ้านแก้ว บริเวณตำหนักเทา (RB) และเงาะพันธุ์โรงเรียนที่ปลูกในสวนส่วนพระองค์ของสมเด็จพระนางเจ้ารำไพพรรณี (SD) มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ GenUP™ Plant DNA Kit จากนั้นนำไปทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS โดยใช้ไพรเมอร์ IL คู่กับ IR (ภาพที่ 4.4 (ก)) และไพรเมอร์ IL คู่กับ IRC (ภาพที่ 4.4 (ข)) หลอดละ 1 คู่ไพรเมอร์ ทำซ้ำจำนวน 2 หลอด พบว่า คู่ไพรเมอร์ IL กับ IR ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอขึ้นจาง ๆ จำนวนหนึ่งแถบ มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 541 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้โปรแกรม Primer3 ออกแบบไว้ในบริเวณ ITS นอกจากนี้ยังพบแถบที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนของการจับกันของไพรเมอร์ด้วยกันเอง (Primer-dimer) ที่บริเวณด้านล่างของอะกาโรสเจล ส่วนการทำพีซีอาร์ของไพรเมอร์คู่ที่สอง (IL คู่กับ IRC) ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ที่ประมาณ 760 คู่เบส โดยเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นมากกว่า 1 แถบ แสดงให้เห็นว่ามีการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอยังไม่จำเพาะเจาะจงกัน แต่มีการจับกับดีเอ็นเอได้ดีกว่าการใช้คู่ไพรเมอร์ IL คู่กับ IR

ดังนั้นจึงเลือกใช้คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้ง่ายและเกิดแถบดีเอ็นเอชัดเจน คือ คู่ไพรเมอร์ IL คู่กับ IRC ในการเพิ่มจำนวน โดยตัดชิ้นส่วนของแถบดีเอ็นเอออกจากเจลแล้วไปทำให้บริสุทธิ์ (Gel Extraction and Purification) ก่อนส่งหาลำดับเบสต่อไปเพื่อยืนยันได้ว่าเป็นบริเวณของ ITS จริง



ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาพที่ 4.4 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ต่าง ๆ ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS (ก) IL คู่กับ IR และ (ข) IL คู่กับ IRC (ช่องที่ 1 = 100bp DNA marker ช่องที่ 2-3 = ตัวอย่างเงาะที่สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถในรัชกาลที่ 9 ทรงปลูก)

2.2 การวิเคราะห์ลำดับเบส

จากการส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ในบริเวณ ITS เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสของตัวอย่างเงาะที่ราชินีทรงปลูกในวังสวนบ้านแก้ว พบว่า ลำดับเบสที่ได้จากบริเวณ ITS อ่านได้ 786 เบส เมื่อนำลำดับเบสของบริเวณ ITS ที่วิเคราะห์ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ IL และ IRC ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสออนไลน์ NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่า ลำดับเบสของเงาะที่ราชินีในรัชกาลที่ 9 ทรงปลูก (RB) มีความคล้ายคลึงกับพืชในกลุ่มของ Sapindaceae โดยมีจำนวนของลำดับเบสตรงกับลำไย (*Dimocarpus confinis*) มากที่สุด (725 เบส) แต่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกันเพียงร้อยละ 90 ส่วนพืชที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกันมากที่สุด คือ ต้นแดงน้ำ (*Pometia pinnata*) รองลงมา คือ *Nephelium cuspidatum var. eriopetalum* และ *N. lappaceum* ซึ่งมีร้อยละความคล้ายคลึงเท่ากัน คือ ร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.2)

จากข้อมูลลำดับเบสที่ได้ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบสามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ตรงตามตำแหน่งของยีนที่ต้องการ แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้เกิดความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งของบริเวณ ITS มากขึ้น จึงได้ทำการออกไพรเมอร์ชุดที่ 2 เพิ่มเติม คือ LF, ILF, LR, IF3 และ IR3 (ตารางที่ 4.3) สำหรับใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเงาะพันธุ์พื้นเมืองที่นำมาจากศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีที่มีการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ดั้งเดิมของเงาะไว้ จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์น้ำตาลกรวด (N) พันธุ์เงาะสี (C) พันธุ์บางยี่ขัน (B) พันธุ์เงาะสีทอง (G) พันธุ์เจ๊ะมง (J1 และ J2) และพันธุ์เงาะโรงเรียน (S) เพื่อใช้เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของเงาะที่ปลูกในพื้นที่วังสวนบ้านแก้วว่าน่าจะเป็นสายพันธุ์ใด

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลความสอดคล้องของสิ่งมีชีวิตในฐานข้อมูล GenBank กับลำดับเบสบริเวณ ITS จากเงาะในพื้นที่วังสวนบ้านแก้ว

Description	Max score	Total score	Query cover	Identity (%)	GenBank Accession no.
Dimocarpus confinis cultivar Longli 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	725	725	71%	90%	EF532336.1
Pometia pinnata isolate J329 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S	717	717	58%	95%	KR532502.1

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ribosomal RNA gene, partial sequence					
Pometia pinnata isolate G054 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	712	712	58%	95%	KR532500.1
Pometia pinnata isolate J478 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	706	706	58%	95%	KR532504.1
Nephelium cuspidatum var. eriopetalum isolate ZAS005 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	701	701	57%	95%	JQ807592.1
Nephelium lappaceum isolate ZAS001 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	701	701	57%	95%	JQ807588.1

ตารางที่ 4.3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ชุดที่ 2 จากการออกแบบจากบริเวณ ITS

ชื่อบริเวณ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5’ --> 3’)
ITS	IF3	GAC TGC GCC AAG GAA ACT T
	IR3	CGA GCT CGA GGT TTC TCA CT
	ILF	GTT CGG TGG TGG AAA AAG TG
	LF	GGA CCC GTT TCA CAC TCG
	LR	GAA ATA TGA AAA ACA CAA ACA CCT TT

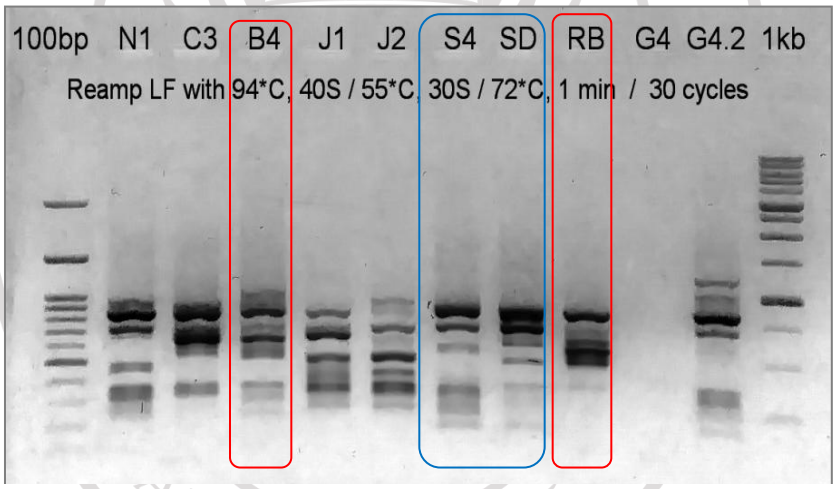
2.3 การบ่งชี้สายพันธุ์ของเงาะที่ปลูกในพื้นที่วังสวนบ้านแก้วกับชนิดพันธุ์พื้นเมือง

ตัวอย่างใบอ่อนของเงาะพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 6 สายพันธุ์ (พันธุ์น้ำตาลกรวด (N) พันธุ์บางยี่ขัน (B) พันธุ์เงาะสี (C) พันธุ์เงาะสีทอง (G) พันธุ์เจ๊ะมง (J1 และ J2) และพันธุ์เงาะโรงเรียน (S)) ที่นำมาจากศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มจำนวนบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ชุดที่ 2 เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับเงาะที่ราชินีทรงปลูกที่วังสวนบ้านแก้ว บริเวณตำหนักเทา (RB) กับเงาะพันธุ์โรงเรียนที่ปลูกขึ้นภายหลังบริเวณสวนส่วนพระองค์ของสมเด็จพระนางเจ้ารำไพพรรณี ด้านหน้าพระตำหนักแดง (SD) ซึ่งเป็นเงาะที่ทราบสายพันธุ์ที่แน่นอนจึงนำมาใช้เป็นตัวอย่างควบคุมการทดลอง โดยผลการทดลองพบว่า จากการคู่ไพรเมอร์ LF คู่กับ LR ไม่สามารถเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้ จึงได้ทดลองใช้ไพรเมอร์เพียง 1 สายต่อการทดลอง คือ ไพรเมอร์ LF และใช้ไพรเมอร์ ILF ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

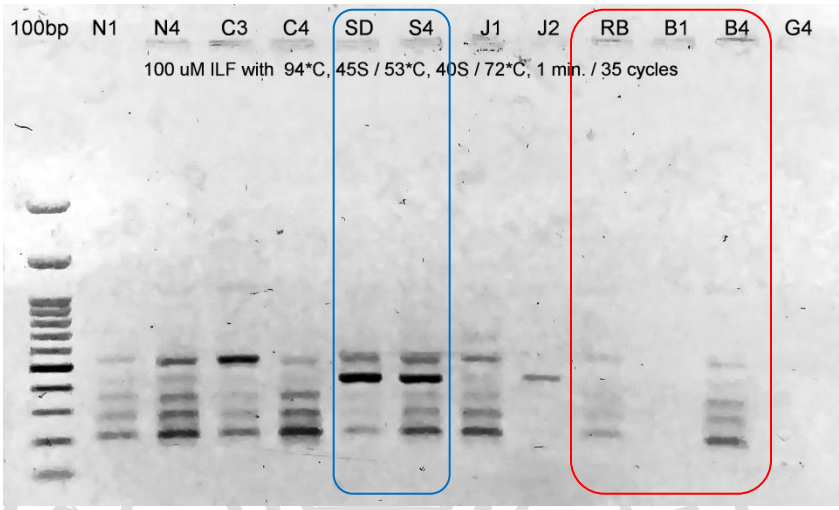
ดีเอ็นเอ โดยใช้ลักษณะของการทำเป็น DNA marker แบบ RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)

เทคนิค RAPD เป็นการใช้ไพรเมอร์เพียงเส้นเดียวเข้าทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อจับกับสายดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลจำนวนหลายแถบ ซึ่งในงานวิจัยนี้ไม่สามารถนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอตัดออกจากเจลเพื่อนำไปใช้หาลำดับเบสได้ แต่เมื่อพิจารณาจากแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นจะเห็นได้ว่ามีรูปแบบที่แตกต่างกันไป โดยเมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของเงาะในวังสวนบ้านแก้ว กับเงาะสายพันธุ์พื้นเมือง พบว่า เงาะตัวอย่าง RB มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอใกล้เคียงกับเงาะพันธุ์บางยี่ขัน แต่รูปแบบที่เกิดขึ้นยังไม่สามารถจัดกลุ่มได้ชัดเจนมากนัก ส่วนเงาะตัวอย่าง SD มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอใกล้เคียงกับเงาะพันธุ์โรงเรียน ดังภาพที่ 4.5 ภาพที่ 4.6 แต่อย่างไรก็ตามการพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ยังไม่สามารถระบุหรือจำแนกสายพันธุ์ที่ชัดเจนได้แน่นอน จึงได้ทดลองใช้ไพรเมอร์อีก 1 คู่ คือ ไพรเมอร์ IF3 คู่กับ IR3 ต่อไป



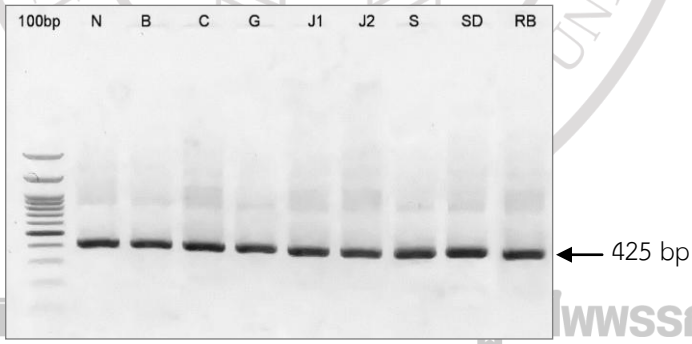
ภาพที่ 4.5 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสโดยใช้ไพรเมอร์ LF (ช่องที่ 1 = 100 bp DNA Marker, ช่องที่ 2-11 = ตัวอย่างเงาะสายพันธุ์ต่าง ๆ และช่องที่ 12 = 1 kb DNA Ladder Plus)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ 4.6 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสโดยใช้ไพรเมอร์ ILF (ช่องที่ 1 = 100 bp DNA Marker, ช่องที่ 2-13 = ตัวอย่างเงาะสายพันธุ์ต่าง ๆ)

ส่วนผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ IF3 คู่กับ IR3 ได้ขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรสเจลเพียงแถบเดียว มีขนาดประมาณ 425 คู่เบส ดังภาพที่ 4.7 ซึ่งชิ้นส่วนที่ได้ถูกตัดออกมาจากเจล (Gel Extraction) และทำให้บริสุทธิ์ (PCR Purification) จากนั้นส่งหาลำดับเบสที่บริษัท FirstBase (ประเทศมาเลเซีย) เพื่อนำผลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดของเงาะสายพันธุ์ต่าง ๆ



ภาพที่ 4.7 แถบดีเอ็นเอขนาด 425 คู่เบส ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ IF3 คู่กับ IR3 (ช่องที่ 1 = 100 bp DNA Marker ช่องที่ 2-8 ตัวอย่างเงาะสายพันธุ์พื้นเมืองต่าง ๆ ได้แก่ พันธุ์น้ำตาลกรวด (N) พันธุ์บางยี่ขัน (B) พันธุ์เงาะสี (C) พันธุ์เงาะสีทอง (G) พันธุ์เจ๊ะมง (J1 และ J2) และพันธุ์เงาะโรงเรียน (S) ช่องที่ 9-10 ตัวอย่างเงาะที่นำมาตรวจสอบ ; SD = เงาะในสวนส่วนพระองค์ ; RB = เงาะตำหนักเทา)

2.5 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเงาะสายพันธุ์ต่าง ๆ

จากการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับเบสบริเวณ ITS ขนาด 425 คู่เบส ของเงาะสายพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 7 พันธุ์ และเงาะที่ปลูกในวังสวนบ้านแก้วจำนวน 2 ตัวอย่าง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ IF3 กับ IR3 แสดงลำดับเบสได้ดังภาพที่ 4.8 และเมื่อนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้คำสั่ง Prodist : Neighbor Phylogenetic Tree ในโปรแกรม BioEdit โดยใช้ลำดับเบสของพืชในฐานข้อมูล GenBank บริเวณ ITS ของเงาะ *Nephelium lappaceum* (Accession no. JQ807589) มาใช้เป็นข้อมูลจัดกลุ่มภายในวงศ์ Sapindaceae (In Group) และนำข้อมูลลำดับเบสของทุเรียน (*Durio zibethinus* : Accession no. MF629779.1) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ไม่อยู่ในวงศ์เดียวกับกลุ่มของเงาะ (Sapindaceae) ถือเป็นพืชนอกกลุ่ม (Out Group) ถูกนำมาใช้จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเพื่อให้เห็นความชัดเจนของกลุ่มตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์กัน

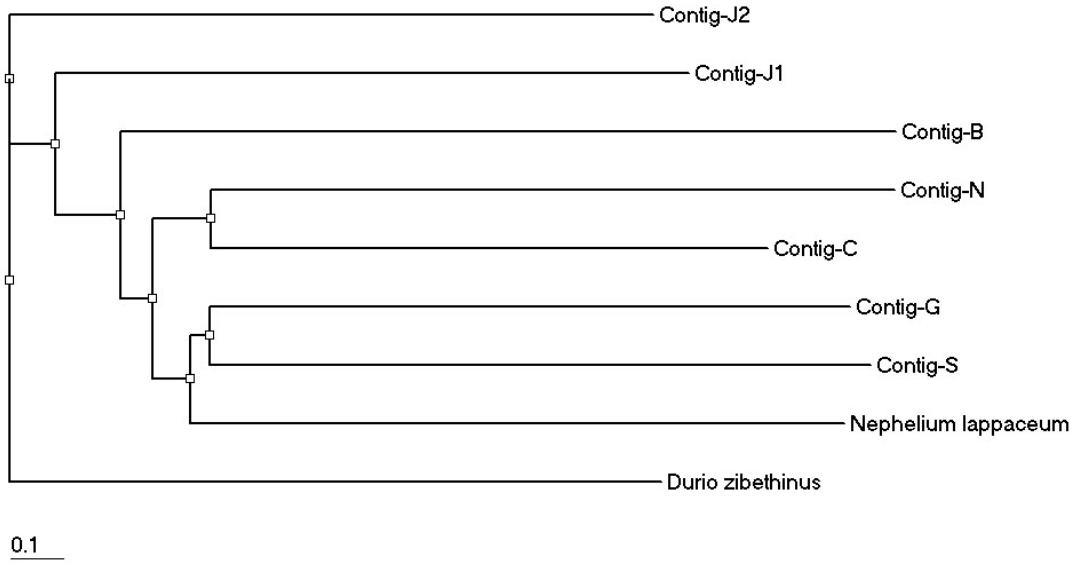
RAMBHAI BARNI RAJABHAT UNIVERSITY
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

Sequences of ITS gene from Rambutan

```
                10        20        30        40        50        60        70        80
     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
N    ---------- ---------- ---------- --CCTCGAGC TCG-AAGTTT CTCACTTTTT CCA---CCGG AACGTAACGT
B    ---------- ---AATTTAC GCNAGTGAGA AACCTCGAGC TCGGAGGTTT CTCACTTTTT CCACCACCGT GAATC-ATCT
C    ---------- ---------- ---------- --ATTCGAGC TCG-AAGTTT CTCACTTTTT CCACCACCTG GGAT--ACGT
G    ---------- ---------- ----GTGAGA AACCTCGAGC TCG-AGGTTT CTCACTTTTT CCACCACCGG GACT--ACGT
J1   ---------- ---------- ---------- -ATCTTCAGC TTGGAGGTTT CTCACTTTTT CCACCACCGA GTTA---CGG
J2   TTTTTGTGCC CAAGAAAAAT AAGAAGGAGA AACCTCGAAG TTGGAAGTTT CTCACTTTTT CCACCACCGG GAGT--ACGG
RB   ---------- ---------- ------GAGA AACCTCGAGC TTCGAAGTTT CTCACTTTTT CCACCACCGA GGT---ACGT
S    ---------- ------TNGA GNNAGTGAGA AACCTCGAGC TCG-AGGTTT CTCACTTTTT CCACCACCGG GGGGGAACGT
SD   ---------- ---------- ------GAGA AACCTTGAGC TTGAGGGTTT CTCACTTTTT CCACCACCGG GCTAA--CGG

                90       100       110       120       130       140       150       160
     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
N    -CGCG-GCG- TCCGTCGCCG AGGACTCTTA TTTGGGCCAA CC--GCGAGA CACG-AGTCG CACGGGAGGC CAATGTCCGC
B    TGGCGAGCGA TCCGTCGCCG AGGACTCTTA TTTGGGCCAA CC--GCGCGA CACG-AGTCG CACGGGAGGC CAATGTCCGC
C    TCGACGGCG- TCCGTCGCCG AGGACTCTTA TTTGGGCCAA CC--GCGCGA CACG-AGTCG CACGGGAGGC CAATGTCCGC
G    -CGCG-GCGA TCCGTCGCCG AGGACTCTTA TTTGGGCCAA CC--GCGCGA CACG-AGTCG CACGGGAGGC CAATGTCCGC
J1   TCGACGCCG- TCCGTCGCCG AGGACTCTTA TTTGGGCCAA CC--GCGAGA CACG-AGTCG CACGGGAGGC CAATGTCCGC
J2   TCGCG-ACG- TCCGTCGCCG AGGACTCTTA TTTGGGCCAA CC--CCGCGA CACG-AGTCG CACGGGAGGC CAATGTCCGC
RB   -CGACGGCGA TCCGTCGCCG AGGACTCTTA TTTGGGCCAA CC--GCGAGA CACG-AGTCG CACGGGAGGC CAATGTCCGC
S    TCGCGAGCGA TCCGTCGACG AGGACTCTTA TTTGGGCCAA CC--GCGCGA CACG-AGTCG CACGGGAGGC CAATGTCCGC
SD   TCGACGACGA TCCGTCGCCG AGGACTCTTA TTTGGGCCAA CTCGGCGCGA CACGTAGTCG CACGGGAGGC CAATGTCCGC

               170       180       190       200       210       220       230       240
     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
N    CCGCAACACG TCCCCGCGCC TCGTTCGAGG AGCGGGGTTG AGGGGGCAAC GATGCGTGAC ACCCAGGCAG ACGTGCCCTC
B    CCGCAACACG TCCCCGCGCC TCGTTCGAGG AGCGGGGTTG AGGGGGCGAC GATGCGTGAC ACCCAGGCAG ACGTGCCCTC
C    CCGCAACACG TCCCCGCGCC TCGTTCGAGG AGCGGGGTTG AGGGGGCGAC GATGCGTGAC ACCCAGGCAG ACGTGCCCTC
G    CCGCAACACG TCCCCGCGCC TCGTTCGAGG AGCGGGGTTG AGGGGGCGAC GATGCGTGAC ACCCAGGCAG ACGTGCCCTC
J1   CCGCAACACG TCCCCGCGCC TCGTTCGAGG AGCGGGGTTG AGGGGGCAAC GATGCGTGAC ACCCAGGCAG ACGTGCCCTC
J2   CCGCAACAAG TCCCCGCGCC TCGTTCGAGG AGCGGGGTTG AGGGGGCGAC GATGCGTGAC ACCCAGGCAG ACGTGCCCTC
RB   CCGCAACACG TCCCCGCGCC TCGTTCGAGG AGCGGGGTTG AGGGGGCGAC GATGCGTGAC ACCCAGGCAG ACGTGCCCTC
S    CCGCAACACG TCCCCGCGCC TCGTTCGAGG AGCGGGGTTG AGGGGGCGAC GATGCGTGAC ACCCAGGCAG ACGTGCCCTC
SD   CCGCAACACG TCCCCGCGCC TCGTTCGAGG AGCGGGGTTG AGGGGGCGAC GATGCGTGAC ACCCAGGCAG ACGTGCCCTC

               250       260       270       280       290       300       310       320
     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
N    GGCCTAACGG CTTGGGGCGC AACTTGCGTT CAAAGACTCG ATGGTTCACG GGATTCTGCA ATTCACACCA AGTATCGCAT
B    GGCCTAACGG CTTGGGGCGC AACTTGCGTT CAAAGACTCG ATGGTTCACG GGATTCTGCA ATTCACACCA AGTATCGCAT
C    GGCCTAACGG CTTGGGGCGC AACTTGCGTT CAAAGACTCG ATGGTTCACG GGATTCTGCA ATTCACACCA AGTATCGCAT
G    GGCCTAACGG CTTGGGGCGC AACTTGCGTT CAAAGACTCG ATGGTTCACG GGATTCTGCA ATTCACACCA AGTATCGCAT
J1   GGCCTAACGG CTTGGGGCGC AACTTGCGTT CAAAGACTCG ATGGTTCACG GGATTCTGCA ATTCACACCA AGTATCGCAT
J2   GGCCTAAAGG CCTGGGGCGC AACCTGCGTT CAAAGACTCG ATGGTTCACG GGATTCTGCA ATTCACACCA AGTATCGCAT
RB   GGCCTAAAGG CTTGGGGCGC AACTTGCGTT CAAAGACTCG ATGGTTCACG GGATTCTGCA ATTCACACCA AGTATCGCAT
S    GGCCTAACGG CTTGGGGCGC AACTTGCGTT CAAAGACTCG ATGGTTCACG GGATTCTGCA ATTCACACCA AGTATCGCAT
SD   GGCCTAACGG CTTGGGGCGC AACTTGCGTT CAAAGACTCG ATGGTTCACG GGATTCTGCA ATTCACACCA AGTATCGCAT

               330       340       350       360       370       380       390       400
     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
N    TTCGCTACGT TCTTCATCGA TGCGAGAGCC GAGATATCCG TTGCCGAGAG TCGTTATGGA TAATGAAAGA AGG-CACC-G
B    TTCGCTACGT TCTTCATCGA TGCGAGAGCC GAGATATCCG TTGCCGAGAG TCGTTATGGA TAATGAAAGA AGG-CACC-G
C    TTCGCTACGT TCTTCATCGA TGCGAGAGCC GAGATATCCG TTGCCGAGAG TCGTTATGGA TAATGAAAGA AGG-CACC-G
G    TTCGCTACGT TCTTCATCGA TGCGAGAGCC GAGATATCCG TTGCCGAGAG TCGTTATGGA TAATGAAAGA AGG-CACC-G
J1   TTCGATACGT TCTTCATCGA TGCGAGAGCC GAGATATCCG TTGCCGAGAG TCGTTATGGA TAATGAAAGA AGG-CACC-G
J2   TTCGCTACGT TCTTCATCGA TGCGAGAGCC GAGATATCCG TTGCCGAGAG TCGTTATGGA TAATGAAAGA AGG-CACC-G
RB   TTCGCTACGT TCTTCATCGA TGCGAGAGCC GAGATATCCG TTGCCGAGAG TCGTTATGGA TAATGAAAGA AGGGCACC-G
S    TTCGCTACGT TCTTCATCGA TGCGAGAGCC GAGATATCCG TTGCCGAGAG TCGTTATGGA TAATGAAAGA AGG-CACC-G
SD   TTCGATACGT TCTTCATCGA TGCGAGAGCC GAGATATCCG TTGCCGAGAG TCGTTATGGA TAATGAAAGA AGG-CACCTG

               410       420       430       440       450       460       470       480
     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
N    CCCCCCGCAC GCGCTCCGT- TCCCGGAGCG AGGA----GG GCGA-GCTCT CTCGTTAAGT TTCCTGGGC- GCAGTCAGT-
B    CCCCCCGCAC GCGCTCCGT- TCCCGGAACG ACGA-GTTAA GCGA-GCTCT CTCGTTAAGT TTCCTGGGC- GCAGTCAGA-
C    CCCCCCGCAC GCGCTCCGT- -TCCCGGGCG ACGA-AGAAG GCGACGATCT CTCGTTAAGT TTCCTGGGC- GCAGTAACT-
G    CCCCCCGCAC GCGCTCCGT- CCTCCGAACT ACGACGGAGG GCGA-GCTCT CTCGTTAAGT TTCCTGGGC- GCAGTCAGG-
J1   CCCCCCGCAC GCGCTCCGTT CCTCGAGGCG ACGA----GG GCGA-GCTCT CTCGTTAAGT TTCTTGGGCC GCAGTCAAA-
J2   CCCCCCGCAC GCGCTCCGT- ACCCGGGGCG AGGA-----A GGAAAGCACT CTCGTTAAGT TTCCTGGGC- GCAGTAAAA-
RB   CCCCCCGCAC GCGCTCCGT- -TCCCGGGCG ACGA-GGTAA GCCGAGCTCT CTCGTTAAGT TTCCTGGGC- GCAGTAAAA-
S    CCCCCCGCAC GCGCTCCGTA CCTCGGAACG ACGA-GTTAA GCCA-GCTCT CTCGTTAAGT TTCCTGGGC- GCAGTAAGC-
SD   CCCCCCGCAC GCGCTCCGTT CC-CGAGGCG ACGA----AG GCAA-GCTCT CTCGTTAAGT TTCCTGGGC- GCAGTAAGTC
```

ภาพที่ 4.8 ข้อมูลลำดับเบสของเงาะสายพันธุ์ต่าง ๆ บริเวณ ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ IF3 และ IR3

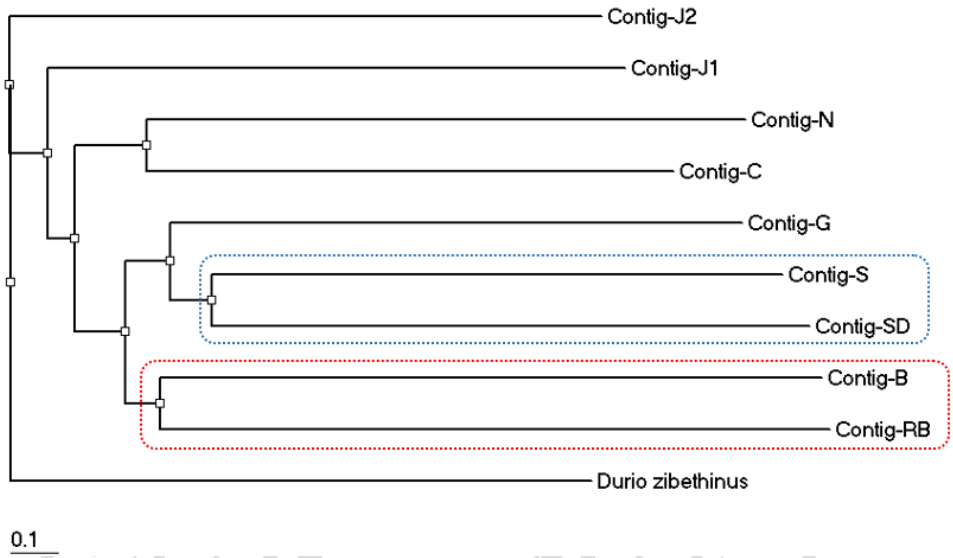
จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบส พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเงาะพันธุ์พื้นเมืองออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เงาะพันธุ์โรงเรียน (S) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับเงาะพันธุ์สีทอง (G) และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเงาะ *Nephelium lappaceum* กลุ่มที่ 2 เงาะสี (C) ใกล้ชิดกับเงาะพันธุ์น้ำตาลกรวด (N) กลุ่มที่ 3 เงาะพันธุ์บางยี่ขัน (B) กลุ่มที่ 4 เงาะพันธุ์เจ๊ะมง 1 (J1) และกลุ่มที่ 5 เงาะพันธุ์เจ๊ะมง 2 (J2) ส่วนทุเรียนมีความใกล้ชิดกับกลุ่มของเงาะน้อยที่สุด (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเงาะพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ พันธุ์น้ำตาลกรวด (N) พันธุ์บางยี่ขัน (B) พันธุ์เงาะสีทอง (G) พันธุ์เงาะสี (C) พันธุ์เจ๊ะมง (J) และพันธุ์เงาะโรงเรียน (S) ร่วมกับเงาะ (*Nephelium lappaceum*) และทุเรียน (*Durio zibethinus*)

ส่วนเมื่อนำลำดับเบสจากบริเวณ ITS ของตัวอย่างเงาะที่ต้องการเปรียบเทียบสายพันธุ์มาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและความสอดคล้องของลำดับเบสกับเงาะพันธุ์พื้นเมือง พบว่า ลำดับเบสของเงาะที่สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถในรัชกาลที่ 9 ทรงปลูก (RB) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเดียวกับเงาะพันธุ์บางยี่ขัน (B) มากที่สุด ส่วนเงาะที่ปลูกในพื้นที่สวนส่วนพระองค์หน้าพระตำหนักแดง (SD) มีความสัมพันธ์กับเงาะพันธุ์โรงเรียน (S) มากที่สุด แสดงให้เห็นว่า ความน่าจะเป็นที่เงาะที่สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถในรัชกาลที่ 9 ทรงปลูก (RB) เป็นเงาะสายพันธุ์เดียวกับเงาะสายพันธุ์บางยี่ขัน (B) และเงาะที่ปลูกในพื้นที่สวนส่วนพระองค์ (SD) เป็นเงาะสายพันธุ์เดียวกับเงาะโรงเรียน (S) จริง (ภาพที่ 4.10)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ 4.10 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณ ITS ของเงาะที่ปลูกในพื้นที่วังสวนบ้านแก้ว (RB) และเงาะที่ปลูกในสวนส่วนพระองค์ หน้าพระตำหนักเทา (SD) เปรียบเทียบกับเงาะพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ พันธุ์น้ำตาลกรวด (N) พันธุ์บางยี่ขัน (B) พันธุ์เงาะสีทอง (G) พันธุ์เงาะสี (C) พันธุ์เจ๊ะมง (J1 และ J2) และพันธุ์เงาะโรงเรียน (S)

RAMBHAI BARNI RAJABHAT UNIVERSITY
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี