



รายงานโครงการวิจัย

ชื่อเรื่องภาษาไทยความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอ
บาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ
ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษBiodiversity and DNA Barcoding of Economically
Efficient Crops

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
นางอัญชลี แก้วดวง
Ms.Anchalee Kaewdoug

ปี พ.ศ. 2565



รายงานโครงการวิจัย

ชื่อเรื่องภาษาไทยความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอ
บาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ
ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษBiodiversity and DNA Barcoding of Economically
Efficient Crops

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
นางอัญชลี แก้วดวง
Ms.Anchalee Kaewdoug

ปี พ.ศ. 2565

คำปรารภ (Foreword หรือ Preface)

โครงการความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจเป็นโครงการวิจัยที่อยู่ภายใต้แผนงานวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืช และจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรมดำเนินการ 4 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2561-2564 ประกอบด้วย 3 กิจกรรม 12 การทดลองคือ กิจกรรมความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสวน กิจกรรมความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชไร่ และกิจกรรมความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชท้องถิ่น โดยเนื้อหาในรายงานเล่มนี้จะกล่าวถึงที่มาของประเด็นปัญหา วัตถุประสงค์ ขอบเขตงาน วิธีดำเนินการวิจัย และผลการดำเนินงานพร้อมข้อสรุป

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่นักวิจัย นักวิชาการเกษตร ตลอดจนเกษตรกร และผู้สนใจโดยทั่วไป ที่ได้ศึกษาและนำไปปรับใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	5
ผู้วิจัย	6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	7
บทนำ.....	8
บทคัดย่อ.....	12
1. กิจกรรมที่ 1 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสวน	14
2. กิจกรรมที่ 2 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชไร่	165
3. กิจกรรมที่ 3 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชท้องถิ่น	198
บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	332
บรรณานุกรม.....	335
ภาคผนวก	-

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่ให้การสนับสนุนห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการทดลองวิจัย ขอขอบคุณสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บรักษาตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งอ้างอิง ขอขอบคุณศูนย์วิจัยสวนจันทบุรี ศูนย์วิจัยสวนตรัง ศูนย์วิจัยสวนศรีสะเกษ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงราย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกระบี่ กรมวิชาการเกษตร ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างทุเรียน เงาะ สะตอ บัว มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง และปลาไหลเผือก ขอขอบคุณในความอนุเคราะห์ของ ดร. สมราน สุดดี, ดร. วรลลต์ แจ่มจำรูญ, นายวิโรจน์ ตันธนาภินันท์, นายมีศักดิ์ แก้วกุล, นางสาวจิราภรณ์ มีวาสนา, นางสาวนันทน์ภัส ภัทรหิรัญไตรสิน, นายสุคิด เรืองเรือ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ดร. สรายุทธ บุญยะเวชชีวิน หัวหน้าโครงการวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ระยะยาว, นายพรหมพิริยะ ศีรีวงศ์ ในการเก็บข้อมูลพืชวงศ์สิลา ขอขอบคุณนายวัชรพล บำเพ็ญอยู่ และนางแจ่มนภา คุ่มฝัน ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย กรมวิชาการเกษตร ในการเก็บข้อมูลพืชปัญจขันธุ์ ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย นายฉลาด ไหวติง และนางสาวศุภรสมิ์ พูลพัฒนสุวรรณ ที่ช่วยดำเนินงานวิจัยทั้งในส่วนห้องปฏิบัติการและภาคสนาม เป็นอย่างดี และสุดท้ายขอขอบคุณนางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษ์พันธุกรรม ที่ให้คำปรึกษาข้อมูลวิจัยและช่วยตรวจแก้ไขจนงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

อัญชลี แก้วดวง	กาญจนา พฤษพันธ์	ธีรวุฒิ ชุตินันท์กุล
Anchalee Kaewdoug	Kanchana Pruesapan	Theerawut Chutinanthakun
อรุโณทัย ซาววา	ธีรภัทร เหลืองศุภบุลย์	ธีรวุฒิ วงศ์วรรณ์
Aroonothai Sawwa	Theerapat Luangsuphabol	Theerawut Wongwarat
จุฑามาส ฟักทองพรรณ	กุหลาบ คงทอง	สุกัลยา ศิริฟองนุกูล
Juthamas Fakthongphan	Kularb Kongthong	Sukunlaya Sirifongnukul
บุญเรือนรัตน์ เพียรงาน	กัญญาภรณ์ พิพิธแสงจันทร์	อภิญาญา วงศ์เปี้ย
Boonraunrat Peanngan	Kunyaporn Pipithsangchan	Aphinya Wongpia
พัฒน์นรี รักษ์คิด	สมคิด ดำน้อย	วิลาวณย์ ไคร์ครวญ
Padnaree Rukkid	Somkid Damnoy	Wilawan Kraikruan
มาลัยพร เชื้อบัณฑิต	อรวิณิณี ชุตรี	อรรถพล รุกขพันธ์
Malaiphorn Chuebundit	Orwintinee Chusri	Auttapon Rukkaphan
สุดใจ ล้อเจริญ	สุภาภรณ์ สาชาติ	สุวัลักษณ์ อมะวัลย์
Sudchai Locharoen	Supaporn Sachati	Suwaluk Amawan
ประพิศ วองเทียม	ศศิธร วรปิติรังสี	ประสาน สีสุข
Prapit Wongtiem	Sasitorn Vorapitirangsi	Prasarn Seubsuk
บุญชนะ วงศ์ชนะ	ชญานุช ตรีพันธ์	อ้อยทิน ผลพานิช
Boonchana Wongchana	Chayanuch Tripan	Auytin Polpanit
ปาจริย์ อินทะชูป	ศุภลักษณ์ สัตยสมิตสถิต	
Pajaree Inthachub	Supalak Sattayasamitsathit	

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้น ที่มีความจำเพาะกับพืชในระดับสกุลและชนิด

ความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) หมายถึง ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ มาจากคำ 2 คำ คือ Biological หมายถึง ชีวภาพ และ diversity หมายถึง ความหลากหลาย

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) หมายถึง ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สิ่งมีชีวิตแต่ละชีวิต ได้รับการถ่ายทอดมาจากรุ่นพ่อแม่และส่งต่อไปยังรุ่นต่อไป เช่น ลักษณะความหลากหลายของลวดลายและสีของหอยทาก ลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายทอดนั้นผ่านทางยีน ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งส่งผลให้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันไปตามยีนที่ได้รับการถ่ายทอดมา

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

ประเทศไทยมีความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมพืชสูงระดับต้นๆ ของโลก แต่ในยุคปัจจุบัน เกษตรกรส่วนมากได้ปรับเปลี่ยนวิธีการปลูกพืชโดยมุ่งเน้นการปลูกสายพันธุ์การค้าตามความต้องการของตลาด ทำให้พันธุ์พืชที่มีการหมุนเวียนใช้ประโยชน์ในประเทศไทยมีความหลากหลายน้อยลง สายพันธุ์พืชที่มีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ไว้มากมาย หรือแม้แต่พันธุ์พืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจกลับถูกละเลยที่จะนำมาพัฒนาต่อยอด อีกทั้งไม่มีการเก็บรักษาเชื้อพันธุพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจเหล่านี้อย่างต่อเนื่องเป็นระบบ ทำให้พันธุ์พืชบางสายพันธุ์สูญหายไป การคุ้มครองสายพันธุ์พืชที่มีลักษณะดีและให้ผลผลิตสูงยังไม่ครอบคลุมทำให้มีการปลอมสายพันธุ์ ซึ่งยากในการตรวจสอบเพราะการจำแนกสายพันธุ์ของพันธุ์พืชเหล่านั้นยังไม่ชัดเจน การตรวจสอบพันธุ์พืชของไทยด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดซึ่งสะดวก รวดเร็ว และมีความน่าเชื่อถือยิ่งมีการศึกษาน้อยและเข้าถึงได้ยาก ในขณะที่ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพันธุกรรมพืชไทยมีความสำคัญอย่างยิ่งในการใช้จำแนกพันธุ์พืชเพื่อสนับสนุนการบังคับใช้กฎหมาย การเข้าถึงและการแบ่งปันผลประโยชน์จากการใช้ทรัพยากรพันธุกรรมพืชของประเทศไทย ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ของหน่วยงานในการบริหารจัดการทรัพยากรการเกษตรและสิ่งแวดล้อมอย่างสมดุลและยั่งยืน และการสร้างความเป็นเลิศในการเป็นศูนย์กลางความหลากหลายทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ในการพัฒนาเศรษฐกิจชีวภาพ

เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เป็นการใช้ลำดับเบสสายสั้น (400-800 คู่เบส) บริเวณหนึ่งๆ ในจีโนมที่มีลำดับเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดทำให้สามารถใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ เป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยใช้หลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในส่วนของดีเอ็นเอมาตรฐาน (standardized DNA) แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว (Casiraghi et al., 2010) วิธีนี้นอกจากจะใช้ตรวจพิสูจน์และยืนยันการระบุชนิดพืชได้ถูกต้อง และมีความน่าเชื่อถือแล้ว ยังสามารถศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชอีกด้วย ซึ่งดีเอ็นเอของจีโนมคลอโรพลาสต์และนิวเคลียสถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจพิสูจน์และยืนยันการระบุพืชในระดับชนิดหรือแม้แต่มิในระดับต่ำกว่าชนิดจนถึงระดับสายพันธุ์ (Kress and Erickson, 2008; Roger and Bendich, 1987; Ritland et al., 1993; Schaefer and Renner, 2011) สำหรับการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชนั้น นิยมใช้ยีนจากหลายตำแหน่งด้วยกันโดยสามารถคัดเลือกมาใช้ตามความจำเพาะของพืชที่ต้องการศึกษา

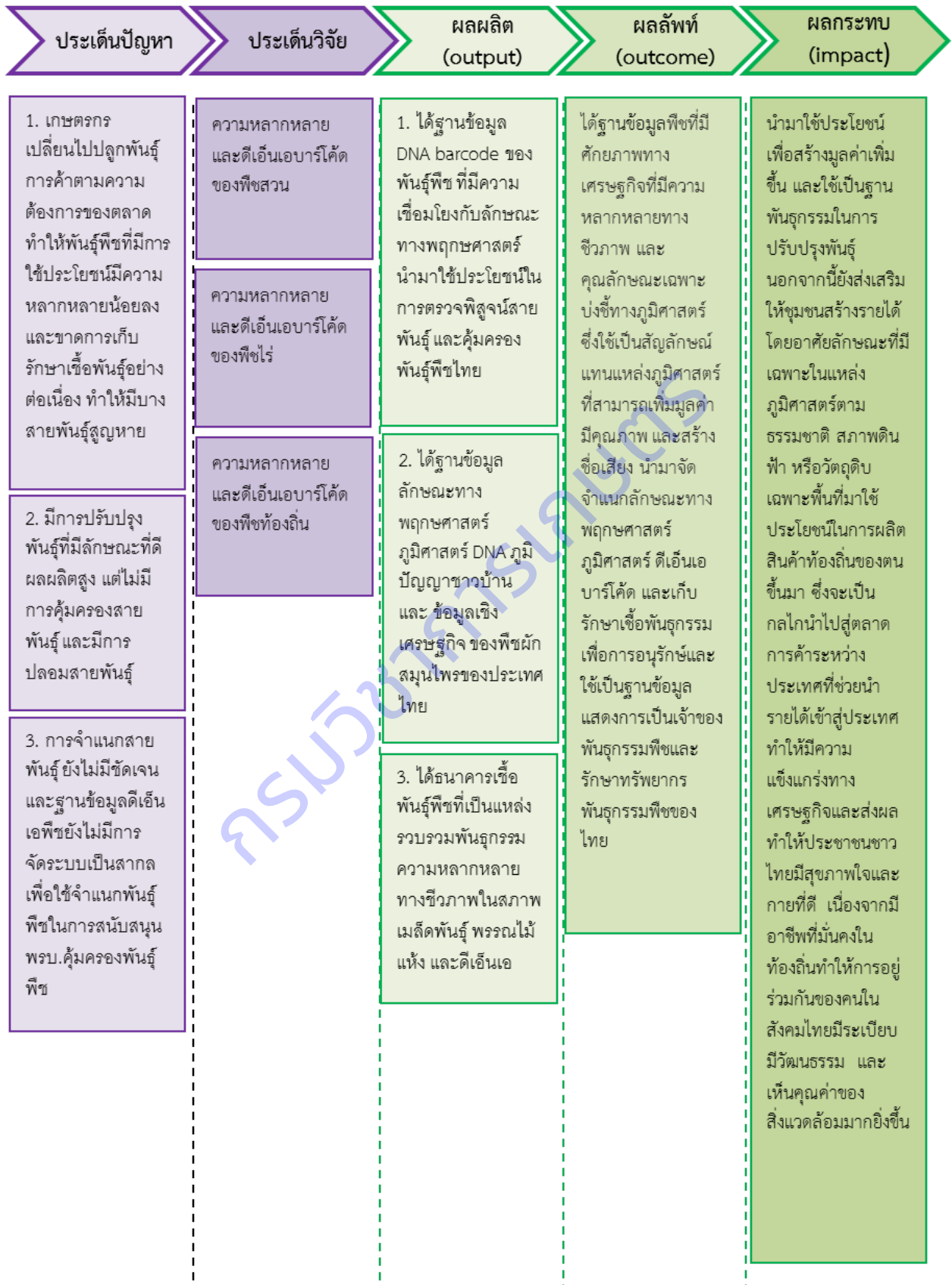
ความหลากหลายของพันธุ์พืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจของไทยมีสูงมาก เมื่อพิจารณาลำดับความสำคัญพบว่า ความหลากหลายของพันธุ์พืชสวนที่ควรมีการศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในอันดับต้นๆ ประกอบด้วยทุเรียน เงาะ บัว กล้ายไม้สมุนไพรร และพริก พันธุ์พืชไร่ ประกอบด้วย มันสำปะหลัง และถั่วเหลือง ส่วนพันธุ์พืชท้องถิ่น ประกอบด้วย พืชวงศ์สิลา (Aquifoliaceae) ปัญจขันธุ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ โครงการวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจจึงได้ดำเนินการโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) สำรวจ รวบรวมความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชสวน พันธุ์พืชไร่ และพันธุ์พืชท้องถิ่นทั้ง 12 พืชข้างต้น; 2) ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์พืชสวน พันธุ์พืชไร่ และพันธุ์พืชท้องถิ่นทั้ง 12 พืช; 3) จัดเก็บเชื้อพันธุกรรมของพันธุ์พืชสวน พันธุ์พืชไร่ และพันธุ์พืชท้องถิ่นทั้ง 12 พืช เพื่ออนุรักษ์และเก็บรักษาในธนาคารเชื้อพันธุพืชในสภาพ เมล็ดพันธุ์ (Seed bank) แปลงปลูก และธนาคารดีเอ็นเอ (DNA bank) และ 4) จัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดและข้อมูลพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัยของพันธุ์พืชสวน พันธุ์พืชไร่ และพันธุ์พืชท้องถิ่นทั้ง 12 พืช

วิธีการวิจัย

จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสวน (ทุเรียน เงาะ บัว พริก กล้วยไม้) พืชไร่ (มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง) และพืชท้องถิ่น (พืชวงศ์สิลา ปัญจขันธุ์ ปลาไหลเผือกหนอนตายหยากและสะตอ) โดยมีการจัดทำตัวอย่างอ้างอิงงานวิจัย (Voucher specimen) เพื่อเก็บรักษาไว้เป็นฐานข้อมูลในรูปแบบพรรณไม้แห้งในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพและตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิงเก็บรักษาไว้ในธนาคารดีเอ็นเอของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะนำยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส มาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาความหลากหลายและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ศึกษาแนวทางการจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ รวมถึงทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะของดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อชนิดหรือสายพันธุ์พืช เพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์การปรับปรุงพันธุ์ และการตรวจสอบพันธุ์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปลงทะเบียนในฐานข้อมูล NCBI เพื่อนำหมายเลข accession มาประกอบในการจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

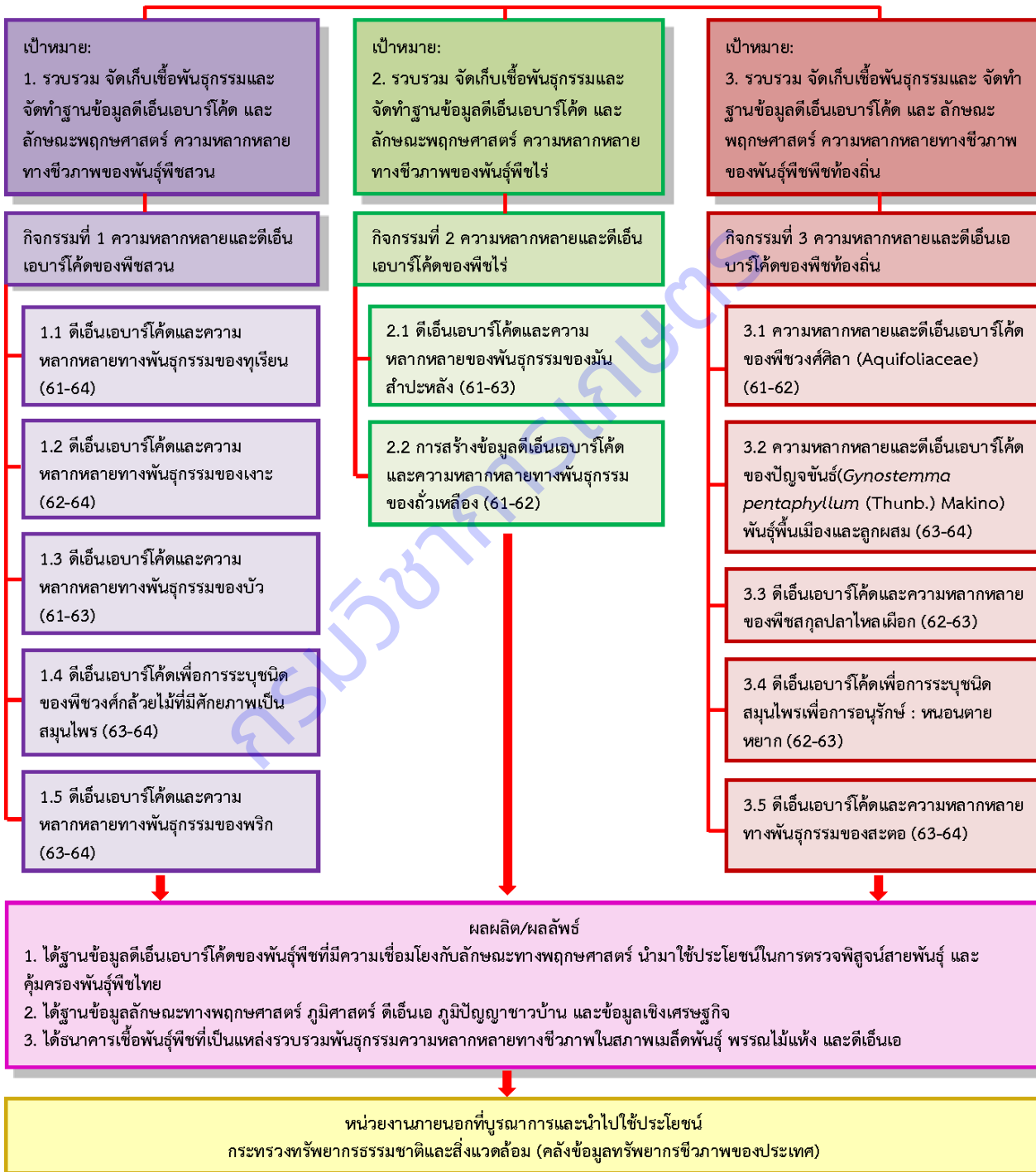
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



ประเด็นปัญหา

1. เกษตรกรเปลี่ยนไปปลูกพันธุ์การค้าตามความต้องการของตลาด ทำให้พันธุ์พืชที่มีการใช้ประโยชน์มีความหลากหลายน้อยลง และขาดการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์อย่างต่อเนื่อง ทำให้มีบางสายพันธุ์สูญหาย
2. มีการปรับปรุงพันธุ์ที่มีลักษณะที่ดี ผลผลิตสูง แต่ไม่มีการคุ้มครองสายพันธุ์ และมีการปลอมสายพันธุ์
3. การจำแนกสายพันธุ์ ยังไม่มีชัดเจน และฐานข้อมูลดีเอ็นเอพืชยังไม่มีการจัดระบบเป็นสากล เพื่อใช้จำแนกพันธุ์พืชในการสนับสนุน พรบ. คุ้มครองพันธุ์พืช

โครงการความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ



บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมพืชสูงระดับต้นๆ ของโลก แต่การจำแนกชนิดหรือพันธุ์ของพืชเหล่านั้นยังไม่ชัดเจน จึงทำให้พันธุ์พืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจของไทยถูกละเลยในการนำมาพัฒนาต่อยอด โครงการวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจได้ดำเนินการในปี พ.ศ. 2561-2564 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและรวบรวมความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชสวน พันธุ์พืชไร่ และพันธุ์พืชท้องถิ่นของไทยและศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์พืช จัดเก็บเชื้อพันธุกรรม และจัดทำฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืช โดยศึกษาในพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ 12 พืช ได้แก่ ทุเรียน เงาะ บัว กล้วยไม้พริก มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง พืชวงศ์สิลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแปลงรวบรวมพันธุ์ของหน่วยงานสังกัดกรมวิชาการเกษตร แปลงปลูกของเกษตรกรและในพื้นที่ป่าทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย และใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีนหลายตำแหน่งบนบริเวณคลอโรพลาสต์และนิวเคลียสเพื่อสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชทั้ง 12 กลุ่มพืช ด้วยวิธี Bayesian inference, Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Neighbor Joining และ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean ผลการศึกษา สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างพันธุกรรมของพืชทั้ง 12 กลุ่มพืช ไว้ในรูปดีเอ็นเออ้างอิงได้จำนวน 578 ตัวอย่าง โดยพบว่า ยีนตำแหน่ง ITS เหมาะสมจะใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกกลุ่มพันธุ์ของพันธุ์พืชได้มากที่สุดถึง 9 กลุ่มพืช รองลงมา คือ *rbcL*, *matK* และ *trnH-psbA* ได้ 7, 6 และ 4 กลุ่มพืชตามลำดับ ส่วน *DuBc04*, *rpoC*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*, *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3* แสดงผลการจำแนกทางพันธุกรรมได้เฉพาะบางพืช ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพันธุ์พืชทั้ง 12 กลุ่มพืช จำนวน 1,663 ข้อมูลนี้ ถือเป็นข้อมูลพันธุกรรมใหม่ของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจของไทยที่ได้บันทึกไว้บนระบบข้อมูลสากลของ NCBI และสามารถสืบค้นข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของพืชเชื่อมโยงไปยังตัวอย่างพรรณไม้แห่งอ้างอิงที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชระดับชาติ จำนวน 516 ตัวอย่าง รวมถึงสามารถทดสอบเชื้อพันธุกรรมเมล็ดของพริกและถั่วเหลืองที่เก็บรวบรวมไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชอีก 143 ตัวอย่าง ซึ่งข้อมูลพันธุ์พืชเหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของพันธุ์ในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์พืชของไทยต่อไป โดยได้บันทึกข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชทั้ง 12 พืชที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ไว้ จำนวน 424 ข้อมูลพืช เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับสนับสนุนการบังคับใช้กฎหมาย การเข้าถึงและการแบ่งปันผลประโยชน์จากการใช้ทรัพยากรพันธุกรรมพืชของประเทศไทยต่อไป

Abstracts

Thailand has a high diversity of plant germplasm in the world. However, the species identification or cultivar/variety classification of those plants are not yet clear. As a result, plant varieties with economic potential in Thailand have been neglected for further development. The “Biodiversity and DNA barcoding of economically efficient crops project” was carried out in

2018-2021. The research aimed to survey and collect horticultural plants, agronomic crops and indigenous plants in Thailand, studying DNA barcodes and the genetic relationship of collected plants, collecting plant germplasm and preparing a database of plant biodiversity and their DNA barcodes. Twelve economically potential plants were studied, namely durian, rambutan, lotus, orchid, chili, cassava, soybean, Aquifoliaceae, jiaogulan, *Eurycoma* spp., *Stemona* spp. and *Parkia speciosa*. The samples were collected from the conservation plots of agencies under the Department of Agriculture, farmer's plot and in areas across all regions of Thailand, then using DNA barcode techniques of multiple genes on the chloroplast and nucleus regions to construct the genetic relationship of each plant using phylogenetic methods of Bayesian inference, Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Neighbor Joining and Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean. The DNA of 578 samples obtained from this study were collected as DNA references. The ITS gene was found to be the best DNA barcode to classify the relationship within each group of 9 plants, followed by *rbcL*, *matK* and *trnH-psbA* at 7, 6 and 4 plants, respectively. The rest of *DuBc04*, *rpoC*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*, *accD*, *petD*, *psbB* and *ycf3* showed genetic classification only in some plants. The nucleotide sequence data of 1,663 samples obtained from this study were recorded on the NCBI database. This information is considered as a new genetic data of Thai economically potential plants. The sequences data submitted to NCBI referred to the botanical information of 516 herbarium specimens registered in the national herbarium. It is also able to test the seed germplasm of 143 peppers and soybeans collected in seed bank. All information are very useful for comparing the differences in plant breeding plan in Thailand. The numbers of 424 biodiversity data of those 12 plant groups obtained from this research provide information to support law enforcement, access and benefit sharing from Thailand's use of plant genetic resources.

กิจกรรมที่ 1

ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสวน

Diversity and DNA Barcode of Horticultural Plants

การทดลองที่ 1.1

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมทุเรียน

DNA Barcode and Genetic Diversity of Durian

ชื่อผู้วิจัย

ธีรวุฒิ ชูตินันทกุล อรุณทัย ชาววา มาลัยพร เชื้อบัณฑิต

Theerawut Chutinanthakun, Aroonothai Sawwa, Malaiphorn Chuebundit,

คำสำคัญ : พันธุกรรมทุเรียน ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ไพรเมอร์มาตรฐาน GBS
Key words : duriangenetics, DNA-barcode, universal primer, GBS

บทคัดย่อ

ทุเรียนเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย และไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกมากที่สุดของโลก ทุเรียนในประเทศไทยที่เป็นพันธุ์การค้าและพันธุ์พื้นเมืองมีความหลากหลาย ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในชนิดของทุเรียนบ้าน (*Durio zibethenus* L) โดยที่ผ่านมา ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีได้ทำการเก็บรวบรวมพันธุ์ทุเรียนจากทั่วประเทศไว้มากกว่า 400 พันธุ์ โดยในการทดลองนี้มุ่งเน้นในการพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อหาความสัมพันธ์ของทุเรียนจากแปลงรวบรวมพันธุ์ที่มีอยู่เดิมจำนวน 169 ตัวอย่าง พบว่า การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานยังไม่สามารถจำแนกความสัมพันธ์ของทุเรียนในชนิดเดียวกันได้อย่างเด่นชัด จึงได้ทำการพัฒนาไพรเมอร์ของทุเรียนโดยเฉพาะจากการใช้เทคนิค GBS จนได้ไพรเมอร์ที่น่าสนใจจำนวน 4 ยีน โดยคัดเลือกไว้ศึกษาจำนวน 1 ยีน คือ DuBc04 เปรียบเทียบกับ ยีนมาตรฐาน ITS2 พบว่า ยีน DuBc04 สามารถแยกความแตกต่างในทุเรียนได้ดีกว่า ITS2 อย่างไรก็ตาม รูปแบบการแยกส่วนใหญ่มองยังไม่สอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มตามลักษณะสัณฐาน ซึ่งมีการจำแนกไว้ 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกบ กลุ่มกำป็น กลุ่มลวง กลุ่มกำนยาว กลุ่มทองย้อย และกลุ่มเบ็ดเตล็ด ทั้งนี้เนื่องจากทุเรียนเป็นพืชผสมข้ามตามธรรมชาติ จึงทำให้เกิดความหลากหลายทั้งทางลักษณะสัณฐานของใบและผลค่อนข้างมาก อีกทั้งการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดแยกความแตกต่างของพืชที่อยู่ในชนิดเดียวกันยังค่อนข้างมีข้อจำกัด ดังนั้นอาจต้องใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมากกว่าหนึ่งบริเวณร่วมกันเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการระบุชนิดพืชต่อไป

Abstracts

Durian is very important tropical fruit in Thailand. Most of commercial and local varieties are in *Durio zibethenus* L. More than 400 clones from over country were collected at the orchard of Chanthuburi Horticultural Research Center. In this study, we would like to clarify the variation of durian about 169 samples using DNA barcode. The results showed not clearly data to classify the differentiation of durian with universal primers of DNA barcode. So, GBS technique was use to modified specific primer in durian. Among 4 modified primers, DuBc04 was chosen to analyzed compare with ITS2 in sample of durian. It was found that, DuBc04 seems to show the genetic relationship better than ITS2. However, the data from the analyzing was not related with the classification of database manual. It is probably from the nature of cross pollination which leading to highly variation and the limitation of DNA barcode under same specie classify. So that, the further study to improve the accuracy with multiple fragments of barcoding or other technique should be considered.

บทนำ (Introduction)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการระบุชนิดหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตภายในเวลาอันรวดเร็ว วิธีการนี้อาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณที่เรียกว่า ดีเอ็นเอมาตรฐาน จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชื่อแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบอาจเป็นบริเวณเดียวหรือ 2-3 บริเวณ แต่ต้องมีความยาวไม่มากและเป็นบริเวณเดียวกับชนิดอื่นๆ ที่ต้องการเปรียบเทียบกัน วิธีการสร้างระบบ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะช่วยระบุชื่อสิ่งมีชีวิตได้จากทุกระยะของการเจริญ รวมถึงสภาพที่เป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กทั้งที่เป็นตัวอย่างสดและตัวอย่างที่ถูกรักษาสภาพไว้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อนักอนุกรมวิธาน และบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความชำนาญทางด้านอนุกรมวิธาน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับศาสตร์สาขาอื่นได้ เช่น การศึกษาทางด้านนิเวศวิทยา นิติวิทยาศาสตร์ และการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ เป็นต้น (วุฒิมงคล, 2554) การจัดทำฐานข้อมูล ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิต หรือ The Barcode of Life Project ได้เริ่มต้นขึ้นในปี ค.ศ. 2003 (Hebert et al., 2003) และได้รับการสนับสนุนต่อเนื่องจากหน่วยงานที่เกิดขึ้นจากความร่วมมือจากนานาชาติได้แก่ Consortium for the Barcode of Life (CBOL) ซึ่งปัจจุบันประกอบด้วยสมาชิกจาก 43 ประเทศ

(http://www.barcoding.si.edu/CBLMembers_details.htm) การตรวจข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์และดีเอ็นเอในนิวเคลียสไรโบโซมมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกพืชกันมากในปัจจุบัน เนื่องจาก ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (Chloroplast DNA; cpDNA) เป็นดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวงแหวน มีบริเวณอนุรักษ์สูงในเรื่องของขนาดและโครงสร้าง ประกอบด้วยยีน 130 ยีน มีขนาดของยีนตั้งแต่ 72 ถึง 220 kb (Palmer et al., 1992; Sugiura et al., 1998) การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (Palmer and Stein, 1986; Petit et al., 1998) การแปรผันทางพันธุกรรมในรูปแบบการแทนที่คู่เบส (base-pair substitution) มีอัตราในระดับกลางถึงต่ำ (Cleeg and Zurawski, 1992) ทำให้สามารถนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชได้ ยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ เช่น *maturaseK (matK)*, *trnH-psbA intergenic spacer*, *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)* *atpF-atpH spacer*, *rpoB*, *rpoC1* และ *psbK-psbI spacer* (CBOL., 2009) เป็นต้น ส่วนดีเอ็นเอในนิวเคลียสไรโบโซม (nuclear ribosomal DNA; nr DNA) เป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดรวมทั้งพืช ประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 หน่วยได้แก่ 18S 5.8S และ 25S ซึ่งแต่ละหน่วยมีบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เรียกว่า non-coding sequence หรือ Internal transcribed spacer region (ITS) ได้แก่ ITS1 ตั้งอยู่ระหว่างยีน 18S และ 5.8S และ ITS2 ตั้งอยู่ระหว่าง 5.8S และ 25S ซึ่งมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าดีเอ็นเอในบริเวณอื่นๆ ของ nr DNA ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ (Roger and Bendich, 1987; Rittland et al., 1993)

กรมวิชาการเกษตรได้รวบรวมพันธุ์ทุเรียนไว้มากกว่า 400 พันธุ์ ในศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี ที่ผ่านมามีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกพันธุ์พืชอย่างแพร่หลาย เช่นมีการใช้เครื่องมือในการศึกษาพันธุกรรมของไม้ผลเช่น ทุเรียน ที่มีการใช้ ไมโครแซทเทลไลท์ หรือ SSR (Simple Sequence Repeat) ซึ่งเป็นลำดับเบสที่ซ้ำกันเรียงกันอย่างต่อเนื่องที่ตำแหน่งหนึ่งในจีโนม แต่ละชุดประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำสั้นๆ ไม่เกิน 10 คู่เบส (สุรินทร์, 2552) โดยไพรเมอร์ของเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อจำแนกทุเรียนได้ผลดีคือ ไพรเมอร์ MS1AAC-19 (ปิยรัชฎ์ และคณะ, 2552) หรือการจำแนกทุเรียนพันธุ์การค้า 4 พันธุ์ (หมอนทอง ชะนี พวงมณี และหลังลับแล) เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากแหล่งพันธุ์ต่างๆ โดยการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่ามีความสอดคล้องกับรูปแบบการขยายพันธุ์ ที่มาจากแหล่ง

ต่างกัน (เตือนใจ และ ปิยะศักดิ์, 2556) แต่ยังไม่มีการศึกษาการจำแนกโดยใช้ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ทั้งในทุเรียน โดยวิธีการนั้นนอกจากจะสามารถชี้เฉพาะลักษณะของสายพันธุ์พืชได้ ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการอนุรักษ์ การใช้เป็นข้อมูลแสดงความเป็นเจ้าของพันธุ์กรรม ตลอดจนการรักษาทรัพยากรพันธุ์กรรมพืชของไทย เพื่อนำไปปรับใช้ขยายผลต่อยอดในแขนงต่างๆ ได้อย่างกว้างขวางต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

สร้างข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของทุเรียน และจัดเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กรรม เพื่ออนุรักษ์เก็บรักษาในธนาคารเชื้อพันธุ์กรรมพืช และธนาคารดีเอ็นเอ จากแปลงรวบรวมพันธุ์ที่มีอยู่เดิม

ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณคลอโรพลาสต์และ nuclear ribosomal international transcribed spacer (ITS) ในทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองจากแต่ละกลุ่มพันธุ์ ที่เก็บรวบรวมไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากใบมาสกัดดีเอ็นเอ บางส่วนของดีเอ็นเอจะเก็บไว้เพื่อเป็นดีเอ็นเอต้นทุน (stock DNA) อีกส่วนนำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และนำมาศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจสอบความถูกต้องโดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลสากล หรือฐานข้อมูลดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นทำการประเมินคุณภาพลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยวิเคราะห์ร่วมกับการระบุชนิดของพันธุ์ทุเรียน แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้และมีความถูกต้องไว้ในฐานข้อมูลสากลต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

- สิ่งที่ใช้ในการทดลอง
 - 1. ทุเรียน จำนวน 169 ตัวอย่าง
 - 2. ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป
 - 3. เครื่อง Spectrophotometer
 - 4. เครื่อง Electrophoresis
 - 5. เครื่อง PCR
 - 6. เครื่องปั่นเหวี่ยง
 - 7. สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจแยกด้วยเจล Electrophoresis
 - 8. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เช่น เครื่องแก้ว อ่างและตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นต้น
 - 9. อุปกรณ์ในการบันทึกข้อมูลและประมวลผล เช่น เครื่องคอมพิวเตอร์ ปริ้นเตอร์ และแบบบันทึกข้อมูล เป็นต้น
- แบบและวิธีการทดลอง
กรรมวิธี :-
- วิธีปฏิบัติการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การเก็บตัวอย่างทุเรียนและการเก็บตัวอย่างอ้างอิง

การเก็บตัวอย่างสำหรับการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะเก็บตัวอย่างใบทุเรียนจากแปลงรวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์ทุเรียนที่ สถาบันวิจัยพืชสวน ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี ซึ่งมีการบันทึกลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และลักษณะทางการเกษตรไว้แล้ว และจัดทำพรรณไม้แห้ง ส่งเก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK) สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 2 การสกัดดีเอ็นเอของทุเรียน

1. เก็บตัวอย่างใบอ่อนของสายพันธุ์ทุเรียน ที่ปลูกภายในศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จำนวน 169 ตัวอย่าง เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

2. สกัดดีเอ็นเอจากใบ ใช้ตัวอย่าง 2 กรัม น้ำหนักสด บดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารบับเฟอร์ 5 มิลลิลิตร (สารบับเฟอร์ ได้แก่ 2X CTAB : 2-Mercaptoethanol ในอัตราส่วน 1: 2 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน เทใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำการเขย่าทุกๆ 10 นาที เมื่อครบกำหนดนำสารละลายมาเติม Chloroform : Iso-Amyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 10 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายใสด้านบนนำมาใส่หลอดใหม่ ปริมาณ 3 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc ลงไป 300 ไมโครลิตร นำไปตกตะกอนโดยการเติมด้วย Isopropanol 1.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเอียงหลอดไปมาอย่างช้าๆ นำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายมาเทใส่ที่ใส่ทิ้งโดยให้เหลือตะกอนไว้ที่ด้านล่างหลอด ล้างตะกอนโดยการเติมเอทานอล 70% ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำน้ำใส่มาเททิ้ง ทำซ้ำ 2 รอบ ปล่อยให้ตะกอนแห้ง หลังจากนั้นนำตะกอนมาละลายด้วย TE:RNase 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที นำ DNA ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

3. สกัดดีเอ็นเอ โดยผ่านชุด Kit นำ DNA ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารบับเฟอร์ LP1 ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และเติม RNaseA ปริมาณ 6 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารบับเฟอร์ LP2 ปริมาณ 130 ไมโครลิตร นำไปเขย่า แล้วนำมาเติมสารบับเฟอร์ LP3 ปริมาณ 750 ไมโครลิตร นำไปเขย่า หลังจากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน Spin Column CB3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง จากนั้นล้างดีเอ็นเอที่จับอยู่ด้านบนซิลิการครั้งที่ 1 ด้วย Washing Buffer PW1 จำนวน 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายด้านล่าง ทำซ้ำ 2 รอบ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ เป็นเวลา 2 นาที เพื่อทำให้คอลัมน์แห้ง ทำการชะ (elute) เอาจีโนมิกดีเอ็นเอออกโดยนำ Column CB3 มาวางบนหลอดไมโครเซนติพิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม Buffer TE ปริมาณ 60 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ นาน 2 นาที นำ DNA ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

ขั้นตอนที่ 3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) และประเมินประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดในทุเรียน

1. นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ rbcL, matK และ ITS (รวมถึง DuBC04 จากการใช้เทคนิค GBS ในปี 3-4) โดยนำดีเอ็นเอทุเรียนที่สกัดได้ปริมาณ 4 ไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณเฉพาะส่วนที่สนใจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ความเข้มข้น 2 ไมโครลิตร 10x Taq buffer dNTP mix ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล และเอนไซม์ Taq polymerase ความเข้มข้น 0.6 ไมโครลิตร การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำด้วยเครื่อง DNA thermal cycle ด้วยระดับอุณหภูมิดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 pre-denature 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 denature	94 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing	55 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 extension	72 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที (ซ้ำ 35 รอบ)
ขั้นตอนที่ 5 final-extension	72 องศาเซลเซียส	นาน 7 นาที

2. ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี Electrophoresis ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

3. สกัดผลผลิต PCR ที่ต้องการและทำให้บริสุทธิ์ โดยการ ชั่ง Agarose 1.2 กรัม เติม 1X TBE 100 มิลลิตร คนให้ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน เทส่วนผสมทั้งหมดลงในถาด แล้ววางหวีให้ทางส่วนบน ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวดี ประมาณ 30 นาที จึงถอดหวีออก และนำเจลที่อยู่ในถาดไปวางบน เครื่อง Electrophoresis เทสารละลาย 1X TBE Buffer ลงในเครื่องจนท่วมแผ่นเจล ในการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับ run gel โดยใช้ SafeGreen Loading Dye 8 ไมโครลิตร และสารละลายดีเอ็นเอ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นใส่สารละลายดีเอ็นเอ 108 ไมโครลิตร และ DNA Marker 3 ไมโครลิตร ลงบนเจล แล้วเปิดเครื่อง Electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์ นาน 30 นาที แล้วตัดเจลตรงส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติมน้ำ PN Buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนเจลละลายหมด หลังจากเตรียมคอลัมน์ เติมน้ำ BL Buffer 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ นาน 1 นาที แล้วเทน้ำใส่ทิ้ง เพื่อเป็นการล้างคอลัมน์ แล้วนำของเหลวที่ได้ที่ใส่ในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ นาน 1 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยการเติมน้ำ PW Buffer 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นระยะเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำคอลัมน์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นระยะเวลา 2 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย EB Buffer 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ แล้วนำคอลัมน์ย้ายลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที จะได้ดีเอ็นเอที่พร้อมนำไปใช้วิเคราะห์หาลำดับเบส ในขั้นตอนต่อไป

4. ส่งผลผลิตดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยยีนที่สนใจ ไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using ABI BigDye terminator chemistry หรือเครื่อง MegaBACE 1000 automated sequencer (AmershamBioscience) using DYEnamic™ ET Dye Terminators chemistry)

5. ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส โดยใช้โปรแกรม BioEdit Version 7.2.5 หรือ GENTle Version 1.9.4

6. นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blast ซึ่งอยู่ภายใต้ฐานข้อมูลของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อตรวจสอบความปนเปื้อนของดีเอ็นเอ

7. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยวิธีการ Alignment ด้วยโปรแกรม BioEdit Version 7.2.5 หรือ GENTle Version 1.9.4

8. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ กับฐานข้อมูลดีเอ็นเอของทุเรียนที่มีการระบุชื่อถูกต้องแล้วใน NCBI ด้วยโปรแกรม Blast N เพื่อวิเคราะห์การระบุชนิดของพืชด้วยเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงของลำดับเบส

9. เก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุเรียนแต่ละสายพันธุ์ไว้ในฐานข้อมูล การบันทึกข้อมูลบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางอนุกรมวิธาน ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS บันทึกตำแหน่งที่มีความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ เก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล

- ระยะเวลาดำเนินการ 4 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2560 ถึง 30 กันยายน 2564

- สถานที่ดำเนินการ

1. จ.จันทบุรี แปลงรวบรวมพันธุ์ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจังหวัดจันทบุรี และศูนย์วิจัยพัฒนาไม้ผลเศรษฐกิจภาคตะวันออก(ห้วยสะพานหิน)
2. จ.จันทบุรี ห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
3. จ.ปทุมธานี ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Results and Discussion)

ความหลากหลายของทุเรียนได้มีการจัดฐานข้อมูลเชื้อพันธุกรรมพืชทุเรียน ของสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร(มปป.) โดยการจำแนกออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกบ กลุ่มกำป็น กลุ่มलगง กลุ่มกำนยาว กลุ่มทองย้อย และกลุ่มเบ็ดเตล็ด ซึ่งมีรายละเอียดคือ

1 กลุ่มกบ มีลักษณะรูปร่างใบ (leaf shape) เป็นแบบ ovate-oblong ลักษณะปลายใบ (leaf apex) เป็นแบบ acuminate-curve ลักษณะฐานใบ (leaf base) เป็นแบบ rounded-obtuse ลักษณะทรงผล จะกระจายอยู่ใน 3 ลักษณะคือ กลม (rounded) กลมรี (oval) กลมแบน (oblate) มีรูปร่างของหนามผล (fruit spine shape) มีลักษณะโค้งงอ (hooked) เช่น กบตาขำ กบสาวน้อย กบเล็บเหยี่ยว เป็นต้น

2 กลุ่มกำป็น มีลักษณะรูปร่างใบ (leaf shape) ยาวเรียว (linear-oblong) ลักษณะปลายใบ (leaf apex) เรียวแหลม (caudate-acuminate) ลักษณะฐานใบ (leaf base) แหลม (acute) ลักษณะทรงผล ทรงขอบขนาน (oblong) มีรูปร่างหนามผล (fruit spine shape) แหลมตรง (pointed) เช่น กำป็นตาเพล กำป็นพวง เป็นต้น

3 กลุ่มलगง มีลักษณะรูปร่างใบ (leaf shape) รูปไข่ขอบขนาน ovate-oblong ลักษณะปลายใบ (leaf apex) เป็นแบบแหลมเรียว (acuminate-acute) ลักษณะฐานใบ (leaf base) แหลม (acute) และมน (obtuse) ลักษณะทรงผลจะกระจายอยู่ใน 2 ลักษณะคือ ทรงกระบอก (cylindroidal) และ รูปรี (elliptic) ลักษณะหนามผลเว้า (concave) เช่น ชะนีกำนยาว ย่ามะหวาด लगงทอง เป็นต้น

4 กลุ่มกำนยาว มีลักษณะรูปร่างใบ (leaf shape) ป้อมปลายใบ (obovate-lanceolate) ลักษณะปลายใบ (leaf apex) เรียวแหลม (acuminate) ลักษณะฐานใบ (leaf base) เรียว (cuneate-acute) ลักษณะทรงผล รูปไข่กลับ (obovate) และรูปกลม (rounded) มีรูปร่างหนามผล (fruit spine shape) นูน (convex) เช่น กำนยาวสีนาค ชมพูพาน ต้นใหญ่ เป็นต้น

5. กลุ่มทองย้อย มีลักษณะรูปร่างใบ (leaf shape) ป้อมปลายใบ (obovate-lanceolate) ลักษณะปลายใบ (leaf apex) เรียวแหลม (acuminate) ลักษณะฐานใบ (leaf base) มน (obtuse) ลักษณะทรงผล รูปไข่ (ovate) มีรูปร่างหนามผล (fruit spine shape) นูนปลายแหลม (pointed-convex) เช่น ฉัตรสีทอง นกหยิบ เป็นต้น

6. กลุ่มเบ็ดเตล็ด ทุเรียนที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีลักษณะไม่แน่ชัด อาจเหมือนกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งใน 5 กลุ่มแรก เช่น รูปร่างใบ (leaf shape) มีลักษณะป้อมกลางใบ (elliptical) หรือรูปไข่ขอบขนาน (oval-oblong) ลักษณะปลายใบ (leaf apex) แหลมเรียว (acuminate-acute) หรือ cuspidate-acuminate ลักษณะฐานใบ (leaf base) แหลม (acute) หรือมน (obtuse) ลักษณะทรงผลกระจาย 3 ลักษณะ คือ กลมแบน (oblate) กลมรี (oval) และ ทรงกระบอก (cylindroidal) หนามผล (fruit spine shape) มีลักษณะ เว้าปลายแหลม (pointed-concave) หรือนูนปลายแหลม (pointed-convex) เช่น กระดุมสีนาค ขุนทอง ทูลถวาย เนื้อเหลือง เป็นต้น

ในการทดลองนี้ได้เก็บตัวอย่างพันธุ์ทุเรียนจำนวน 169 ตัวอย่าง ที่มีการเก็บรวบรวมไว้ของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จำนวน 3 พื้นที่ ประกอบด้วย แปลงรวบรวมพันธุ์ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจังหวัดจันทบุรี และศูนย์วิจัยพัฒนาไม้ผลเศรษฐกิจภาคตะวันออก(ห้วยสะพานหิน)
 ตารางที่ 1.1.1รายชื่อพันธุ์ทุเรียนทั้งหมดที่เก็บตัวอย่างในปี 2561 - 2564

ลำดับ	พันธุ์	กลุ่ม
1	กบตาขำ	กบ
2	กบสาวน้อย	กบ
3	กบเล็บเหยี่ยว	กบ
4	กบเจ้าคุณ	กบ
5	กบชายน้ำ	กบ
6	กบตาหุ้ม	กบ
7	กบพิกกุล	กบ
8	กบแม่เฒ่า	กบ
9	กบวัดกล้วย	กบ
10	กบหลังวิหาร	กบ
11	กบดำ	กบ
12	กบตาเหมย	กบ
13	กบหัวสิงห์	กบ
14	กบทองเพ็ง	กบ
15	กบหน้าศาล	กบ
16	กบรัศมี	กบ
17	กบทองคำ	กบ
18	กบพวง	กบ
19	กบทองเพ็ง	กบ
20	กบตาไห	กบ
21	กบมังกร	กบ
22	กบสีนวล	กบ
23	กบสุวรรณ	กบ
24	กำปันทาเพล	กำปัน
25	กำปันทอง	กำปัน
26	ลุงเกตุ	กำปัน
27	กำปันบางสีทอง	กำปัน
28	กำปันเหลือง	กำปัน
29	ชายมะไฟ	กำปัน
30	ปันทอง	กำปัน
31	กำปันดำ	กำปัน

ลำดับ	พันธุ์	กลุ่ม
34	ชะนีก้านยาว	ลวง
35	ย่ามะหวาด	ลวง
36	ลวงทอง	ลวง
37	ชมพู่ศรี	ลวง
38	ชะนี	ลวง
39	ก้านยาวสีนาค	ก้านยาว
40	ชมพู่พาน	ก้านยาว
41	ต้นใหญ่	ก้านยาว
42	ทองสุก	ก้านยาว
43	ก้านยาว	ก้านยาว
44	ฉัตรสีทอง	ทองย่อย
45	ทองย่อยฉัตร	ทองย่อย
46	นกหยิบ	ทองย่อย
47	ทองย่อยเดิม	ทองย่อย
48	นมสวรรค์	ทองย่อย
49	ธรณีไหว	ทองย่อย
50	กระดุมสีนาค	เบ็ดเตล็ด
51	ขุนทอง	เบ็ดเตล็ด
52	ทุลฉวย	เบ็ดเตล็ด
53	เนื้อเหลือง	เบ็ดเตล็ด
54	อิงอน	เบ็ดเตล็ด
55	มะนาว	เบ็ดเตล็ด
56	ทองหยิบ	เบ็ดเตล็ด
57	ตะพานน้ำ	เบ็ดเตล็ด
58	ไฉ่จวงยาว	เบ็ดเตล็ด
59	อีหนัก	เบ็ดเตล็ด
60	ไอ้เม่น	เบ็ดเตล็ด
61	กระเทยเนื้อขาว	เบ็ดเตล็ด
62	เมล็ดคชสาร	เบ็ดเตล็ด
63	ชายมังกร	เบ็ดเตล็ด
64	แดงรัศมี	เบ็ดเตล็ด

ลำดับ	พันธุ์	กลุ่ม
32	กำป็นแดง	กำป็น
33	หมอนทอง	กำป็น

ลำดับ	พันธุ์	กลุ่ม
65	กระเทียมเนื้อแดง	เบ็ดเตล็ด
66	จอกลอย	เบ็ดเตล็ด

ตารางที่ 1.1.1 รายชื่อพันธุ์ทุเรียนทั้งหมดที่เก็บตัวอย่างในปี 2561 – 2564 (ต่อ)

ลำดับ	พันธุ์	กลุ่ม
67	ฝอยทอง	เบ็ดเตล็ด
68	พวงมณี	เบ็ดเตล็ด
69	เม็ดในยายปราง	เบ็ดเตล็ด
70	ยินดี	เบ็ดเตล็ด
71	ไอ้ใหม่	เบ็ดเตล็ด
72	สีทอง	เบ็ดเตล็ด
73	สาวชมเห็ด	เบ็ดเตล็ด
74	สาวชมฟ้าทอง	เบ็ดเตล็ด
75	เจ้าเงาะ	เบ็ดเตล็ด
76	เมล็ดลับแล	เบ็ดเตล็ด
77	อีลิป	เบ็ดเตล็ด
78	เมล็ดสม	เบ็ดเตล็ด
79	กระดุมทอง	เบ็ดเตล็ด
80	เมล็ดอารีย์	เบ็ดเตล็ด
81	กระปุกทองดี	เบ็ดเตล็ด
82	เมล็ดเผียน	เบ็ดเตล็ด
83	เมล็ดพงษ์พันธุ์	เบ็ดเตล็ด
84	ทองก้อน	เบ็ดเตล็ด
85	แหลมทราย	เบ็ดเตล็ด
86	จระเข้	เบ็ดเตล็ด
87	ลำเจียก	เบ็ดเตล็ด
88	การะเกด	เบ็ดเตล็ด
89	ห้าลูกไม่ถึงผิว	เบ็ดเตล็ด
90	สาธิตา	เบ็ดเตล็ด
91	ดาวกระจาย	เบ็ดเตล็ด
92	สาเก	เบ็ดเตล็ด
93	จันทบุรี 1	ลูกผสม
94	จันทบุรี 2	ลูกผสม
95	จันทบุรี 3	ลูกผสม
96	จันทบุรี 4	ลูกผสม

ลำดับ	พันธุ์	กลุ่ม
100	จันทบุรี 8	ลูกผสม
101	จันทบุรี 9	ลูกผสม
102	จันทบุรี 10	ลูกผสม
103	ข้าวติด	<i>D. Graveolens</i> Becc.
104	ชาเรียน	<i>D. mansoni</i> Bakh.
105	ทุเรียนนก	<i>D. griffithii</i> Bakh.
106	สาวหนู	-*
107	เจ้าที่	-
108	นาคราช	-
109	ไอ้ไฟ	-
110	กล้วย	-
111	หัวควน	-
112	นที	-
113	พายุ	-
114	สมหมาย	-
115	มาสะนะวาและ 1	-
116	มาสะนะวาและ 3	-
117	สแปอิงซอรี 2	-
118	นิแซนิเนาะ 1	-
119	สแปอิงซอรี 3	-
120	สว่าง	-
121	หอยโข่ง	-
122	จิว	-
123	สมบัติ 1	-
124	ไอ้ใจ	-
125	ทองพูล	-
126	คอกแพะ	-
127	นิพนธ์	-
128	คูรีลาเนาะ	-
129	หัวช้าง	-

ลำดับ	พันธุ์	กลุ่ม
97	จันทร์บุรี 5	ลูกผสม
98	จันทร์บุรี 6	ลูกผสม
99	จันทร์บุรี 7	ลูกผสม

ลำดับ	พันธุ์	กลุ่ม
130	ปาตะตาแย	-
131	ลูกเขียว	-
132	เคียวหวาน	-

ตารางที่ 1.1.1 รายชื่อพันธุ์ทุเรียนทั้งหมดที่เก็บตัวอย่างในปี 2561 – 2564 (ต่อ)

ลำดับ	พันธุ์	กลุ่ม
133	ต้นไม้ไผ่	-
134	คูรีคอปพะ	-
135	มานะ 1	-
136	ฟักทองแดง	-
137	ซู้	-
138	สีต้นหยง	-
139	চার্ট 2	-
140	ดำ 1	-
141	ดำ 3	-
142	ดำ 4	-
143	ดำ 6	-
144	ดำ 8	-
145	ดำ 9	-
146	ดำ 10	-
147	ดำ 11	-
148	ดำ 12	-
149	ดำ 14	-
150	ดำ 15	-
151	แดง 5	-

ลำดับ	พันธุ์	กลุ่ม
152	แดง 7	-
153	চার্ট 4	-
154	চার্ট 5	-
155	চার্ট 6	-
156	চার্ট 7	-
157	เจิม 5	-
158	วาไซ	-
159	มณูญ พรหมประสิทธิ์	-
160	ยาโก้ 1	-
161	เจริญแก้วขาว	-
162	เปาะมาแอ	-
163	วันทนา	-
164	ดี 3	-
165	วิชาญ 1	-
166	เชียร์	-
167	ส้มโอ	-
168	นอบ 1	-
169	จุฑามาศ 1	-

หมายเหตุ - = ยังไม่ได้จัดกลุ่ม

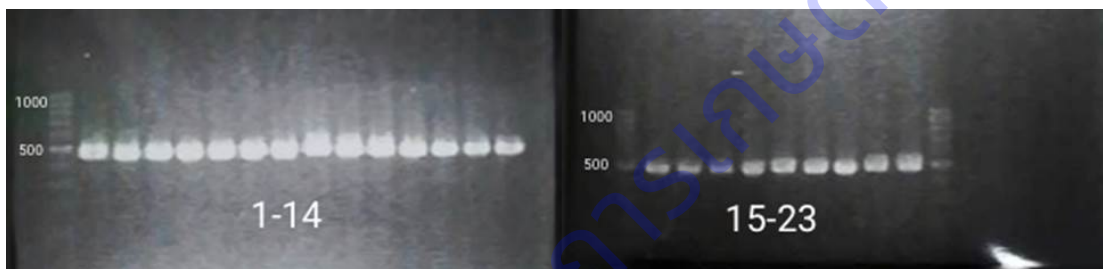
การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานสำหรับทุเรียน

ในการดำเนินการทดลอง ได้เริ่มทำการศึกษาโดยใช้ไพรเมอร์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐาน เพื่อหาความสัมพันธ์ของตัวอย่างพันธุ์ทุเรียน ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ประกอบด้วยยีน *rbcL* *matK* *rpo* และ ITS (ตารางที่ 1.1.2)

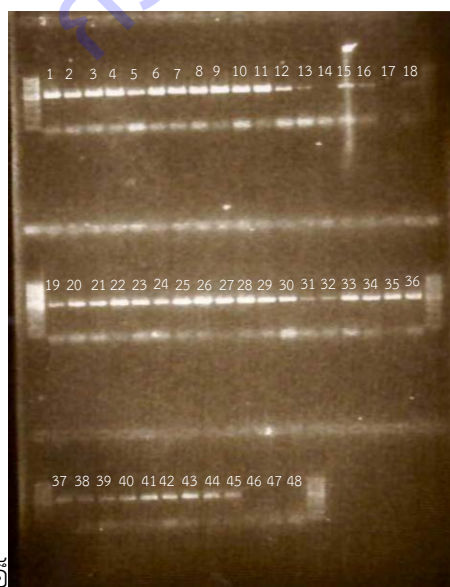
ตารางที่ 1.1.2 ไพรเมอร์มาตรฐานและลำดับเบสของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ทดสอบในทุเรียน

Locus	Name of primer	Gene Primer (5'-3')	References
<i>rbcL</i>	<i>rbcL_F</i>	ATGTCACCAACAGAACTAAAGC	Petersen and

			Seberg, 2003
	rbcL_R	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	Erickson, unpubl
<i>matK</i>	matK_1_F	ATCCATATGGAAATCTTGGTTC	
	matK_1_R	GTTCTAGCACACGAAAGTCG	
	1RKIM-F	CCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	
	3FKIM-R	GTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	
<i>rpoC</i>	rpoC_F	GGCAAAGAAGGAAGATTTTCG	
	rpoC_R	TGAGAAAACATAAGTAAACGAGC	
<i>ITS1</i>	ITS-u1	GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG	
	ITS-p5	CCTTATCAYTTAGAGGAAGGAG	
<i>ITS2</i>	ITS2-S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	
	ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

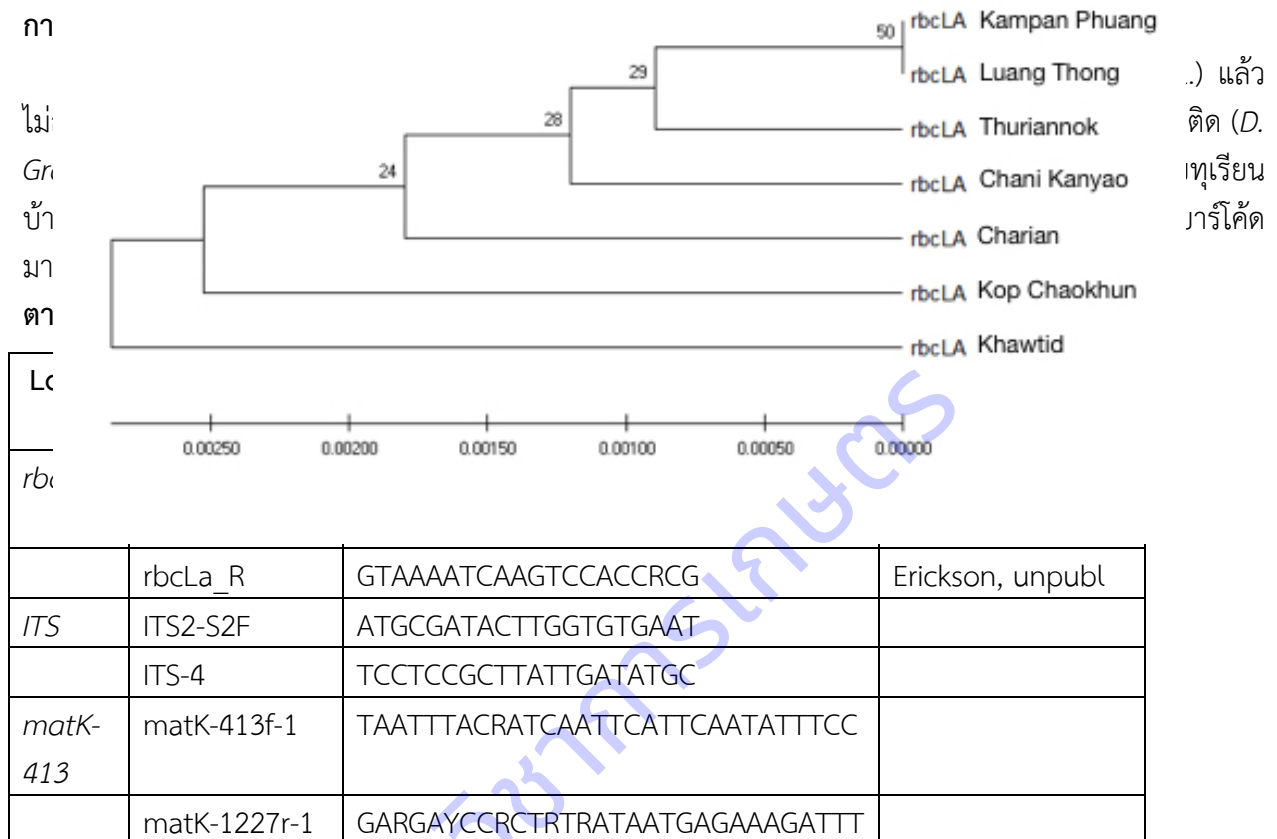


ภาพที่ 1.1.1 ดีเอ็นเอที่สกัดจากทุเรียนจำนวน 23 พันธุ์ แล้วทำการเพิ่มปริมาณด้วยยีน rpo (1=จันทบุรี 1, 2=จันทบุรี 2, 3=จันทบุรี 3, 4=จันทบุรี 4, 5=จันทบุรี 5, 6=จันทบุรี 6, 7=จันทบุรี 7, 8=จันทบุรี 8, 9=จันทบุรี 9, 10=จันทบุรี 10, 11=ชะนี, 12=กระดุมทอง, 13=นกหยิบ, 14=กบสุวรรณ, 15=กำนยาว, 16=หมอนทอง, 17=กระดุมสีนาค, 18=ขุนทอง, 19=กำปิ่นแดง, 20=เนื้อเหลือง, 21=ทุลถวาย, 22=อีงอน, 23=กบตาเหมย)



ภาพที่ 1.1.2 แล็บดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณและการใช้ไพรเมอร์ของยีน MatK

ในส่วนของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอของทุเรียนทั้ง 51 พันธุ์ ด้วยวิธี CTAB และใช้ชุด kit อีกครั้งเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สะอาดขึ้น ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย โปรแกรมของ 5 ยีน ประกอบด้วย rbcL matK rpo ITS1 และ ITS2 ยังไม่พบความแตกต่างแต่ละพันธุ์ของทุเรียน ทั้งนี้เนื่องจากทุเรียนที่ใช้เป็นทุเรียนที่อยู่ใน *Durio zibethinus* ทั้งหมด และโปรแกรมมาตรฐานที่ใช้ยังไม่เหมาะสมกับทุเรียน



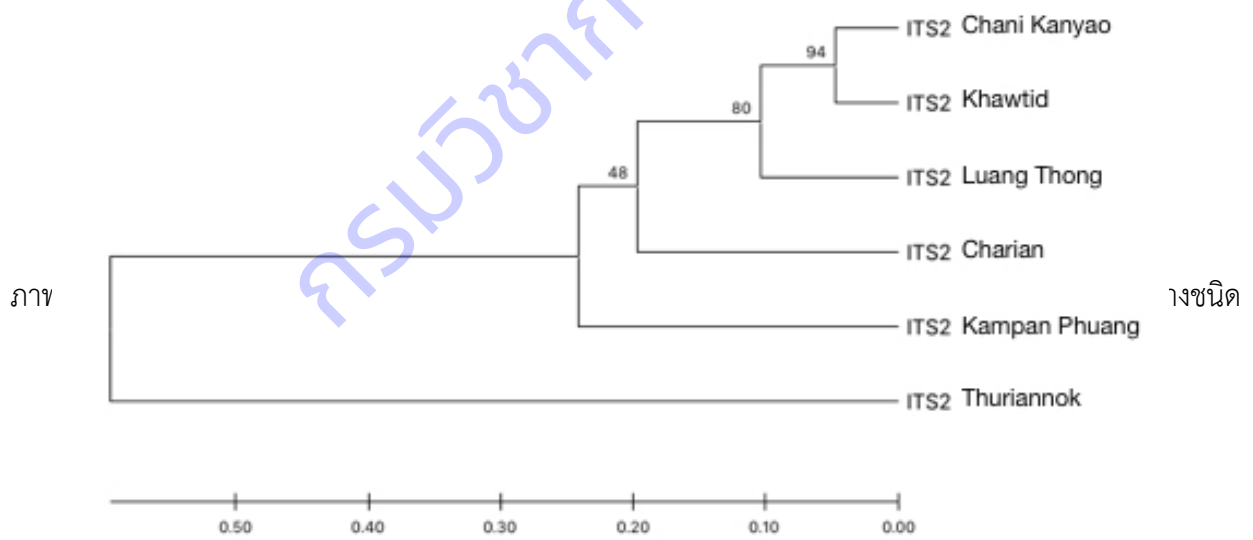
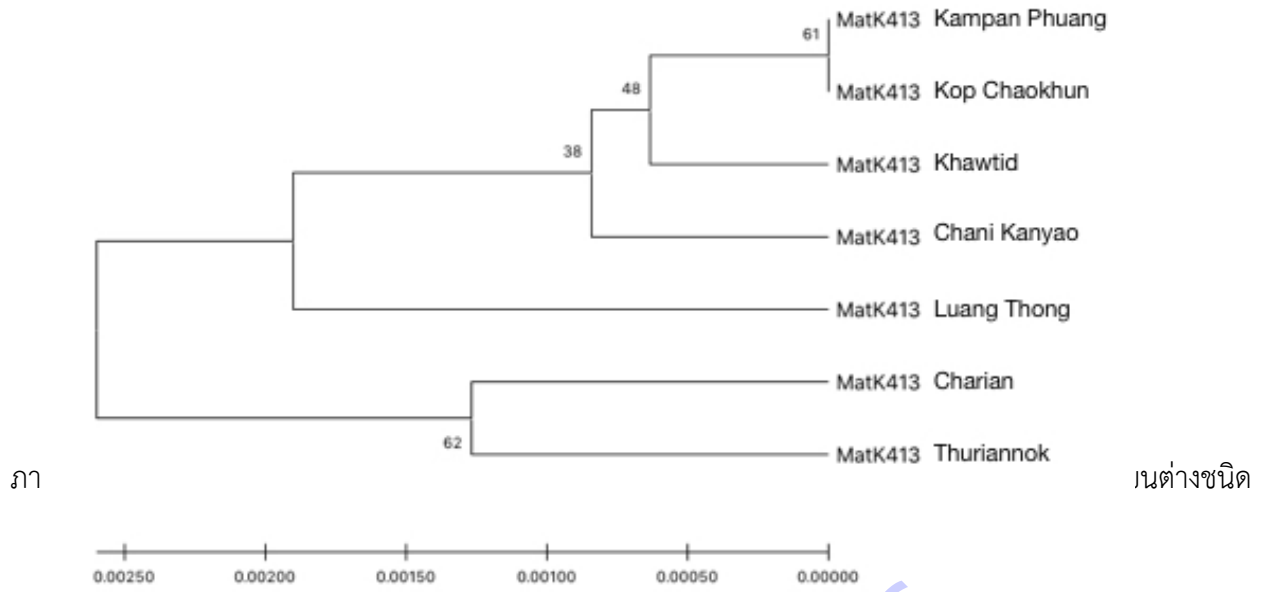
ผลผลิตของ PCR ได้ทำการส่งไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการของ First BASE (Apical Scientific Sdn Bhd, Malaysia) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 สามารถจัดกลุ่มตาม บาร์โค้ดของยีนมาตรฐานจำนวน 3 ยีน ดังนี้

1) ยีนมาตรฐาน rbcLA มีการแยกทุเรียนชั่วคราวออกนอกกลุ่ม โดยในกลุ่มใหญ่พบว่า กำปันทองและหลวงทองมีความใกล้ชิดกัน ถัดมาคือ ทุเรียนนก ชะนีก้านยาว ชาเรียน และ กบเจ้าคุณ

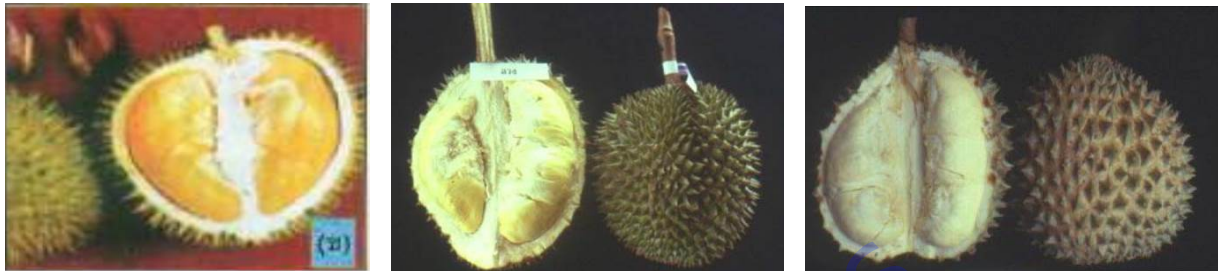
2) ยีนมาตรฐาน ITS2 มีการแยก ทุเรียนนก ออกนอกกลุ่ม โดยในกลุ่มใหญ่พบว่าทุเรียนชั่วคราวมีความใกล้ชิดกับชะนีก้านยาว ถัดมาคือหลวงทอง ชาเรียน และ กำปันทอง ตามลำดับ

3) ยีนมาตรฐาน matK413 แยกความแตกต่างได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มของชาเรียนและทุเรียนนก ส่วนอีก 5 พันธุ์อยู่ในกลุ่มใหญ่เดียวกัน โดยทุเรียนชั่วคราว ค่อนข้างใกล้ชิดกับ กำปันทอง และ กบเจ้าคุณ

จากการหาความสัมพันธ์ด้วยยีนมาตรฐานจำนวน 3 ยีน พบว่า มีเฉพาะ matK-413 ที่มีการแยกทุเรียนต่างชนิดคือ ชาเรียน และ ทุเรียนนก ออกจากกลุ่ม ทุเรียนพันธุ์อื่น ทั้งนี้ถ้าดูจากลักษณะสัญญาณพบว่า ชาเรียนและทุเรียนนก เป็นทุเรียนที่มีดอกสีแดง ผลมีขนาดเล็ก มีเนื้อน้อยแทบไม่มีส่วนที่บริโภคได้ เมื่อเปรียบเทียบกับทุเรียนพันธุ์อื่นๆ รวมถึงทุเรียนชั่วคราว ที่ดอกส่วนใหญ่มีสีขาวครีม ผลมีขนาดใหญ่มีเนื้อให้บริโภคได้ ในขณะที่ยีน rbcLA และ ITS2 ยังไม่มีการแยกทุเรียนต่างชนิด ออกมาอย่างชัดเจน



ภาพที่ 1.1.5 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีน matK413 ในการเป็น DNA barcode ของทุเรียนต่างชนิด



ทุเรียนข้าวตอก

लगवठठठ

ชะนีกำงยว



กำป้บพวง



กบเจ้าคุณ

ภาพที่ 1.1.6

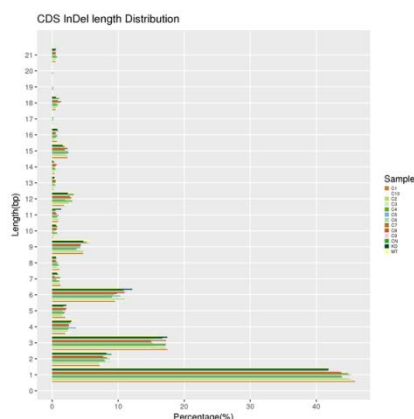
लगवठठठ ชะนีกำงยว กำป้บพวง กบเจ้าคุณ

การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยใช้เทคนิค GBS

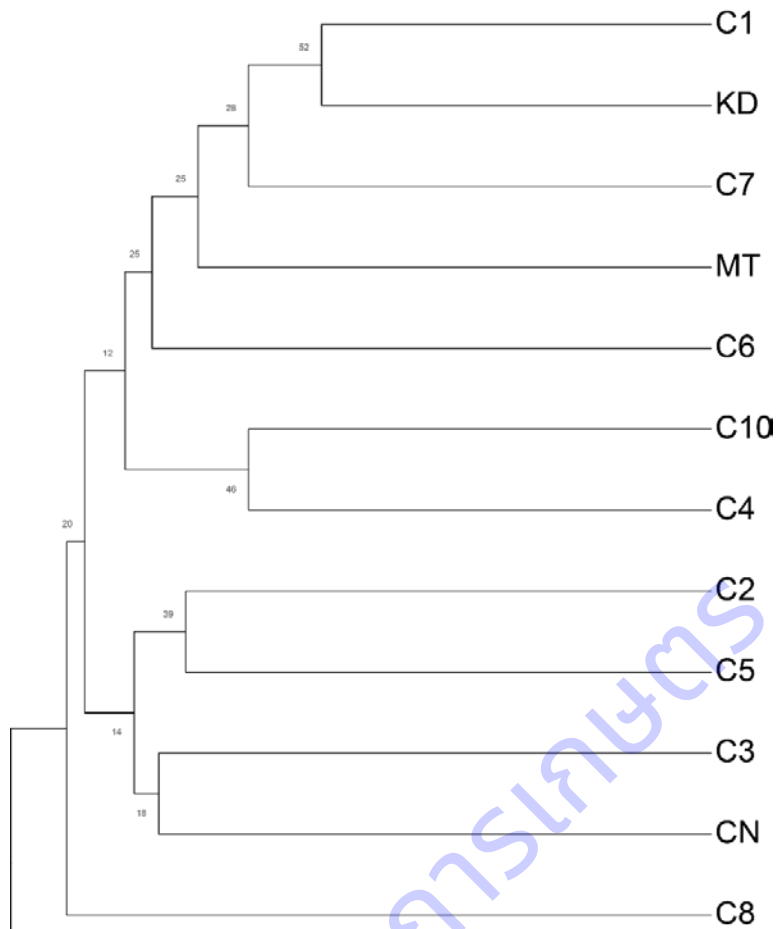
จากการใช้ไพรมอร์มาตรฐานของดีเอ็นเอบาร์โค้ดหลายยีน แต่พบว่ายังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของทุเรียนภายในชนิดเดียวกันได้อย่างชัดเจน จึงทำการพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ด จากการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ GBS โดยใช้ตัวอย่างทุเรียนจำนวน 14 พันธุ์ ได้แก่ หมอนทอง ชะนี กระดุมทอง ก้านยาว และ จันทบุรี 1-10 อย่างไรก็ตามเมื่อทำการส่งวิเคราะห์พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้เพียง 13 ตัวอย่าง จากผลการวิเคราะห์ พบจำนวนตำแหน่ง SNP ของทุเรียนทั้ง 13 พันธุ์ มีค่าอยู่ระหว่าง 568,790 ถึง 978,535 และ InDel มีค่าระหว่าง 31,551-54,088 (ตารางที่ 1.1.4) โดยมี ขนาดของตำแหน่ง InDel ที่พบในส่วนของ Coding sequence ดังรายละเอียดในภาพที่ 1.1.7

ตารางที่ 1.1.4 ตำแหน่ง SNP และ InDel ที่พบในทุเรียน 13 พันธุ์ (C1=จันทบุรี 1, C2=จันทบุรี 2, C3=จันทบุรี 3, C4=จันทบุรี 4, C5=จันทบุรี 5, C6=จันทบุรี 6, C7=จันทบุรี 7, C8=จันทบุรี 8, C9=จันทบุรี 9, C10=จันทบุรี 10, KD=กระดุมทอง, MT=หมอนทอง, CN=ชะนี)

Sample	Total SNP	Total Ins/del
C4	978,535	54,088
C6	760,093	41,975
CN	765,747	42,703
C1	733,372	40,600
KD	568,790	31,551
C2	768,010	45,580
C3	793,896	41,801
C10	674,224	38,668
C5	695,838	38,170
C8	772,607	45,178
C9	688,210	40,906
MT	669,081	37,189
C7	777,532	44,981



ภาพที่ 1.1.7 ขนาดของตำแหน่ง InDel ที่พบในส่วนของ Coding sequence











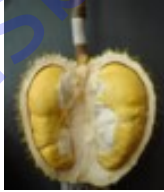




ภาพที่ 1.1.8 แผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเทคนิค GBS จากการวิเคราะห์ทุเรียน จำนวน 13 พันธุ์ (C1=จันทบุรี 1, C2=จันทบุรี 2, C3=จันทบุรี 3, C4=จันทบุรี 4, C5=จันทบุรี 5, C6=จันทบุรี 6, C7=จันทบุรี 7, C8=จันทบุรี 8, C9=จันทบุรี 9, C10=จันทบุรี 10, KD=กระดุมทอง, MT=หม่อนทอง, CN=ชะนี)

ตารางที่ 1.1.5 ค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากเทคนิค GBS จากการวิเคราะห์ทุเรียน จำนวน 13 พันธุ์

	C1	C10	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	CN	KD	MT
C1													
C10	68												
C2	65	66											
C3	55	70	66										
C4	48	51	71	59									
C5	69	64	58	59	63								
C6	59	75	74	68	70	75							
C7	47	71	77	75	66	76	65						
C8	63	65	67	75	74	72	77	74					
C9	72	72	82	76	80	83	79	66	78				
CN	72	61	65	61	68	65	79	82	69	88			
KD	43	55	64	64	60	71	58	55	69	72	70		

MT	60	63	66	72	71	75	65	54	78	80	65	56	
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	--

ตารางที่ 1.1.6 ลักษณะของทุเรียน จำนวน 13 พันธุ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ GBS

พันธุ์	ลักษณะ		พันธุ์	ลักษณะ	
จันทบุรี 1 (C1)	ชะนีxหมอนทอง อายุเก็บเกี่ยวสั้น ผลกลม		จันทบุรี 8 (C8)	ชะนีxหมอนทอง อายุเก็บเกี่ยวกลาง ผลกลม	
จันทบุรี 2 (C2)	ชะนีxพวงมณี อายุเก็บเกี่ยวสั้น ผลทรงรี		จันทบุรี 9 (C9)	ชะนีxหมอนทอง อายุเก็บเกี่ยวยาว ผลทรงรี	
จันทบุรี 3 (C3)	ก้านยาวxชะนี อายุเก็บเกี่ยวสั้น ผลกลม		จันทบุรี 10 (C10)	ชะนีxนกหยิบ อายุเก็บเกี่ยวสั้น ผลทรงรี	
จันทบุรี 4 (C4)	ก้านยาวxหมอนทอง อายุเก็บเกี่ยวกลาง ผลกลมรี		ชะนี (CN)	กลุ่มลวง อายุเก็บเกี่ยวกลาง ผลกลมรี	
จันทบุรี 5 (C5)	ก้านยาว OP อายุเก็บเกี่ยวสั้น ผลกลม		กระดุมทอง (KD)	กลุ่มเบ็ดเตล็ด อายุเก็บเกี่ยวสั้น ผลกลมแป้น	
จันทบุรี 6 (C6)	ก้านยาวxหมอนทอง อายุเก็บเกี่ยวกลาง ผลกลมแป้น		หมอนทอง (MT)	กลุ่มกำป่น อายุเก็บเกี่ยวกลาง ผลทรงขอบขนาน	
จันทบุรี 7 (C7)	ก้านยาวxชะนี อายุเก็บเกี่ยวสั้น ผลกลมรี				

--	--

จากแผนภูมิความสัมพันธ์ของทุเรียนทั้ง 13 พันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วย GBS พบว่า พันธุ์จันทบุรี 9 อยู่นอกกลุ่ม ซึ่งลักษณะที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นคือ เป็นพันธุ์ที่มีอายุเก็บเกี่ยวนานคือ 137-139 วันหลังดอกบาน ส่วนพันธุ์อื่นๆ มีอายุเก็บเกี่ยวสั้น และปานกลางคือ มีอายุเก็บเกี่ยวในช่วง 87-120 วันหลังดอกบาน ซึ่งในส่วนของกลุ่มใหญ่ 12 พันธุ์ มีการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยแรกประกอบด้วย จันทบุรี1 กระจุดทอง จันทบุรี7 หมอนทอง จันทบุรี6 จันทบุรี10 และจันทบุรี4 โดยพบว่า จันทบุรี1 มีความใกล้ชิดกับ กระจุดทอง มากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจาก ลักษณะผลมีรูปร่างกลมและอายุเก็บเกี่ยวสั้น และจันทบุรี4 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับจันทบุรี10 มากที่สุด สำหรับ ในกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย จันทบุรี2 จันทบุรี3 จันทบุรี5 และชะนี โดยพบว่า จันทบุรี2 และจันทบุรี5 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และจันทบุรี3 ใกล้ชิดกับชะนี (ภาพที่ 1.1.8)

จากค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากเทคนิค GBS ของทั้ง 13 พันธุ์ พบว่า

- 1) จันทบุรี1 มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี9 และชะนีมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากทั้งจันทบุรี1 และ จันทบุรี9 มีแม่เป็นชะนีเหมือนกัน
- 2) จันทบุรี2 มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี9 อาจเนื่องจากทั้งสองพันธุ์นอกจากมีแม่เป็นชะนี ยังมีรูปร่างผลกลมรีเหมือนกัน
- 3) จันทบุรี3 มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี7 และจันทบุรี8 อาจเนื่องมาจากจันทบุรี3 และจันทบุรี7 มีแม่และพ่อเป็น ก้านยาวชะนี เหมือนกัน ส่วนจันทบุรี8 มีแม่เป็นชะนีและผลออกทรงกลมคล้ายจันทบุรี3
- 4) จันทบุรี4 มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี9 มากที่สุด อาจเนื่องจากมีพ่อเป็น หมอนทอง เหมือนกัน และผลออกทรงรี
- 5) จันทบุรี5 มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี9 มากที่สุด
- 6) จันทบุรี6 มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี9 และชะนี มากที่สุด
- 7) จันทบุรี7 มีดัชนีความเหมือนกับชะนี มากที่สุด เนื่องจากจันทบุรี7 มีพ่อเป็นชะนี และทรงผลกลมรีเหมือนชะนี
- 8) จันทบุรี8 มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี9 และหมอนทอง เนื่องจากจันทบุรี8 และจันทบุรี9 มาจากพ่อแม่เหมือนกัน คือมีพ่อเป็นหมอนทอง
- 9) จันทบุรี9 มีดัชนีความเหมือนกับชะนีมากที่สุด เนื่องจากชะนีเป็นแม่ของจันทบุรี9
- 10) จันทบุรี 10 มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี6 มากที่สุด
- 11) ชะนี มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี9 มากที่สุด เนื่องจากชะนีเป็นแม่ของจันทบุรี9
- 12) กระจุดทอง มีดัชนีความเหมือนกับ จันทบุรี9 มากที่สุด
- 13) หมอนทอง มีดัชนีความเหมือนกับ จันทบุรี9 มากที่สุด เนื่องจากหมอนทองเป็นพ่อของจันทบุรี9

จะเห็นได้ว่า จันทบุรี9 มีดัชนีความเหมือนกับพันธุ์อื่นๆ มากที่สุด แต่ในบางพันธุ์ยังไม่พบความสัมพันธ์ที่ชัดเจน เช่น กับจันทบุรี5

จากผลการวิเคราะห์ GBS จึงได้ทำการพัฒนาเพื่อสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยมีชิ้นส่วนนิวเคลียร์จีโนมที่น่าสนใจ จำนวน 4 ชิ้น ซึ่งได้จำนวนไพรเมอร์จำนวน 4 ยีน ดังนี้

ดีเอ็นเอชิ้นที่ 1

Durio zibethinus cultivar Musang King isolate D1 unplaced genomic scaffold, Duzib1.0 scaffold_10, whole genome shotgun sequence
NCBI Reference Sequence: NW_019167827.1

ใช้นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 100,750 -101,665 มีจำนวนนิวคลีโอไทด์กลายที่ให้ความแตกต่าง (SNPs Polymorphism) จำนวน30 ตำแหน่ง จากทุเรียน 13 พันธุ์

**TGAGCAACTACAAATCAAGTCATATTAACCAACATATGATTTTGTAAAGTAAATTTTTATATAAGGAA
TCATCCATGGTGTAAAGTTACTGTTTGGACATTCTAATGCATTACAAAATGAAATATTGCAGGTGAAGCAGAT
GAGGGAGGAGTACAAGAAGCTTGATAAGGCAGAGATGGGAATATGGGAATGTTGTGAACCTCTGAATGAGG
TTGTTGATGACAGTGATCCTGATTTGGACGAACCTCAAATTCAGCATTGCTGCAGAGCGCTGAAGCAATCA
GAAGAGACTATCCTAATGAAGACTGGTTGTACCTGACTGCTCTTATTCATGGTAAAAATAAAAACCCCTTAC
AATATTCTTTCTTTGCCTTGTTATCTTGTAATGATAAAATTACAATAATTAACCTTATTGAGTTTCAATGCTTTT
CAGATCTTGGAAAAATCCTGGTTCTTCCAAAATTTGGAGAGCTACCTCAATGGGCTGTTGTTGGTAAGTATT
TGTTTCAAAAATAAAAATAAAAAGTTCCATATTTCTCATATAATTTAAGTGACAAGTTAATTTCAATAT
AACAGGTGACACATTCCAGTTGGATGTGCTTTTGATGAGTCCAATGTTTCATCATGTTTTTAAATCTTA
GCTTTGATCTTTAATCATTTACCAATTAACATAATTGTGTTATATATACGATCTTAACTCAAGATGAATT
TGCAATTCACAAATTCTGTGCTGCAGTATTTTAATGATAATCCTGACTTCAACAATCCAATTTACAACACCAA
AAATGGGATTTACTCTGAAGGGTGTGGACTAGATAATGTGCTCATGTGCATGGGGGCACGATGACTATATGTA
CATGGTATACATTTGACTCGATCAATCAATCAATCCCTCCAAACTAAAGTCA**

ไพรเมอร์ที่ได้

DuBC1_F: 5' TGA GCA ACA CTA CAA ATC AAG TCA T 3'

DuBC1_R: 5' AAT CAA TCC CTC CAA ACT AAA GTC A 3'

ดีเอ็นเอชิ้นที่ 2

Durio zibethinus cultivar Musang King isolate D1 unplaced genomic scaffold, Duzib1.0 scaffold_10, whole genome shotgun sequence
NCBI Reference Sequence: NW_019167827.1

ใช้นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 138,606 -139,305 มีจำนวนนิวคลีโอไทด์กลายที่ให้ความแตกต่าง (SNPs Polymorphism) จำนวน35 ตำแหน่ง จากทุเรียน 13 พันธุ์

**CTTAAGTCATCCTTTGATCTTCTATTACATTGAGAATTGTCTCAATAAAAATTTTCGTAAACATTATTTCGC
TATGTGCATCAAATCAAGGTTATGGCATAATAAATTATATTCCTAATAAGGTAACCTCAAAAAAGATACTTCTT
TTTTCCACAACCTCAAACCTCATTGGGGTCATCTACTTTATCATCCTCTTCATCACTTTGAATATCAAGATCAC
CAACTTCAGTACGAGTATACCAACTTGCGTAAATAAAGGCCAAACACCTTCAAAGATGTCCCCCACTCTTT
TTCTTGATTGAGTCATTTTTTTATAAGTGAAATTAATATCTTTTAACTTTGACAAGATATTAACCCACTAAA
AGGTAAAGCCAATCTCTTTAACTTTTTAGTTCCATTAAAAAGATATTTTTGGAATCTAAATCGATGATTATCA**

TCTAACCATCGATGATGTCCCATATAACAGAACTTCCTACCATTAGGTAACCACGTCGAACATATCTATGTA
GCACAATATGGACAAGCATAATGACCTTTTTGACTCCAATCAGATAAATTCATATAAGCAAAAAAATCATTGA
TAGTCTATAATAAAGCAGCATGCATATTGAAGTTTTTTTTTTTTATGTATCATAGGTCTCAACTCCTTCCCATA
ATTGCTTTAACTCTTTAATAAGAGGTTGTAAGTTGATGTCTATATCA

ไพรเมอร์ที่ได้

DuBC2_F: 5' CTT AAG TCA TCC TTT GAT CTT CTA T 3'

DuBC2_R: 5'TGA TAT AGA CAT CAA CTT ACA ACC T 3'

ดีเอ็นเอชิ้นที่ 3

Durio zibethinus cultivar Musang King isolate D1 unplaced genomic scaffold, Duzib1.0
scaffold_10, whole genome shotgun sequence

NCBI Reference Sequence: NW_019167827.1

ใช้นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 186,161 -186,658 มีจำนวนนิวคลีโอไทด์กลายที่ให้ความแตกต่าง (SNPs
Polymorphism) จำนวน 23 ตำแหน่ง จากทุเรียน 13 พันธุ์

**TAAGCAGAGGCTCAACGACTTTGAGAAACATAAAACAAAGCTCCTCTAATTAGAGGCTCAACGACTTTGGA
AAAATAAATAGCTCCTCTAATTAGAGGCTCAACGACTTTAAAAAGTAAATGGCTCCTCTAATCAGAGGCTCA
ACGACTTTGGAAAAATAAATGGCTCCTCTAATCAGAGGCTCAACAACCTTTGAAAATAACTAAAGCTCCTCTA
ATCAGAGGCTCAATGACTTTTTGGAAAGTAAATGGCTCCTCTAATCAGAGGCTCAACGACTTTTGAAAAGTAA
ATTGCTCCTTTAAATAGAGGCACCATAACTTTGAAAAGTAAATTGCTCCTCTAAACAGAGGCACCTCAACTT
TTGAAAAGTAAATTGCTCCTCTAAATAGAGGCACCACAACCTTTGAAAATAAATTACTCCTCTAAACAGAGG
CACCACGACTTTGAAAAGTAAATTGCTCATTGACAATCATGTCCAAAGGAGTTATAGATCATGATTGA**

ไพรเมอร์ที่ได้

DuBC3_F: 5' TAA GCA GAG GCT CAA CGA CTT TGA G 3'

DuBC3_R: 5' TCA ATC ATG ATC TAT AAC TCC TTT G3'

ดีเอ็นเอชิ้นที่ 4

Durio zibethinus cultivar Musang King isolate D1 unplaced genomic scaffold, Duzib1.0
scaffold_10, whole genome shotgun sequence

NCBI Reference Sequence: NW_019167827.1

ใช้นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 188,877 -189,587 มีจำนวนนิวคลีโอไทด์กลายที่ให้ความแตกต่าง (SNPs
Polymorphism) จำนวน 38 ตำแหน่ง จากทุเรียน 13 พันธุ์

CTCTTTCCATCTTTGAGACCTTTTGTGTATTTTAAAAAATTGTCCCCAGTGTAGAAGGTGATCCTTGG
TTGGGGTTCTTCAGAAAAAGAAATCATAATAGGCTCAAATGGGTAATAATAAATGGTTTTTCGAATGGTAAA
AGAAAGATGGCCATTTTTTCATCTCAATTGTGAATACCTTTCTTGAACATCATCTATTGAACAAAGCTCATGAA
CCTGTATAAAAGATTGCACATCTTCAAGATATATCTATTTACCTCTGGTAACAGCTTACTTTTTTGTCTCAA
TCATCTCATCATATTATCGTGGATGAGTTCTCAAAATTAATCTCAGAATTATTGTTATCATTGTCTAAATAT
TCATCATCTAAAATTTGAGAATGGGAATGTAAATTTATGAAAGGTAACAGAGCATGGAGTAATGGTCGAGTG
AAAGAGAAAATGTAATGAAATGCATTAACCTTGCCTTTATTAATGATAACAAGTGAAGTCATATTGCAAAAA
GAAATCTAACATTACTCGAAAAGAAATCCTAAAATGACAAAAAACCTTCAACCAGCCTTATCTCCATTCTTC
AAAATTGTCCCCTTATGTGATCAGGTGAAGAATCTCTATTGACATCTTACCCCTCAATTCATTGTGACTTTCC
GGACCCTTTCTAACCAATGTGTTCTTGATTGTCACTCAAAGTACTAACATCAAGTGTTG

ไพรเมอร์ที่ได้

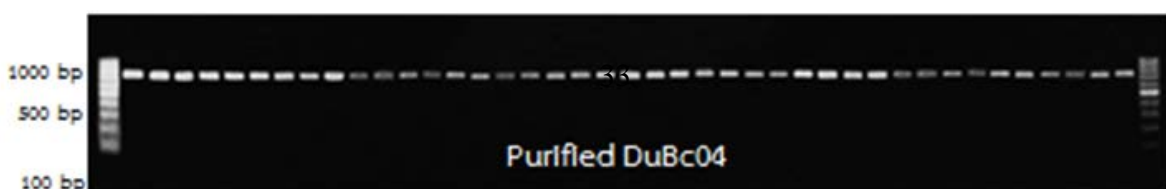
DuBC4_F: 5' CTC TTT CCA TCT TTG AGA CCT TTT G 3'

DuBC4_R: 5' CAA CAC TTG ATG TTA GTA CTT TGA G3'

จากการพัฒนาจากการใช้เทคนิค GBS ซึ่งได้ไพรเมอร์จำนวน 4 ไพรเมอร์ พบว่ายีน DuBc04 มีศักยภาพดีกว่ายีนอื่น จึงได้ทำการทดสอบความเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในทุเรียน ร่วมกับไพรเมอร์มาตรฐาน ITS2-S2F ซึ่งผลผลิตของพีซีอาร์ของทุเรียนที่ทำให้บริสุทธิ์ ของทั้งสองยีน มีรายละเอียดดังภาพที่ 1.1.9 และ 1.1.10 โดยผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยสร้างแผนผังพันธุกรรมด้วยวิธี ML (Maximum Likelihood) ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ ซึ่งการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน DuBc04 สามารถแยกความแตกต่างได้มากกว่า การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน ITS2-S2F (ภาพที่ 1.1.11 และ 1.1.12) จะเห็นได้จากการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน DuBc04 บางส่วนมีการจัดกลุ่มตัวอย่างทุเรียนที่ใกล้ชิดกันภายในกลุ่มเดียวกันได้ เช่น กบตาไห้ และกบขายน้ำ ซึ่งอยู่ในกลุ่มกบ หรือ ฉัตรสีทองและทองย้อยเดิมซึ่งอยู่ในกลุ่มทองย้อย หรือ ฟักทองแดงและกระดุมทองซึ่งอยู่ในกลุ่มเบ็ดเตล็ด นอกจากนี้ยังมีการจัดกลุ่มใกล้ชิดของทุเรียนต่างกลุ่ม เช่น ขายมั่งคุดที่อยู่ในกลุ่มเบ็ดเตล็ดและกบรัศมีกลุ่มกบ หรือ สาวชมฟักทองกลุ่มเบ็ดเตล็ดและกำปันดำกลุ่มกำปัน รวมถึงความสัมพันธ์ของกลุ่มเช่น จัดกลุ่มอีลีบและสีทองซึ่งอยู่กลุ่มเบ็ดเตล็ดอาจมีความสัมพันธ์กับกบสีนวล ที่อยู่ในกลุ่มกบ เป็นต้น ในขณะที่การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน ITS2-S2F มีรายละเอียดการจัดกลุ่มน้อยกว่า

นอกจากนี้การทำ alignment ด้วย ClustalW ของโปรแกรม MEGAx แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอประเภทเดียวกัน (transition mutation) และการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอต่างชนิดกัน (transversion mutation) (ภาพที่ 1.1.13 และ 1.1.14)

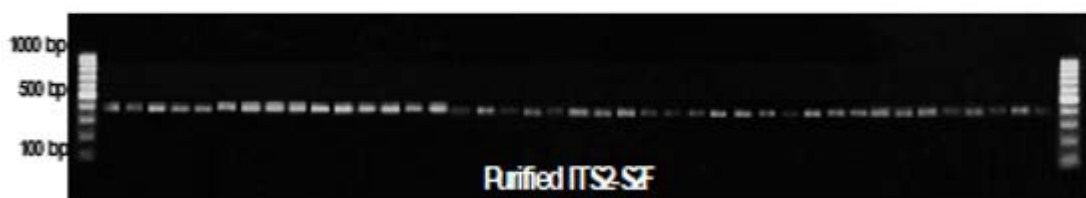
จะเห็นได้ว่า การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน DuBc04 สามารถเป็นแนวทางในการหาความสัมพันธ์ทุเรียนที่อยู่ในกลุ่มเบ็ดเตล็ดซึ่งยากต่อการจัดกลุ่มและเป็นทุเรียนส่วนใหญ่ กับทุเรียนที่มีการจำแนกกลุ่มแล้วบางส่วนได้ ตลอดจนอาจพัฒนาเป็นแนวทางในการพิจารณาพันธุ์ที่เป็นพันธุ์เดียวกัน แต่ที่มีชื่อต่างกันจากการตั้งชื่อของผู้ปลูก เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด ด้วยยีน DuBc04 ยังไม่สามารถจำแนกความสัมพันธ์ได้อย่างชัดเจนถูกต้องตามที่ได้มีการจัดกลุ่มตามลักษณะสัญญาณ ทั้งนี้เนื่องจากทุเรียนเป็นพืชผสมข้ามตามธรรมชาติ จึงทำให้เกิดความหลากหลายทั้งทางลักษณะสัญญาณของใบและผลค่อนข้างมาก อีกทั้งการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดแยกความแตกต่างของพืชที่อยู่ในชนิดเดียวกันยังค่อนข้างมีข้อจำกัด ดังนั้นอาจต้องใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมากกว่าหนึ่งบริเวณร่วมกันเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการระบุชนิดพืชต่อไป



ภาพที่ 1.1.9 ผลผลิตของพีซีอาร์ของทุเรียน 120 ตัวอย่าง ที่ทำให้บริสุทธิ์ ก่อนทำการส่งวิเคราะห์จากการใช้ไพรเมอร์ของยีน DuBc04



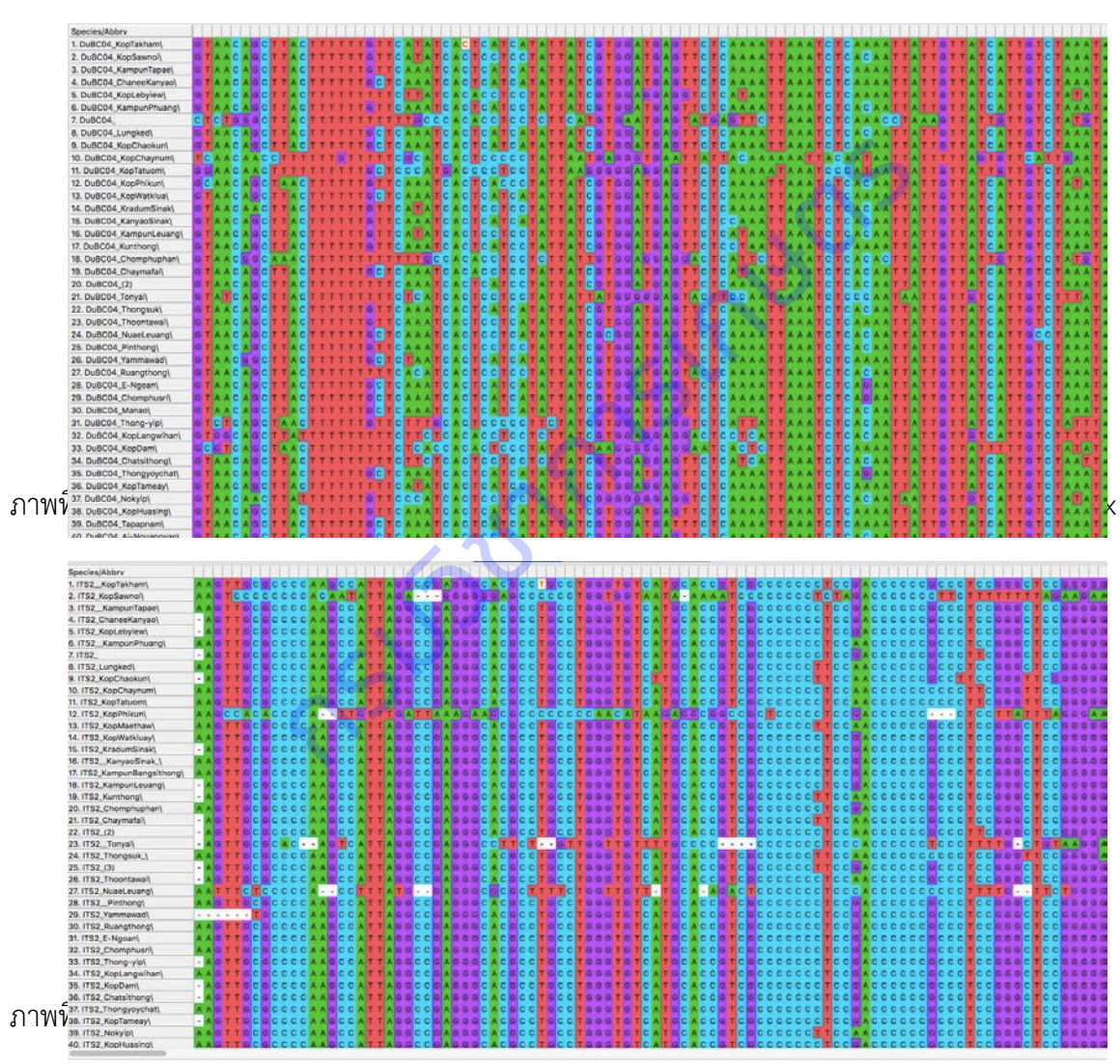
No. 1 - 41



No. 42 - 82



ภาพที่ 1.1.12 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างทุเรียน จำนวน 150 ตัวอย่าง จากยีน *ITS2* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ



สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์มาตรฐานกับตัวอย่างทุเรียนซึ่งส่วนใหญ่เป็นทุเรียนบ้าน (*Durio zibethinus* L) ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ แต่สามารถแยกความแตกต่างของทุเรียนต่างชนิดได้ คือ การใช้ไพรเมอร์ของยีน *matK-413* มีการแยกทุเรียนต่างชนิดคือ ชาเรียน (*D. mansoni* Bakh.) และ ทุเรียนนก (*D. griffithii* Bakh.) ออกจากกลุ่ม ทุเรียนพันธุ์อื่นได้ ดังนั้นในส่วนของ การหา

ความสัมพันธ์ของทุเรียนบ้าน จึงได้ทำการพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากการใช้เทคนิค GBS และคัดเลือกไว้ศึกษาจำนวน 1 ยีน คือ DuBc04 พบว่ามีแนวโน้มในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ได้ดีกว่ายีนอื่นๆ อย่างไรก็ตามอาจต้องมีการพัฒนาหรือวิเคราะห์ลักษณะทางสัญญาณที่มีอยู่เดิมให้ละเอียดมากขึ้น เช่น การรูปแบบพัฒนาการผล หรือการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ เป็นต้น เพื่อให้สามารถหาความสัมพันธ์กับผลวิเคราะห์ทาง DNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

การทดลองที่ 1.2

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ DNA Barcode and Genetic Diversity of Rambutan

ชื่อผู้วิจัย

ธีรวุฒิ ชุตินันท์กุล อรุโณทัย ชาววา กาญจนา พฤษพันธ์ อรวินทนิชูศรี

Theerawut ChutinanthakunAroonothai SawwaKanchana PruesapanOrnwintinee Chusri

คำสำคัญ : พันธุกรรมเงาะ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ไพรเมอร์มาตรฐาน

Key words : Rambutan genetics, DNA-barcode, universal primer

บทคัดย่อ

เงาะเป็นพืชที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในทวีปเอเชีย ซึ่งประเทศไทยถือเป็นหนึ่งในผู้ผลิตรายใหญ่ในภูมิภาค เงาะมีความหลากหลายโดยส่วนใหญ่อยู่ในสปีชีส์ *Nephelium lappaceum* L. และมีเงาะชนิดอื่นที่อยู่ต่างสปีชีส์ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่ออนุรักษ์และศึกษาความหลากหลายโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยทำการเก็บตัวอย่างเงาะจากแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จำนวน 36 ตัวอย่าง จาก พันธุ์พื้นเมืองจำนวน 13 พันธุ์ ลูกผสมจำนวน 8 พันธุ์ และพันธุ์ต่างสปีชีส์จำนวน 6 ตัวอย่าง สำหรับดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานที่ทำการศึกษามาจากตำแหน่งคลอโรพลาสต์จำนวน 5 ชนิด (*matK*, *rbcl*, *psbA*, *rpoC* and *trnL*) พบว่าการใช้ยีนมาตรฐานยังไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ของพันธุ์เงาะได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่ายีน *rbclA*, *rbcl*, และ *trnL* สามารถแยก เงาะขนสั้นลูกใหญ่ (*Nephelium rumboutan-ake* Leenh) เงาะป่า (*Nephelium* sp.) ออกจากเงาะอื่นๆ ได้ ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในพัฒนาที่ยีนที่สามารถจำแนกความสัมพันธ์ของพันธุ์เงาะได้ดีขึ้น เพื่อเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมและใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

Abstracts

Rambutan is one of the best-known fruits in Asia. Thailand is one of the largest producers of rambutan apart of Indonesia and Malaysia. The commercial rambutan, *Nephelium lappaceum* L., is considered closer to other Nepheliums, which are very difficult to distinguish from each other. Therefore, this study is to clarify the DNA barcode for diversity of rambutan using chloroplast genome regions. Thirty-six samples of rambutan were collected from the field at Chanthaburi and Trang Horticultural Research Center for analysis. Among these, 13 samples are local varieties, 8 samples are hybrid and 6 samples are not *N. lappaceum* L. Extracted DNA samples were evaluated with universal primers of *matK*, *rbcl*, *psbA*, *rpoC* and *trnL*. The result showed that all of primers could not explicitly explain the diversity within rambutan. However, *rbclA*, *rbcl* and *trnL* primers showed tendency to separated KhonsanLukyai (*Nephelium ramboutan-ake* (Labill.) Leenh.) and Pa (*Nephelium* sp.) from others. For more effectively, the examination more specific primers to confirm the relationships of the Thai rambutans should be study further. The genetic diversity of cultivated rambutan from this study will be used as a genetic database for development of a future breeding program.

บทนำ (Introduction)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการระบุชนิดหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตภายในเวลาอันรวดเร็ว วิธีการนี้อาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณที่เรียกว่า ดีเอ็นเอมาตรฐาน จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชื่อแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบอาจเป็นบริเวณเดียวหรือ 2-3 บริเวณ แต่ต้องมีความยาวไม่มากและเป็นบริเวณเดียวกับชนิดอื่นๆ ที่ต้องการเปรียบเทียบกัน วิธีการสร้างระบบ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะช่วยระบุชื่อสิ่งมีชีวิตได้จากทุกระยะของการเจริญ รวมถึงสภาพที่เป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กทั้งที่เป็นตัวอย่างสดและตัวอย่างที่ถูกรักษาสภาพไว้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อนักอนุกรมวิธาน และบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความชำนาญทางด้านอนุกรมวิธาน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับศาสตร์สาขาอื่นได้ เช่น การศึกษาทางด้านนิเวศวิทยา นิติวิทยาศาสตร์ และการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ เป็นต้น (วุฒิมงคล, 2554) การจัดทำฐานข้อมูล ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิต หรือ The Barcode of Life Project ได้เริ่มต้นขึ้นในปี ค.ศ. 2003 (Hebert et al., 2003) และได้รับการสนับสนุนต่อเนื่องจากหน่วยงานที่เกิดขึ้นจากความร่วมมือจากนานาชาติได้แก่ Consortium for the Barcode of Life (CBOL) ซึ่งปัจจุบันประกอบด้วยสมาชิกจาก 43 ประเทศ

(http://www.barcoding.si.edu/CBLMembers_details.htm) การตรวจข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์และดีเอ็นเอในนิวเคลียสโรโบโซมมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกพืชกันมากในปัจจุบัน เนื่องจาก ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (Chloroplast DNA; cpDNA) เป็นดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวงแหวน มีบริเวณอนุรักษ์สูงในเรื่องของขนาดและโครงสร้าง ประกอบด้วยยีน 130 ยีน มีขนาดของยีนตั้งแต่ 72 ถึง 220 kb (Palmer et al., 1992; Sugiura et al., 1998) การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (Palmer and Stein, 1986; Petit et al., 1998) การแปรผันทางพันธุกรรมในรูปแบบการแทนที่คู่เบส (base-pair substitution) มีอัตราในระดับกลางถึงต่ำ (Cleeg and Zurawski, 1992) ทำให้สามารถนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชได้ ยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ เช่น *maturaseK* (*matK*), *trnH-psbA intergenic spacer*, *ribulose-1,5-bisphosphate*

carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)atpF-atpH spacer, rpoB, rpoC1 และ psbK-psbI spacer (CBOL., 2009) เป็นต้น ส่วนดีเอ็นเอในนิวเคลียร์ไรโบโซม (nuclear ribosomal DNA; nr DNA) เป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดรวมทั้งพืช ประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 หน่วยได้แก่ 18S 5.8S และ 25S ซึ่งแต่ละหน่วยมีบริเวณบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เรียกว่า non-coding sequence หรือ Internal transcribed spacer region (ITS) ได้แก่ ITS1 ตั้งอยู่ระหว่างยีน 18S และ 5.8S และ ITS2 ตั้งอยู่ระหว่าง 5.8S และ 25S ซึ่งมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าดีเอ็นเอในบริเวณอื่นๆของ nr DNA ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ (Roger and Bendich, 1987; Ritland et al., 1993)

เงาะ (*Nephelium lappaceum*) เป็นพืชในวงศ์ Sapindaceae เป็นไม้ผลขนาดกลาง ลำต้นเป็นพุ่ม ใบเรียงสลับ มีใบย่อย ผลมีขนที่เปลือก พันธุ์การค้าที่นิยม ได้แก่ โรงเรียน สีชมพู สีทอง เป็นต้นกรมวิชาการเกษตรได้รวบรวมพันธุ์เงาะไว้หลากหลายสายพันธุ์ ในศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ที่ผ่านมามีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกพันธุ์พืชอย่างแพร่หลาย เช่นมีการใช้เครื่องมือในการศึกษาพันธุกรรมของไม้ผลเช่น ทูเรียน ที่มีการใช้ ไมโครแซทเทลไลท์ หรือ SSR (Simple Sequence Repeat) ซึ่งเป็นลำดับเบสที่ซ้ำกันเรียงกันอย่างต่อเนื่องที่ตำแหน่งต่างๆ ในจีโนม แต่ละชุดประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำสั้นๆ ไม่เกิน 10 คู่เบส (สุรินทร์, 2552)โดยไพรมอร์ของเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อจำแนกทุเรียนได้ผลดีคือ ไพรมอร์ MS1AAC-19 (ปิยรัชฎ์ และคณะ, 2552) หรือการจำแนกทุเรียนพันธุ์การค้า 4 พันธุ์ (หมอนทอง ชะนี พวงมณี และหลังลับแล) เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากแหล่งพันธุ์ต่างๆ โดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่ามีความสอดคล้องกับรูปแบบการขยายพันธุ์ ที่มาจากแหล่งต่างกัน (เตือนใจ และ ปิยะศักดิ์, 2556) แต่ยังไม่มีการศึกษาการจำแนกโดยใช้ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยเฉพาะในเงาะที่ยังมีการศึกษาทางด้านนี้ค่อนข้างน้อย โดยวิธีการนี้นอกจากจะสามารถชี้เฉพาะลักษณะของสายพันธุ์พืชได้ ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการอนุรักษ์ การใช้เป็นข้อมูลแสดงความเป็นเจ้าของพันธุ์กรรม ตลอดจนการรักษาทรัพยากรพันธุกรรมพืชของไทย เพื่อนำไปปรับใช้ขยายผลต่อยอดในแขนงต่างๆ ได้อย่างกว้างขวางต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

สร้างข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเงาะ และจัดเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรม เพื่ออนุรักษ์เก็บรักษาในธนาคารเชื้อพันธุกรรมพืช และธนาคารดีเอ็นเอ จากแปลงรวบรวมพันธุ์ที่มีอยู่เดิม

ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณคลอโรพลาสต์และ nuclear ribosomal international transcribed spacer (ITS) ในเงาะ ที่เก็บรวบรวมไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากใบมาสกัดดีเอ็นเอ บางส่วนของดีเอ็นเอจะเก็บไว้เพื่อเป็นดีเอ็นเอต้นทุน (stock DNA)อีกส่วนนำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และนำมาศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจสอบความถูกต้องโดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลสากล หรือฐานข้อมูลดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นทำการประเมินคุณภาพลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยวิเคราะห์ร่วมกับการระบุชนิดของพันธุ์เงาะ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้และความถูกต้องไว้ในฐานข้อมูลสากลต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย(Research Methodology)

- วัสดุ อุปกรณ์

1. ต้นเงาะพันธุ์ต่างๆ ที่ปลูกรวบรวมไว้ในแปลงของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และ ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ประกอบด้วย โรงเรียน สีชมพู สีทอง บางยี่ขัน น้ำตาลกรวดเงาะมวง เงาะขนสั้น พลับ 1-8 ปลูกชั้น พรวนซี เงาะลูกเหลือง ลูกเหลืองขนสั้น เงาะลูกแดง เงาะป่า เงาะพื้นเมือง ขนสั้นลูกใหญ่ ลูกพรวน ขนสั้นลูกเล็ก ขนเหลือง คอแลน

2. วัสดุในการเก็บตัวอย่างเพื่อจัดทำพรรณไม้อ่างอิง

3. ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

4. เครื่อง Spectrophotometer

5. เครื่อง Electrophoresis

6. เครื่อง PCR

7. เครื่องปั่นเหวี่ยง

8. สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ

9. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เช่น เครื่องแก้ว อ่างและตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นต้น

10. อุปกรณ์ในการบันทึกข้อมูลและประมวลผล เช่น เครื่องคอมพิวเตอร์ ปริ้นเตอร์ และแบบบันทึก

ข้อมูล เป็นต้น

- วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การเก็บตัวอย่างเงาะและการเก็บตัวอย่างอ่างอิง

การเก็บตัวอย่างสำหรับการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะเก็บตัวอย่างใบเงาะจากแปลงรวบรวม ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จัดทำความสัมพันธ์ของข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่มีอยู่กับภาพถ่าย และจัดทำพรรณไม้อ่างอิง ส่งเก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK) สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร บันทึกข้อมูลชนิดพืชสถานที่เก็บตัวอย่างและเลขอ้างอิงตัวอย่างพืช (Voucher number) ตามมาตรฐานสากลต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การสกัดดีเอ็นเอของเงาะ

1. เก็บตัวอย่างใบอ่อนของสายพันธุ์เงาะ ที่ปลูกภายในศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีและศูนย์วิจัยพืชสวนตรังเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

2. สกัดดีเอ็นเอจากใบ โดยใช้สารละลาย CTAB เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้

3. ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

ขั้นตอนที่ 3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณคลอโรพลาสต์และ nuclear ribosomal international transcribed spacer (ITS) และประเมินประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดในเงาะ

1. นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *rbcl*, *matKpsbArpoC* และ *trnL* ของคลอโรพลาสต์ และบริเวณ ITS ตารางที่ 1.2.1 ไพรเมอร์และลำดับเบสของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการศึกษา

Locus	Name of primer	Gene Primer (5'-3')	References
<i>rbcl</i>	<i>rbcl_F</i>	ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC	Petersen and Seberg, 2003
	<i>rbcl_R</i>	CTTCGGCACAAAATAAGAAACGATCTC	
	<i>rbclLa_F</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	Kress and Erickson (2007)

	rbclA_R	GTAAAATCAAGTCCACCRG	Erickson, unpubl
<i>matK</i>	1RKIM-F	CCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	
	3FKIM-R	GTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	
<i>psbA</i>	psbA-trnH1	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	CBOL Plant Working Group (2009)
	psbA-trnH2	CGCGCATGGTGGATTCAATCC	
<i>rpoC</i>	rpoC_F	GGCAAAGAAGGAAGATTTTCG	
	rpoC_R	TGAGAAAACATAAGTAAACGAGC	
<i>trnL</i>	trnL-trnF1	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	Taberlet et al. (1991)
	trnL-trnF2	ATTTGAACTGGTGACAGCAG	
<i>ITS</i>	ITS-u1	GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG	
	ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

2. เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์บริเวณ *rbcl*, *matKpsbArpoC trnL* และบริเวณ ITS โดยใช้ไพรเมอร์มาตรฐาน ด้วยเทคนิค PCR ความเข้มข้น 2 ไมโครลิตร 10x Taq buffer dNTP mix ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล และเอนไซม์ Taq polymerase ความเข้มข้น 0.6 ไมโครลิตร การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำด้วยเครื่อง DNA thermal cycle ด้วยระดับอุณหภูมิดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 pre-denature	94 องศาเซลเซียส	นาน 5 นาที
ขั้นตอนที่ 2 denature	94 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing	55 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 extension	72 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที (ซ้ำ 35 รอบ)
ขั้นตอนที่ 5 final-extension	72 องศาเซลเซียส	นาน 7 นาที

3. ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี Electrophoresis

4. สกัดผลผลิต PCR ที่ต้องการและทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุดสกัดและทำให้บริสุทธิ์สำเร็จรูป

5. ส่งผลผลิตดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *rbcl*, *matKpsbArpoC trnL* ของคลอโรพลาสต์ และบริเวณ ITS ไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using ABI BigDye terminator chemistry หรือเครื่อง MegaBACE 1000 automated sequencer (AmershamBioscience) using DYEnamic TM ET Dye Terminators chemistry)

6. ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส โดยใช้โปรแกรม BioEdit Version 7.2.5 หรือ GENTle Version 1.9.4

7. นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blast ซึ่งอยู่ภายใต้ฐานข้อมูลของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อตรวจสอบความปนเปื้อนของดีเอ็นเอ

8. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *rbcl*, *matKpsbArpoC trnL* ของคลอโรพลาสต์ และบริเวณ ITS โดยวิธีการ Alignment ด้วยโปรแกรม BioEdit Version 7.2.5 หรือ GENTle Version 1.9.4

9. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้บริเวณ *rbcl*, *matKpsbArpoC trnL* ของคลอโรพลาสต์ และบริเวณ ITS กับฐานข้อมูลดีเอ็นเอของทุเรียนที่มีการระบุชื่อถูกต้องแล้วใน NCBI ด้วยโปรแกรม Blast N เพื่อวิเคราะห์การระบุชนิดของพืชด้วยเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงของลำดับเบส

10. เก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเงาะแต่ละสายพันธุ์ไว้ในฐานข้อมูล การบันทึกข้อมูล บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางอนุกรมวิธาน ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ *rbcl*, *matKpsbArpoC* *trnL* ของคลอโรพลาสต์ และบริเวณ ITS บันทึกตำแหน่งที่มีความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ เก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล

- เวลาในการดำเนินการ 2 ปี (ตุลาคม 2561 ถึง 30 กันยายน 2563)
- สถานที่ทำการทดลอง
 1. สถาบันวิจัยพืชสวน
 2. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
 3. สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช
 4. ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี

ผลการทดลองและอภิปราย (Results and Discussion)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเงาะที่ทำการศึกษา

ในการดำเนินงานได้ทำการศึกษารูปร่างเงาะที่เก็บรวบรวมไว้ จำนวน 2 พันธุ์ คือ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีจำนวน 17 พันธุ์ และศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จำนวน 19 พันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในสปีชีส์ *Nephelium lappaceum* ยกเว้น ฟูลาซัน (*N. ramboutan-ake*) เงาะป่าขนสั้นลูกใหญ่ (*N. ramboutan-ake*) เงาะป่า (*Nephelium* sp.) เงาะขนสั้นลูกเล็ก (*N. mutabile*) และคอแลน (*N. hypoleucom* Kurz.) ส่วนตัวอย่างที่เป็น Unknown ไม่มีข้อมูลว่าเป็นพันธุ์ใด โดยลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเงาะแต่ละพันธุ์ ได้แก่

ขนาดใบรวมและใบย่อย พบว่ามีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์และพื้นที่ปลูก โดยใบรวมมีความกว้างอยู่ในช่วง 21.0-32.9 เซนติเมตร ความยาว 21.2-35.5 เซนติเมตร จำนวนใบย่อยอยู่ในช่วง 4-9 ใบ มีความยาวของใบย่อยอยู่ในช่วง 3.8-8.1 เซนติเมตร และความกว้างอยู่ในช่วง 10.6-18.1 เซนติเมตร (ตารางที่ 1.2.2)

ลักษณะของใบ พบว่า พันธุ์เงาะของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีทั้งหมดมีรูปร่างใบย่อยแบบ Elliptic ในขณะที่ของศูนย์วิจัยพืชสวนตรังมีหลากหลายแบบ ทั้งนี้ลักษณะ ปลายใบ ฐานใบ และ สีใบแก่ มีลักษณะที่แตกต่างกันไป ส่วนการเรียงตัวของใบมีทั้งแบบคู่และสลับ (ตารางที่ 1.2.3)

ลักษณะผล พบว่า รูปร่างผลมีหลาย 3 แบบ คือ Ovoid เช่น โรงเรียน พลับ1 และ เงาะลูกเหลือง Globose เช่น น้ำตาลกรวด สีทอง และ พลับ5 Oblong เช่น บางยี่ขัน (ตารางที่ 1.2.4 และ 1.2.6)

สีผลมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ ตั้งแต่สีชมพู เช่น เงาะสีชมพู จนถึงแดงเข้ม เช่น เงาะมั่ง และ สีเหลือง เช่น น้ำตาลกรวด เป็นต้น (ตารางที่ 1.2.4 และ 1.2.5 และภาพที่ 1.2.1)

ตารางที่ 1.2.2 ขนาดใบรวม และใบย่อย ของเงาะพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม ในแปลงรวบรวมพันธุ์ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง

พันธุ์	ใบรวม			ใบย่อย			ความยาว/กว้าง(ซม.)
	ความกว้าง(ซม.)	ความยาว(ซม.)	ความยาวก้านใบ(ซม.)	จำนวนใบย่อย(ใบ)	ความกว้าง(ซม.)	ความยาว(ซม.)	
พลับ1	23.7	29.3	6.4	5.5	5.9	11.8	2.0
พลับ2	24.9	29.7	5.2	5.8	5.7	13.6	2.4
พลับ3	26.0	29.1	5.5	5.5	5.4	13.0	2.4
พลับ4	22.1	31.7	6.3	6.1	5.8	12.8	2.2
พลับ5	27.0	34.2	5.9	5.8	6.7	15.0	2.2

พันธุ์	ใบรวม			ใบย่อย			ความยาว/ กว้าง(ซม.)
	ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)	ความยาว ก้านใบ(ซม.)	จำนวน ใบย่อย(ใบ)	ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)	
พลีว6	21.0	21.2	7.3	4.9	5.1	10.6	2.1
พลีว7	26.6	32.8	6.3	5.7	6.5	14.7	2.3
พลีว8	28.9	35.5	6.7	6.1	5.7	15.4	2.7
โรงเรียน	23.3	27.1	5.7	5.1	6.3	11.1	1.8
สีชมพู	25.1	33.6	7.0	6.1	6.1	14.0	2.3
สีทอง	27.9	35.3	5.2	6.5	6.0	16.5	2.8
น้ำตาลกรวด	27.8	35.2	6.2	6.4	6.0	15.2	2.5
บางยี่ขัน	27.2	34.8	6.1	6.2	6.1	16.2	2.7
เจ๊ะมวง	26.5	32.4	6.2	6.0	5.8	14.8	2.6
พรวนซี	26.2	32.2	8.9	6.8	7.9	17.1	2.2
เจ๊ะมวง	25.2	30.5	6.0	7.0	6.7	14.4	2.2
เจ๊ะมวง	21.1	25.3	5.7	7.7	5.6	12.0	2.1
เจ๊ะมวง	26.9	30.6	4.7	6.4	6.1	16.1	2.6
เงาะลูกเหลือง	24.3	24.8	7.2	4.9	6.4	14.4	2.3
เงาะลูกเหลือง	27.8	30.5	8.1	6.4	6.9	14.5	2.1
เงาะลูกเหลือง	27.5	26.4	5.6	5.2	7.9	15.1	1.9
น้ำตาลกรวด	30.8	31.1	7.0	5.9	8.1	18.1	2.2
เงาะลูกเหลือง ขนสั้น	27.5	24.6	6.4	5.5	5.8	12.0	2.1
เงาะลูกแดง	25.4	28.3	7.0	5.5	7.2	16.4	2.3
เงาะลูกแดง	23.9	25.1	8.6	6.4	6.6	12.9	1.9
เงาะป่า	21.8	26.3	9.3	5.7	4.9	16.5	3.4
พื้นเมือง	25.0	22.8	9.5	5.4	4.3	14.1	3.3
ขนสั้นลูกใหญ่	32.9	31.1	10.3	8.5	3.8	16.4	4.4
เงาะแดง	27.5	29.2	6.8	5.6	7.5	16.6	2.2
ลูกพรวน	27.0	27.1	6.0	5.4	6.4	15.1	2.4
ขนสั้นลูกเล็ก	25.6	30.1	5.9	5.8	7.2	15.7	2.2
ขนเหลือง	22.6	23.6	4.8	5.8	6.3	12.4	2.0
คอแลน	20.8	20.1	7.0	5.3	3.9	11.8	3.1

ตารางที่ 1.2.3 ลักษณะรูปร่างใบย่อย ปลายใบ ฐานใบ สีใบแก่ และลักษณะการเรียงตัวของใบของเงาะ ในแปลงรวบรวมพันธุ์ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง

พันธุ์	รูปร่างใบย่อย	ปลายใบ	ฐานใบ	สีใบแก่	ลักษณะการเรียงตัวของใบ
พลิว 1	Elliptic	Acuminate	Cuneate	G137A	คู่
พลิว 2	Elliptic	Acute	Cuneate	G139A	สลับ
พลิว 3	Elliptic	Acute	Acute	G137A	คู่
พลิว 4	Elliptic	Acuminate	Cuneate	G137A	คู่
พลิว 5	Elliptic	Acute	Acute	G137A	คู่
พลิว 6	Elliptic	Acuminate	Cuneate	G137A	สลับ
พลิว 7	Elliptic	Acuminate	Cuneate	G137A	คู่
พลิว 8	Elliptic	Acute	Acute	G137A	คู่
โรงเรียน	Elliptic	Acuminate	Cuneate	G137A	สลับ
สีชมพู	Elliptic	Acuminate	Cuneate	G137A	สลับ
น้ำตาลกรวด	Elliptic	Acuminate	Cuneate	G137A	สลับ
สีทอง	Elliptic	Acute	Cuneate	G137A	คู่
เงาะมง	Elliptic	Acuminate	Cuneate	G137A	สลับ
บางยี่ขัน	Elliptic	Acuminate	Acute	G137A	สลับ
พรวนซี	Obovate	Acuminate	Cuneate	G137A	สลับ
เงาะมง	Obovate	Acuminate	Cuneate	G137A	สลับ
เงาะมง	Obovate	Obtuse	Cuneate	G136A	สลับ
เงาะมง	Elliptic	Acuminate	Cuneate	G137A	สลับ
เงาะลูกเหลือง	Obovate	Acuminate	Cuneate	G137A	สลับ
เงาะลูกเหลือง	Obovate	Acuminate	Cuneate	G137A	สลับ
เงาะลูกเหลือง	Obovate	Acuminate	Cuneate	G137A	สลับ
น้ำตาลกรวด	Obovate	Acute	Cuneate	G137A	สลับ
เงาะลูกเหลืองขนสั้น	Obovate	Acuminate	Cuneate	G137C	สลับ
เงาะลูกแดง	Elliptic	Acute	Cuneate	G137B	สลับ
เงาะลูกแดง	Obovate	Acuminate	Obtuse	G146A	สลับ
เงาะป่า	Elliptic	Acute	Acute	G139A	สลับ
พื้นเมือง	Lanceolate	Acute	Obtuse	G137A	สลับ
ขนสั้นลูกใหญ่	Lanceolate	Acute	Obtuse	G137A	สลับ
เงาะแดง	Obovate	Acuminate	Acute	G144A	สลับ
ลูกพรวน	Obovate	Acuminate	Acute	G137A	สลับ
ขนสั้นลูกเล็ก	Obovate	Acuminate	Acute	G144A	สลับ
ขนเหลือง	Obovate	Acuminate	Acute	G139A	สลับ
คอแลน	Elliptic	Acuminate	obtuse	G137A	คู่

หมายเหตุ: Descriptors for Rambutan ของ International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI, 2003)

- Elliptic: ไบริรูปรี ใบบางส่วนกว้างที่สุดกลางใบ และสอบเข้าฐานใบและปลายใบ
- Obovate: รูปไข่กลับ
- Acute: ปลายใบหรือฐานใบแหลมและเรียวไปยังปลายที่แหลม
- Acuminate: ปลายใบเรียวแหลม
- Cuneate: ฐานใบรูปปลีมี ส่วนของฐานใบจะเรียวและแคบเข้าฐานใบแหลม

ตารางที่ 1.2.4 ลักษณะผล สีผล และลักษณะเนื้อ ของเงาะพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม ในแปลงรวบรวมพันธุ์ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี

พันธุ์	ลักษณะผล				
	รูปร่างผล	สีผิวผล	สีโคนขน	สีปลายขน	สีเปลือกด้านใน
พลิว 1	Ovoid	YO21D	R47A	YG150B	Y4D
พลิว 2	Ovoid	YO21B	R46B	YG150B	Y4D
พลิว 3	Ovoid	YO17C	R47B	YG150B	Y8D
พลิว 4	Ovoid	YO21C	R47C	YG150B	Y8D
พลิว 5	Globose	OR34C	R47A	YG150B	Y8D
พลิว 6	Ovoid	Y7B	R50D	YG154B	Y4D
พลิว 7	Globose	YO21B	R50B	YG154B	Y4D
พลิว 8	Ovoid	YO21B	R52A	YG150C	Y8D
โรงเรียน	Ovoid	YO21A	R53B	YG149B	Y4D
สีชมพู	Ovoid	YO21C	R50A	R51A	Y8D
สีทอง	Globose	O25A	R45A	YG149B	Y8D
น้ำตาลกรวด	Globose	Y7A	Y3C	Y5B	Y4D
บางยี่ขัน	Oblong	YO21B	R50B	R50A	Y8D
เงาะม้ง	Oblong	O28A	R53C	R53C	Y8D









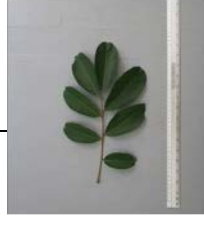
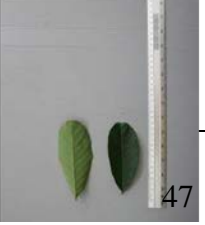


หมายเหตุ: Globose = กลม, Ovoid = รูปไข่ และ Oblong = ขอบขนาน (IPGRI, 2003)





























ไม่ได้ข้อมูลในส่วนของเงาะปูลาชันและ unknown


































ภาพที่ 1.2.1 ผลเงาะพันธุ์ต่างๆ ปลุกในแปลงรวบรวมพันธุ์ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี ที่นำมาใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 1.2.5 ภาพลักษณะสัณฐานของใบ ดอก และผลเงาะ ของศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง

พันธุ์	ใบรวม	ใบย่อย	ลักษณะดอก	ลักษณะผล
1. พรวนซี				
2. เจ๊ะม่ง (1)				
3. เจ๊ะม่ง (2)				

พันธุ์	ใบรวม	ใบย่อย	ลักษณะดอก	ลักษณะผล
4. เจ๊ะม่ง (3)				
5. เงาะลูกเหลือง (1)				
6. เงาะลูกเหลือง (2)				
7. เงาะลูกเหลือง (3)				
8. น้ำตาลกรวด				
9. เงาะลูกเหลืองขนสั้น				
10. เงาะลูกแดง (1)				

พันธุ์	ใบรวม	ใบย่อย	ลักษณะดอก	ลักษณะผล
11. เงาะลูกแดง (2)				ไม่ติดผล
12. เงาะป่า				
13. ฟีนเมือง				
14. ขนสั้นลูกใหญ่				
15. เงาะแดง				ไม่ติดผล
16. ลูกพรวน				
17. ขนสั้นลูกเล็ก				
18. ขนเหลือง				

พันธุ์	ใบรวม	ใบย่อย	ลักษณะดอก	ลักษณะผล
19. คอแลน			ไม่ออกดอก	ไม่ติดผล

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.2.6 แสดงลักษณะพื้นฐานของผล และองค์ประกอบต่างๆ ในเงาะแต่ละพันธุ์ ที่ปลูกรวบรวมพันธุ์ในศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง

ชื่อพันธุ์	ลักษณะพืช												
	ความสูง ต้น (m)	ใบสี	รูปร่าง ผล	ผลสี	สีขน	ขนาด ผล	เนื้อผล สี	TSS (°Brix)	รสชาติ	เมล็ดสี	ขนาด เมล็ด	ความหนา เปลือก	ความ หนาเนื้อ
1.พรวนซี	6.20	GG137A	Globo se	YG 2B	YGG 149C	8.51	ขาวใส	22.02	หวานคล้าย น้ำตาลกรวด	GYG 1A	1.97	0.21	0.53
2.เงาะมง	8.50	GG137A	Oblon g	RG 46B	GYG 1A	16.73	ขาวใส	16.13	หวานอม เปรี้ยว	GYG 1C	3.24	0.43	0.67
3.เงาะมง	8.80	GG136A	Ovoid	RG 45B	TGG 144B	19.05	ขาวขุ่น	15.83	หวาน	YGG 145D	3.69	0.43	0.68
4.เงาะมง	9.00	GG137A	Globo se	RG 42A	บริเวณโคน RG 42A บริเวณปลายขน YGG 150A	11.56	ขาวขุ่น	19.63	หวาน	YGG 150A	2.83	0.32	0.53
5.เงาะลูก เหลือง	8.80	GG137A	Globo se	YOG 14C	YGG 150B	14.56	ขาวใส	18.35	หวาน	YGG 150D	2.96	0.30	0.72
6.เงาะลูก เหลือง	7.50	GG137A	Ovoid	OG34B	บริเวณโคน RG 50B บริเวณปลายขน GG 142A	15.53	ขาวขุ่น	20.37	หวาน	YGG 12D	3.37	0.30	0.87
7.เงาะลูก เหลือง	8.70	GG137A	Ovoid	YG 43C	YG 39B	12.57	ขาวใส	16.27	หวาน	YG 11A	3.52	0.20	0.50
8.น้ำตาล กรวด	7.00	GG137A	Globo se	RG 44C	YGG 149A	12.26	ขาวขุ่น	15.80	หวาน	YGG 150D	3.68	0.31	0.47
9.เงาะลูก เหลืองขนสั้น	7.20	GG137C	Ovoid	YG 5B	YG 5C	11.46	ขาวใส	16.27	หวาน	YG 11A	2.33	0.24	0.54

10.เงาะลูก แดง	9.80	GG137B	Globo se	RG 53A	บริเวณโคน RG 53B บริเวณปลายขน RG 47B	14.52	ขาวชุ่น	19.63	หวานอม เปรี้ยว	GYG 1D	3.25	0.39	0.73
11.เงาะลูก แดง	6.20	GG146A	-	-		-	-	-	-	-	-		
12.เงาะป่า	6.00	GG139A	Ovoid	RG 53A	RG 53A	31.82	ขาวชุ่น	19.50	หวานอม เปรี้ยว	YGG 150D	4.28	1.20	1.10
13.เงาะ พื้นเมืองลูก แดง	28.20	GG137A	Ovoid	RG 45B	RG 45B	23.00	ขาวชุ่น	17.30	เปรี้ยว	YGG 150D	4.29	0.77	0.48
14.เงาะป่าขน สั้นลูกใหญ่	25.50	GG137A	Ovoid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.เงาะแดง	15.20	GG144A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.เงาะลูก พรวน	15.80	GG137A	Ovoid	RG 53B	YGG 149A	11.13	ขาวใส	19.08	เปรี้ยวอม หวาน	YGG 150C	2.36	0.31	0.56
17.เงาะขนสั้น ลูกเล็ก	14.10	GG144A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.เงาะลูก เหลือง	15.50	GG139A	Globo se	YGG 150C	YGG 150B	11.40	ขาวใส	17.93	เปรี้ยวอม หวาน	YGG 145D	3.17	0.33	0.57
19.คอแลน	22.80	GG137A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: Globose = กลม, Ovoid = รูปไข่ และ Oblong = ขอบขนาน (IPGRI, 2003)

- ไม่มีข้อมูลเนื่องจากไม่มีการตีผล

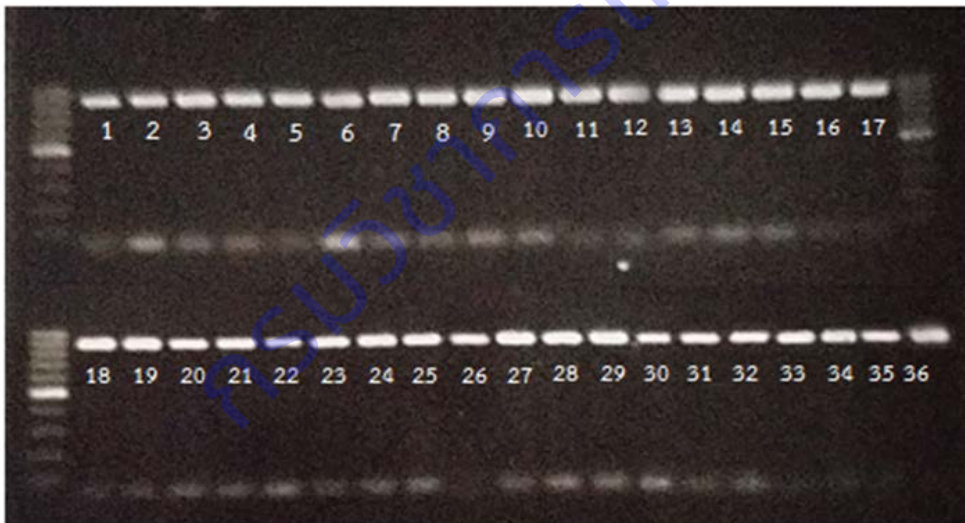
นอกจากนี้ในการเก็บตัวอย่างของเงาะแต่ละพันธุ์ได้ทำการจัดทำเป็นพรรณไม้แห้ง เพื่อเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชไว้ทุกตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 36 ตัวอย่าง



ภาพที่ 1.2.2 กา

ผลผลิตดีเอ็นเอที่บริเวณยีนมาตรฐาน

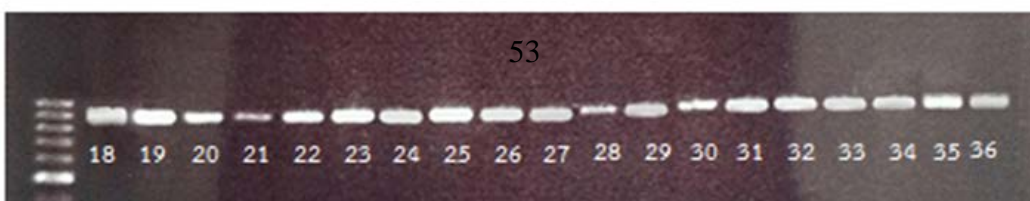
เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ จากใบเงาะทั้ง 36พันธุ์ (แปลงศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จำนวน 17 พันธุ์และศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จำนวน 19 พันธุ์) แล้วนำมาสร้าง barcoding โดยใช้ ยีน *matK1R*, *MatK-413*, *rbcl*, *rbclA*, *psbA*, *rpoC*, *trnL* และ ITS พบว่า สามารถตรวจพบดีเอ็นเอเป้าหมายของเงาะที่จำเพาะกับยีนดังกล่าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในส่วนของยีนมาตรฐาน *matK1R*, *MatK-413*, *rbcl*, *rbclA*, *psbA*, *rpoC* และ *trnL* โดยมีขนาดประมาณ 900, 900, 700, 600, 500, 500 และ 450 คู่เบส ตามลำดับ ส่วนยีนมาตรฐานของ ITS ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีแถบจำนวนมากและซ้อนทับกันจึงไม่เหมาะสมสำหรับการคัดแยกเงาะ โดยผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอจากยีนมาตรฐานที่ตรวจพบของเงาะทั้งหมดปรากฏผลดังภาพที่ 1.2.3- 1.2.9



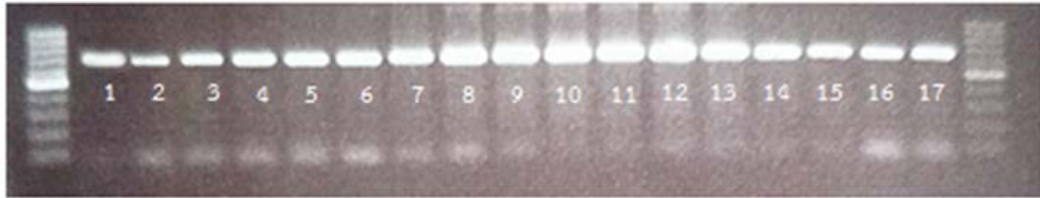
ภาพที่

1 ทั้งหมด 36

พันธุ์ ได้แก่ 1. เรงเรยน 2. สชมพู 3. สทอง 4. บางยชน 5. นาดาลกรวด 6. เจะมง 7. เงาะขนสน 8. พลิ้ว1 9. พลิ้ว2 10. พลิ้ว3 11. พลิ้ว4 12. พลิ้ว5 13. พลิ้ว6 14. พลิ้ว7 15. พลิ้ว8 16. ปูลาชัน 17. unknown 18. พรวนซี 19. เจ๊ะมง 20. เจ๊ะมง 21. เจ๊ะมง 22. เงาะลูกเหลือง 23. เงาะลูกเหลือง 24. เงาะลูกเหลือง 25. น้ำตาลกรวด 26. เงาะลูกเหลืองขนสั้น 27. เงาะลูกแดง 28. เงาะลูกแดง 29. เงาะแดง 30. เงาะลูกพรวน 31. เงาะขนสั้นลูกเล็ก 32. เงาะลูกเ

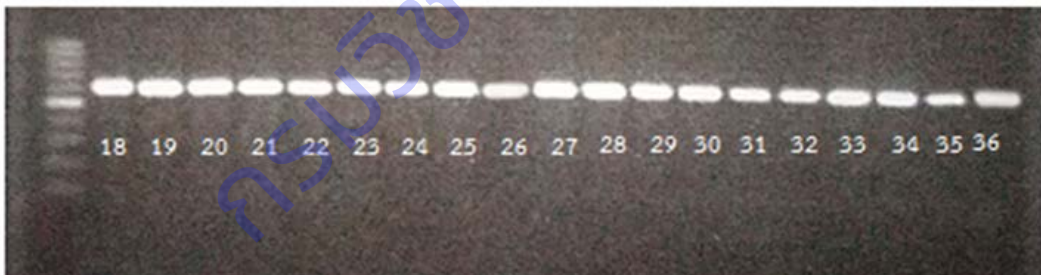


ภาพที่ 1.2.4 แอบัติเอ็นเอจากผลผลิตของพีซีอาร์ในเงาะ จากการใส่ไพรเมอร์ของยีน MatK-413 ทั้งหมด 36 พันธุ์



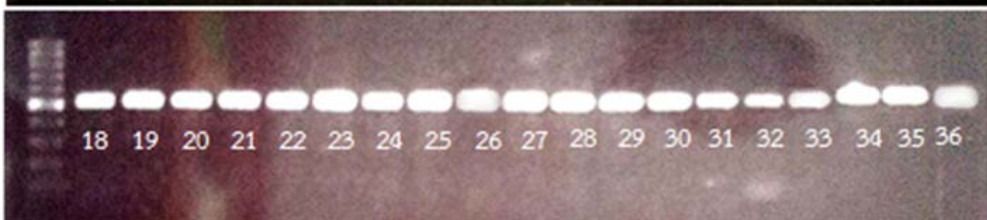
ภาพที่ 1

พันธุ์



ภาพที่

พันธุ์



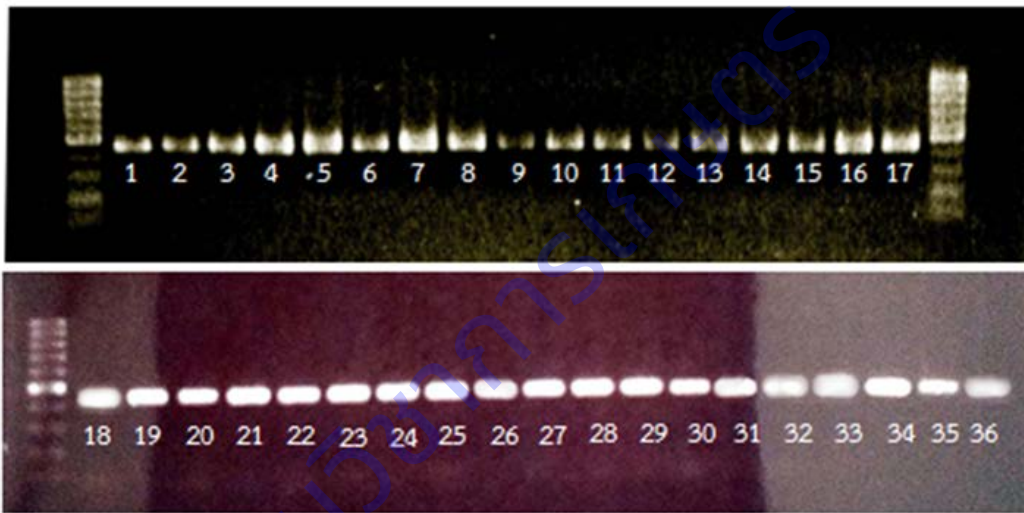
ภาพที่ 1.

พันธุ์



ภาพที่

พันธุ์



ภาพที่ 1.
ผลการจำ

ระบุ

ผลผลิตของ PCR ได้ทำการส่งไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการของ First BASE (Apical Scientific Sdn Bhd, Malaysia) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 สามารถจัดกลุ่มตาม บาร์โค้ดของยีนมาตรฐานจำนวน 6 ยีน ดังนี้

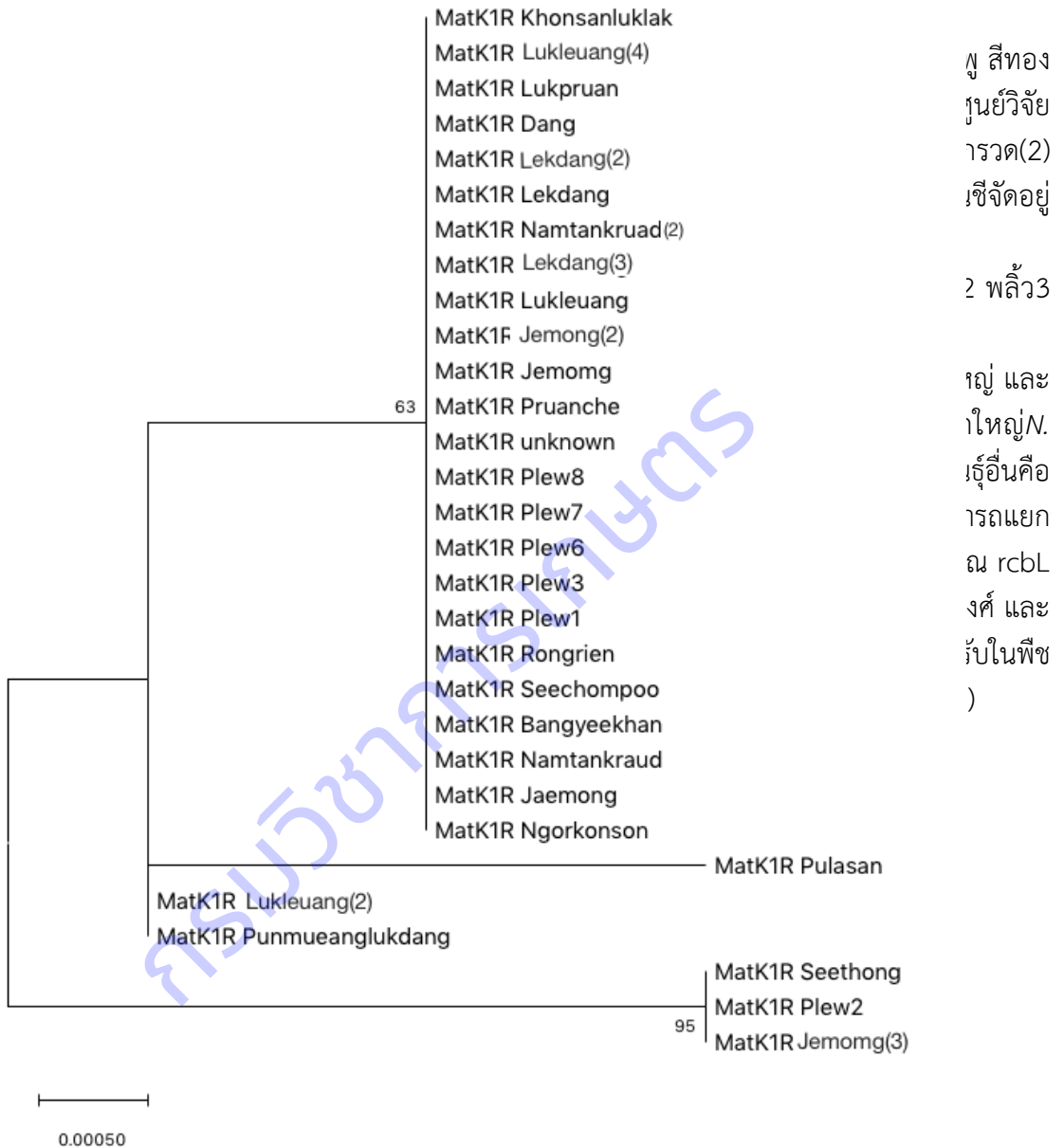
1) ยีนมาตรฐาน MatK1R แยกความแตกต่างได้ 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มแรกมี กลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มย่อยที่หนึ่งประกอบด้วย ขนสั้นลูกใหญ่ ลูกเหลือง ลูกเหลือง(4) ลูกพรวนแดง เล็กแดง เล็กแดง(2) เล็กแดง(3) น้ำตาลกรวด น้ำตาลกรวด(2) เจ๊ะมง เจ๊ะมง(2) พรวนซี พลับัว1 พลับัว3 พลับัว6 พลับัว7 พลับัว8 โรงเรียน สีชมพู บางยี่ขัน ขนสั้น กลุ่มย่อยที่สองคือ ลูกเหลือง(2) และ พันเมืองลูกแดง โดยในกลุ่มลูกเหลืองพบว่า ลูกเหลือง(2) มีผลสีเหลืองออกแดง ในขณะที่ลูกเหลืองอื่นไม่มีสีแดง ส่วนปลาซัน ไม่อยู่ในกลุ่ม ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ปลาซัน เป็นเงาะต่างชนิดคือ *N. ramboutan-ake* (Labill) Leenh กลุ่มใหญ่ที่สอง ประกอบด้วย สีทอง เจ๊ะมง(3) และพลับัว2 ซึ่งในกลุ่มนี้พบว่า พลับัว2 เป็นลูกผสมของสีทองและเจ๊ะมง (ภาพที่ 1.2.10)

2) ยีนมาตรฐาน rbcLA พบว่า เงาะเกือบทุกพันธุ์อยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่มี 3 พันธุ์ที่อยู่นอกกลุ่ม คือ เงาะป่า เงาะขนสั้นลูกใหญ่ และเงาะพันเมืองลูกแดง โดยเงาะขนสั้นลูกใหญ่ เป็นเงาะต่างชนิด คือ *N. ramboutan-ake* Leenh. (ภาพที่ 1.2.11)

3) ยีนมาตรฐาน rbcLสามารถจัดกลุ่มออกได้ เป็น 2 กลุ่ม คือ เงามส่วนใหญ่ อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนอีกกลุ่มประกอบด้วย เงามป่า เงามพื้นเมืองลูกแดง และ ขนสั้นลูกใหญ่ (ภาพที่ 1.2.12)

4) ยีนมาตรฐาน psbAสามารถจัดกลุ่มเป็นกลุ่มหลักได้ 3 กลุ่ม ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแรก กลุ่มที่สองประกอบด้วย เงามซึ่งลูกใหญ่ และ เงามป่า กลุ่มที่สามได้แก่ เงามสีทอง พลับ 2 และ เงาม (2) ส่วน unknown จัดอยู่นอกกลุ่ม

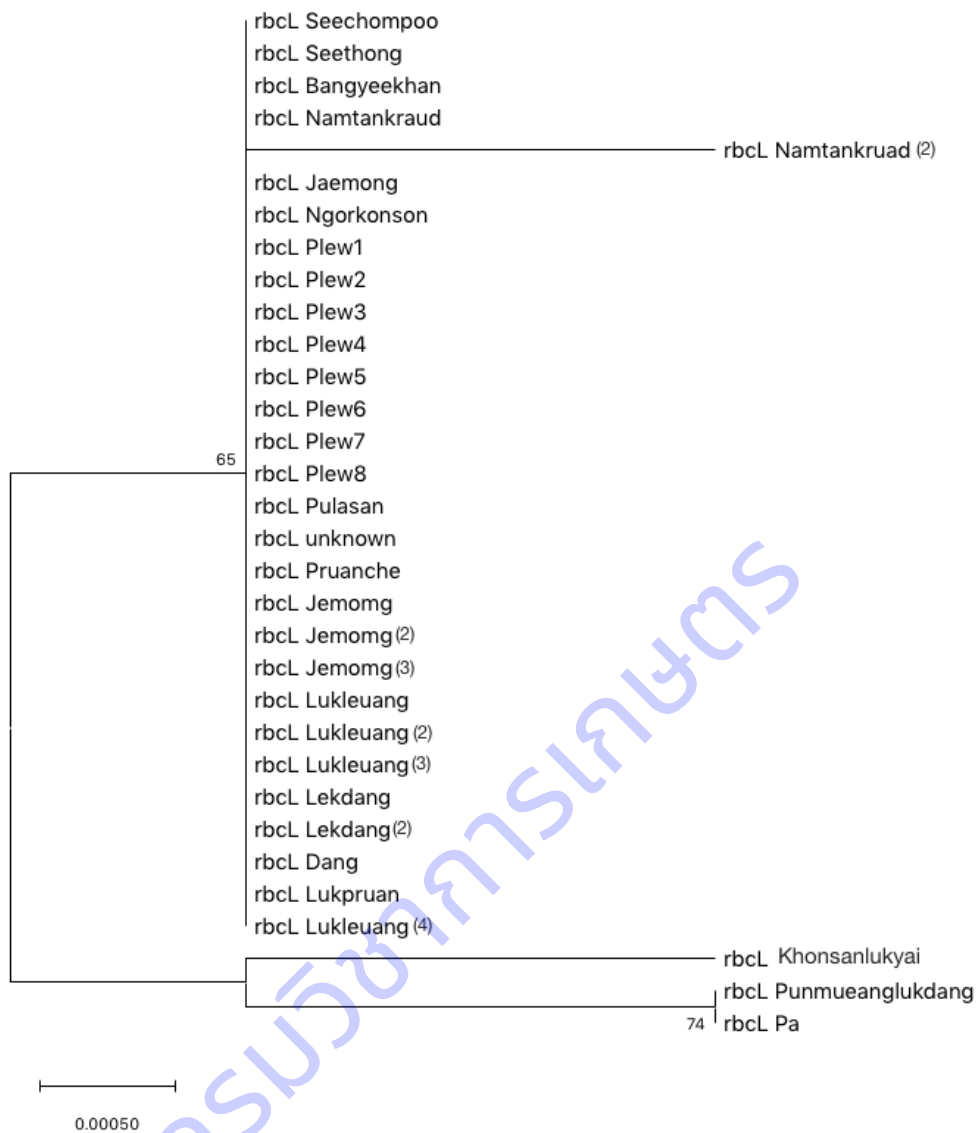
บางยี่ง่า
พืชสวน
กลุ่มที่ส
นอกกลุ่ม
และเงาะ
เงาะป่า
rumbo
ขนสั้น
กลุ่มออ
ไม่สาม
หากใช้
อื่น เช่น



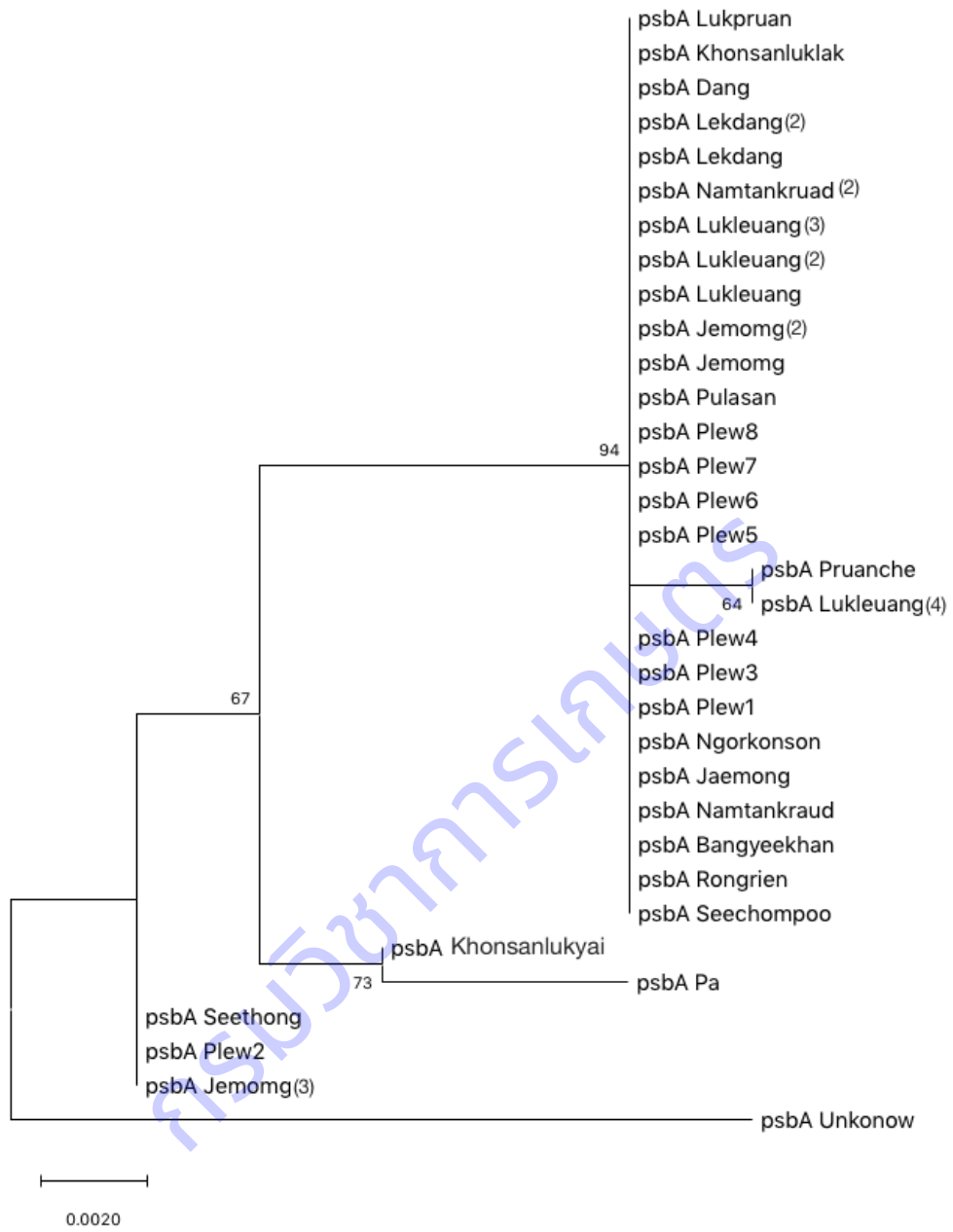
ภาพที่
เงาะ



ภาพที่ 1.2.11 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน rbclA ในการเป็น DNA barcode ของเงาะ

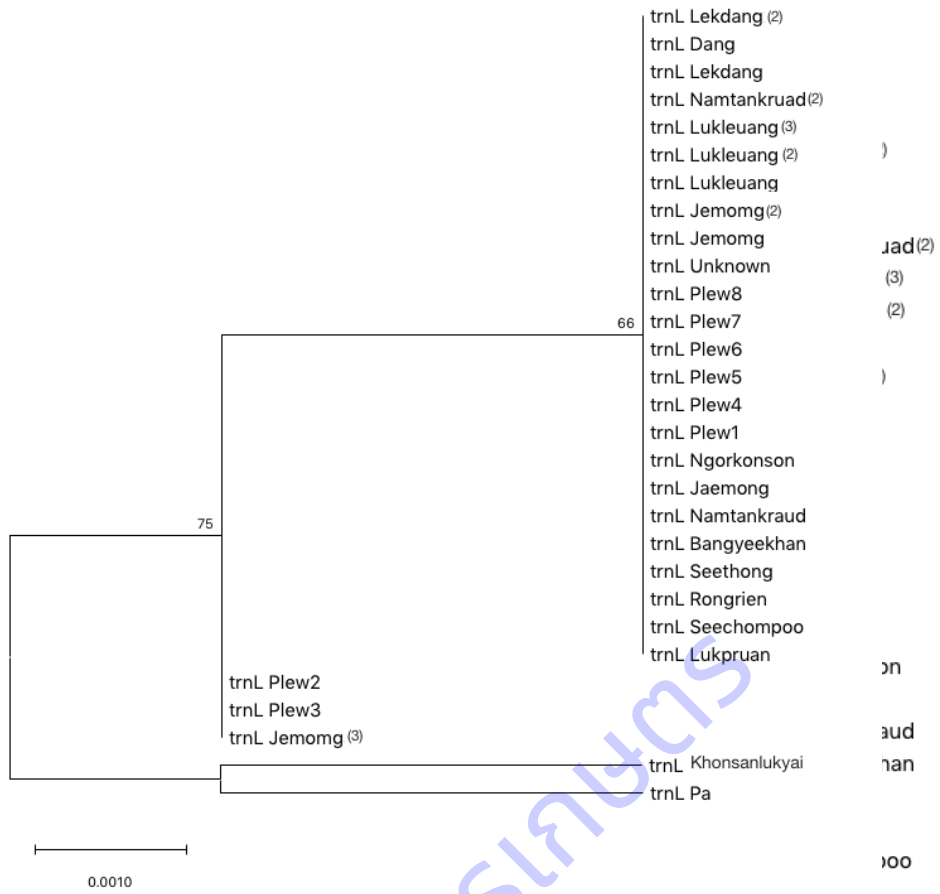


ภาพที่ 1.2.12 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน rbcL ในการเป็น DNA barcode ของเงาะ

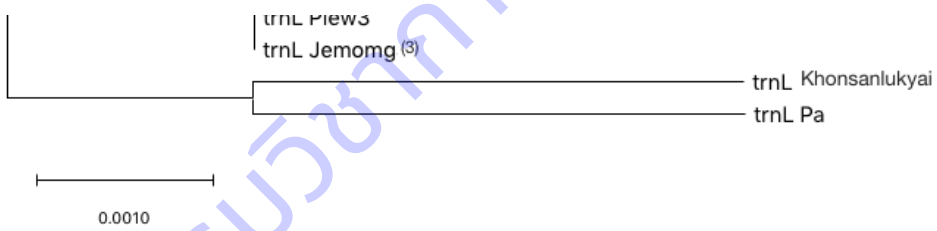


ภาพที่ :

วงเงา



ภาพที่ 1



เงา

ภาพที่ 1.2.15 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน trnL ในการเป็น DNA barcode ของเงาะ

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การศึกษาโดยใช้ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเงาะ จำนวน 36 ตัวอย่างจากแปลงรวบรวมพันธุ์ใน 2 พื้นที่คือ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ซึ่งมีลักษณะ สันฐานที่แตกต่างกันทั้งในส่วนของลักษณะใบ และลักษณะผล ยังไม่สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายใน ระดับสปีชีส์ได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ยีนบริเวณrbcLArbcLpsbA และ trnL สามารถแยก ขนสั้นลูกใหญ่ และเงาะป่า ออกจากเงาะพันธุ์อื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากทั้งสองพันธุ์เป็นเงาะต่างชนิด กล่าวคือ เงาะขนสั้นลูกใหญ่*N. rumboutan-ake* Leenh) และ เงาะป่า *Nephelium* sp. แต่ เงาะที่มีสปีชีส์ แตกต่างจากพันธุ์อื่นคือ ขนสั้นลูกเล็ก (*N. mutabile*) และ คอแลน (*N. hypoleucom* Kurz.) ยังไม่สามารถแยก กลุ่มออกมาได้ และยีนบริเวณ MatK1R และ psbA สามารถแยกกลุ่มของ สีทอง เจ้เมง(3) และพลั่ว2 ซึ่งในกลุ่มนี้ พบว่า พลั่ว2 เป็นลูกผสมของสีทองและเจ้เมง นอกจากนี้ยังพบว่า ยีนบริเวณ rpoC มีแนวโน้มที่จะสามารถแยกตัว อย่างเงาะที่ปลูกจากสถานที่ต่างกันได้

ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดอาจต้องมีการพัฒนาเพิ่มเติมเพื่อให้ สามารถศึกษาความหลากหลายได้แม่นยำขึ้น โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ เช่น GBS เป็นต้น

การทดลองที่ 1.3

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัว
DNA Barcoding and Genetic Diversity of Lotus

คณะผู้วิจัย

อรุณทัย ชาววาอรรณพล รุกขพันธุ์อัญชลี แก้วดวงสุดใจ ล้อเจริญกาญจนา พฤษพันธ์ สุภาภรณ์ สาชาติ
Aroonothai SawwaAuttapon RukkaphanAnchalee Keawdongsudchai
LocharoenKanchana PruesapanSupaporn Sachati

คำสำคัญ : บัวหลวง บัวสาย ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Key words : *Nelumbo nucifera*, *Nymphaea* sp., DNA barcode

บทคัดย่อ

บัวเป็นพืชล้มลุกนอกจากมีความสวยงามใช้เป็นไม้ดอกไม้ประดับได้แล้ว ยังมีประโยชน์และคุณค่าทางสมุนไพร ซึ่งประเทศไทยมีศักยภาพสูงในการผลิตบัวในระดับชั้นนำของโลกได้ อย่างไรก็ตามการพัฒนาสายพันธุ์บัวของไทยยังขาดข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมและข้อมูลชีวโมเลกุล การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัว ผลการทดลองพบว่า ไพรมเมอร์บาร์โค้ดสากลของพืช ได้แก่ ยีน *ITS matK rpoC1* และ *RbcL* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในตัวอย่างบัวทั้ง 2 ชนิด คือ บัวสาย (*Nymphaea lotus*) และ บัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) จำนวน 34 ตัวอย่าง มีขนาดแถบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสประมาณ 750 950 650 และ 450 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGAx โดยสร้างแผนผังพันธุกรรม แบบ ML (Maximum Likelihood) สามารถแยกกลุ่มพันธุกรรมของตัวอย่างบัวสายออกจากบัวหลวงได้อย่างชัดเจน โดยมีค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุดจากยีน *ITS matK rpoC1* และ *RbcL* อยู่ที่ 0.481 0.207 0.030 และ 0.082 ตามลำดับ การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างบัว ได้คัดเลือกชิ้นส่วนยีน *ITS* และ *rpoC1* มาใช้กับตัวอย่างบัวที่เก็บอนุรักษ์ไว้ทั้งหมด จำนวน 162 ตัวอย่าง แบ่งเป็น บัวหลวง 110 ตัวอย่าง และบัวสาย 52 ตัวอย่าง โดยยีน *ITS* มีค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุดอยู่ที่ 1.08 และยีน *rpoC1* มีค่า 0.08 ทั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างบัวทั้งหมดจะนำไปลงทะเบียนในฐานข้อมูล NCBI ต่อไป อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงร่วมกับการลงทะเบียนจะช่วยความน่าเชื่อถือมากขึ้น

Abstracts

Lotus is an annual plant with a beautiful flower, can be used as an ornamental plant, and also has benefits of medicinal value. Thailand has high potential for lotus crop production at the world leading level. However, the development of Thai lotus varieties lacks genetic diversity and biomolecular data. This research aims to study of DNA barcode and genetic diversity in lotus. Results, the universal primers of a partial from *ITS matK rpoC1* and *RbcL* gene, could be generated DNA product in 34 samples of both *Numphaea lotus* and *Nelumbo nucifera*. The DNA band size approximately 750 950 650 and 450 bp respectively. The genetic relationship was analyzed with the MEGAx program by generating ML (Maximum Likelihood). It was clearly separate the genotype of *Numphaea lotus* from *N. nucifera*. The highest genetic distance index of *ITS matK rpoC1* and *RbcL* were 0.481 0.207 0.030 and 0.082 respectively. The *ITS* and *rpoC1* fragments were selected to prepare the DNA barcode of 162 samples, 101 samples of *Numphaea lotus* and 52 samples of *Nelumbo nucifera*. The *ITS* and *rpoC1* results showed that highest genetic distance index at 1.08 and 0.08 respectively. All lotus nucleotide sequences will further registered in the NCBI database. However, the DNA barcode registration with voucher specimens will provide more credibility

บทนำ (Introduction)

ประเทศไทยมีศักยภาพสูงในการผลิตไม้ดอกไม้ประดับจนสามารถเป็นสินค้าส่งออกเนื่องจากประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่เอื้ออำนวย ต้นทุนด้านการผลิตต่ำ เกษตรกรและผู้ปลูกเลี้ยงมีความมุ่งมั่นในการพัฒนาสายพันธุ์อยู่ตลอดเวลาบัวจึงพืชอีกชนิดหนึ่งที่ไทยสามารถผลิตได้ในระดับชั้นนำของโลกนอกจากจะมีความสวยงามจนใช้เป็นไม้ดอกไม้ประดับได้แล้ว ยังเป็นพืชที่มีประโยชน์และคุณค่าทางสมุนไพรด้วย อย่างไรก็ตามการพัฒนาสายพันธุ์บัวของไทยยังมีข้อจำกัดของการผลิตอีกมาก เช่น ความรู้ด้านเทคโนโลยี การศึกษาการใช้ประโยชน์จากส่วน

ต่างๆ การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าและเทคโนโลยีการขยายพันธุ์เทคโนโลยีภายหลังการเก็บเกี่ยว การคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญา ตลอดจนการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชนิดและสายพันธุ์ รวมถึงการจัดทำฐานข้อมูลชีวโมเลกุล ซึ่งเป็นปัญหาที่จำเป็นต้องได้รับการแก้ไข เพื่อให้ประเทศไทยได้อยู่ในสถานะภาพผู้นำด้านบัวของโลก

จากความก้าวหน้าทางชีววิทยาโมเลกุล ทำให้เกิดเทคนิคใหม่ๆ ขึ้นมากมายที่เป็นประโยชน์ต่อการพิสูจน์ทราบหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพืชและจัดทำฐานข้อมูลชีวโมเลกุล จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้อาทิเช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis, Diagnostic Polymerase Chain Reaction (PCR), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านี้มีข้อดีและข้อจำกัดต่างกันไป นอกจากเทคนิคข้างต้นแล้ว การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) เป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่กำลังได้รับความสนใจ เพราะเป็นเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิต ซึ่งเดิมใช้การจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการจำแนกด้วยลักษณะรูปร่างมีข้อจำกัดในเรื่องของรูปร่างที่ใกล้เคียงกันมาก แต่เป็นคนละชนิด ทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจึงเริ่มพัฒนาขึ้นจากการจำแนกสิ่งมีชีวิตที่เป็นสัตว์และแมลง โดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดสูงกว่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดเดียวกัน จึงเหมาะในการสร้างไพรเมอร์จากด้านปลาย 5' ของดีเอ็นเอที่เป็นบริเวณอนุรักษ์สามารถนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่ายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ต่อมาจึงได้นำมาประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวกับพืช โดยกลุ่มยีนที่สนใจเป็นดีเอ็นเอของพลาสติด เช่น ยีนบนคลอโรพลาสจโนม ได้แก่ *maturase K (matK)* *rubisco L (rbcL)* เป็นต้น ดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้รับความสนใจมาก เพราะมีประสิทธิภาพ และความแม่นยำ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ในระยะเวลาอันสั้น ช่วยยืนยันการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาให้เป็นไปอย่างถูกต้อง รวดเร็ว รวมทั้งเป็นประโยชน์สำหรับการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ รวมถึงการอนุรักษ์พันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอีกด้วย

บัวเป็นพืชล้มลุก ลักษณะลำต้นมีทั้งที่เป็นเหง้า ไหล หรือหัว ใบเป็นใบเดี่ยวเจริญขึ้นจากลำต้น โดยมีก้านใบส่งขึ้นมาเจริญที่ใต้น้ำ ผิวหน้า หรือเหนือน้ำ รูปร่างของใบส่วนใหญ่กลมมีหลายแบบ บางชนิดมีก้านใบบัว บัวเป็นราชินีแห่งไม้น้ำ จัดเป็นพันธุ์ไม้น้ำที่ถือเป็นสัญลักษณ์ของคุณงามความดี บัวหลวงชอบขึ้นในน้ำจืด ออกดอกตลอดปี ชอบน้ำสะอาด อยู่ในน้ำลึกพอสมควร จะเริ่มบานตั้งแต่ตอนเช้า ก้านดอกยาวมีหนามเหมือนก้านใบ ชูดอกเหนือน้ำ และชูสูงกว่าใบเล็กน้อย กลีบเลี้ยง 4-5 กลีบ สีขาวอมเขียว หรือเทาชมพู ร่วงง่าย กลีบดอกจำนวนมากเรียงซ้อนหลายชั้น เกสรตัวผู้มีจำนวนมากหลายสีนักพฤกษศาสตร์ แบ่งบัวออกเป็น 3 สกุลใหญ่คือสกุลเนลุมโบ (Nelumbo) หรือ ปทุมชาติสกุลนิมเฟีย (Nymphaea) หรือ อุกุลชาติ และสกุลวิกตอเรีย (Victoria) หรือ บัววิกตอเรียในแต่ละสกุลสามารถจำแนกได้หลายชนิด สำหรับในประเทศไทยชนิดของบัวที่ปลูกเป็นการค้ามี 6 ชนิด ปทุมชาติ

1. บัวหลวง (Lotus) อยู่ในสกุลปทุมชาติ ลักษณะใบชูเหนือน้ำ เจริญเติบโตโดยมี ไหลอยู่ใต้ดิน ขอนไขไปใต้พื้นดิน ใบมีขนาดใหญ่ ดอกมีทั้งดอกซ้อนและไม่ซ้อน ใบและดอกชูเหนือน้ำ ในประเทศไทยมีอยู่ 4 พันธุ์ แต่พันธุ์ของบัวหลวงที่นิยมปลูกในปัจจุบัน ได้แก่ พันธุ์ฉัตรขาว ฉัตรแก้ว และฉัตรแดง

2. บัวฝรั่ง (Hardy Water-Lily) อยู่ในสกุลอุบลชาติยืนต้น มีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่น และเขตหนาว ลักษณะคล้ายบัวหลวง ต้นอ่อน เจริญเติบโตโดยสร้างลำต้น หรือเหง้า เจริญตามแนวอนใต้น้ำ ลักษณะใบมีทั้ง

ขอบเรียบ และขอบใบจัก ดอกลอยแฉะผิวน้ำ หรือชูเหนือน้ำเล็กน้อย ดอกมีหลายสี กลีบดอกซ้อนสวยงาม มีชื่อเรียกต่างกันตามลักษณะสีและดอก สี ตามผู้พัฒนาพันธุ์ขึ้น

3. บัวผัน บัวเผื่อน (Tropical Water-Lily) อยู่ในสกุลอุบลชาติล้มลุก ต้นที่งอกจากเมล็ดจะเจริญตามแนวตั้งขึ้นสู่ผิวน้ำ แล้วแตกก้านใบบนผิวน้ำ ดอกชูพื้นน้ำ บานในเวลาเช้าหรือกลางวัน และหุบตอนเย็น ดอกมีกลิ่นหอมมาก เป็นบัวชนิดที่ขยายพันธุ์ได้ช้า ผสมพันธุ์ข้ามระหว่างสีต่างๆ ได้ง่าย โดยแมลงในธรรมชาติ และฝีมือมนุษย์ บัวชนิดนี้จึงเกิดสีสันต่างๆ นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ ขยายพันธุ์ง่าย ดูแลง่าย หาซื้อได้ตามร้านขายทั่วไป ระยะเวลาละ 25 - 50 บาท

4. บัวสาย อยู่ในสกุลอุบลชาติ เป็นบัวที่ชาวบ้านนิยมเก็บสายบัวมาทำอาหาร บัวชนิดนี้มีก้านใบ และก้านดอกยาว สามารถขึ้นอยู่ในระดับน้ำลึกๆ ได้ พบได้ทั่วไปตามหนองบึง และแหล่งธรรมชาติตามชนบท มีหัวกลมๆ สายขนาดปลายนิ้วก้อย มีขนเล็กน้อย ใบมน ขอบใบจัก ดอกบานกลางคืน และหุบเวลาเช้า

5. บัวจงกลนี อยู่ในสกุลอุบลชาติ เป็นบัวที่พบใหม่ในธรรมชาติคาดว่าเกิดจากการแปลงพันธุ์ในธรรมชาติ ใบเหมือนบัวตระกูลบัวผัน บัวเผื่อน แต่ดอกซ้อนเหมือนบัวฝรั่ง มีเหง้าใต้ดินเจริญเติบโตในแนวตั้ง ต้นอ่อนจะเกิดจากเหง้าใต้ดินเจริญเติบโตขึ้นมาจากต้นแม่ ใบลอยอยู่แฉะผิวน้ำ ดอกลอยแฉะผิวน้ำเล็กน้อย

6. บัวกระดัง อยู่ในสกุลวิกตอเรีย จัดเป็นบัวขนาดใหญ่ที่สุด มีลำต้นใต้ดินเป็นหัวใหญ่ ใบเป็นใบเดี่ยวมีขนาดใหญ่ประมาณ 6 ฟุต ลอยบนผิวน้ำ ใบ ก้านใบ ก้านดอก มีหนามแหลมอยู่ทั่ว มีดอกสีขาว และสีชมพู ดอกมีกลิ่นหอมแรง บานตอนกลางคืน และหุบในตอนเช้า เป็นบัวที่ต้องใช้พื้นที่ปลูกมาก และมีปัญหาากบัวหลุดลอยขึ้นสู่ผิวน้ำหากระดับน้ำที่ปลูกมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอย่างกะทันหัน

ในจำนวนบัวทั้ง 6 ชนิดนี้ บัวหลวงนับเป็นบัวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุด และเกษตรกรปลูกมากที่สุด โดยมีวัตถุประสงค์ของการปลูก 2 ประการ คือ ปลูกเพื่อตัดดอกตูม ซึ่งนำไปใช้บูชาพระ และปลูกเพื่อเก็บเมล็ด ซึ่งสามารถใช้ประกอบอาหารทั้งคาวหวาน นอกจากนี้ส่วนอื่นของบัวหลวงก็สามารถจำหน่ายและใช้ประโยชน์อื่นๆ ได้ เช่น ใบแห้งใช้ทำยาแก้นิ่ว มวนบุหรี่ยุคต้มเป็นยาไทยบำรุงหัวใจ แก้ไข และรักษาโรคตับ, ใบสด ใช้ห่ออาหาร และไหลหรือราก สามารถนำมาเชื่อมเป็นอาหารหวาน มีสรรพคุณแก้ร้อนใน และระงับอาการท้องร่วงได้อีกด้วย(ภทร, 2553)

ดอกบัวหลวง (*Nelumbo nucifera Gaerth.*) หรือเรียกว่า sacred หรือ Indian lotus จัดเป็น perennial herbaceous aquatic crops มีหลากหลายพันธุ์มีสีขาว เหลือง ชมพูและแดง พันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์คุณทริภิกษุ ปทุม สัตตบุษย์ และสัตตบงกชนิยมนำมาบูชาพระ และปัจจุบันนำมาใช้ในการตกแต่งสถานที่ในงานเลี้ยงสังสรรค์ งานแต่งงาน หรืองานต่างๆ ในโรงแรม ทำให้มีการใช้ดอกบัวหลวงมากขึ้น และมีการส่งไปจำหน่ายในต่างประเทศ เช่น ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น เป็นต้น แหล่งปลูกดอกบัวหลวงที่สำคัญอยู่ในเขตภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี และสุพรรณบุรี พันธุ์ที่ปลูกส่วนใหญ่เป็นพันธุ์สัตตบุษย์ และสัตตบงกช (วชิรญา, 2553)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวในประเทศไทยมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการศึกษา เช่น เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) และ Simple Sequence Repeat (SSR) เป็นต้น (กนกวรรณ และคณะ, 2551; Yang *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามเทคนิค RAPD และ AFLP มีข้อจำกัดตรงที่หากมีตัวอย่างมาเพิ่มเติมต้องเริ่มการทดลองใหม่ทั้งหมดไม่สามารถนำแถบดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละครั้งมาเปรียบเทียบกันเพื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ สำหรับเทคนิค SSR ของ Yang และคณะนั้น ต้องทำการรันเจลชนิดอะครีลาไมด์ถึงจะมองเห็นแถบดีเอ็นเอที่ห่างกันเพียง 50 เบส หากน้อยกว่านั้นก็ไม่สามารถแยกความแตกต่างด้วยตาเปล่าได้ จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ช่วยในการแยกความแตกต่างในช่วง 3-20 เบส ซึ่งมีราคา

สูง บางห้องปฏิบัติการไม่สามารถทำได้ ดังนั้นการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจึงเป็นอีกวิธีทางเลือกที่สามารถนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และการจำแนกชนิดหรือพันธุ์พืชได้

นักวิทยาศาสตร์ได้นำแนวคิดการติดฉลากบาร์โค้ดในสินค้ามาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิทยาศาสตร์ โดยนำดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม ที่แสดงลักษณะเฉพาะของแต่ละสิ่งมีชีวิตหรือแต่ละบุคคล (Individual) มาเป็นเครื่องหมายในการระบุสิ่งมีชีวิตหรือเรียกว่า “ดีเอ็นเอบาร์โค้ด” (DNA barcode) เพื่อเพิ่มความรวดเร็วและถูกต้อง ในการระบุชนิด (Species) สิ่งมีชีวิตและยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ การค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ รวมถึงการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ บาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตต้องเป็นสมบัติเฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่น ง่ายต่อการใช้ และมีความชัดเจน ดังนั้นการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดจึงเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั้น สอดคล้องกับการใช้งาน เหมาะสมและสามารถแสดงความแตกต่างระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตสูง แต่มีความต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตในชนิดเดียวกันต่ำ ยีน (Gene) แรกที่นำมาใช้เป็นมาตรฐานเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดในสัตว์ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Cytochrome c Oxidase I* (COI) ในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างระหว่างชนิดมากกว่าในชนิดเดียวกัน การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทำได้โดยตรงไปตรงมา เพราะมีการแทรกเข้ามาและการหลุดหายของนิวคลีโอไทด์น้อย จึงนำยีนนี้มาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดและจำแนกชนิดของแมลงและสัตว์ (พรณรงค์และอรุณรัตน์, 2554) ต่อมาในพืชการหาบาร์โค้ดที่เป็นมาตรฐานจึงเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้น ซึ่งสิ่งสำคัญในการคัดเลือกบาร์โค้ดที่ได้มาตรฐาน คือ ต้องเป็นส่วนของยีนที่มีลักษณะสั้น สามารถเพิ่มปริมาณได้ง่าย เหมาะสำหรับทำงานตัวอย่างเยาะ และวิเคราะห์ลำดับเบสได้ง่าย จากการศึกษาบาร์โค้ดในพืช ตั้งแต่ปี 2005-2010 มีการนำยีนจากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ITS, *accD*, *matK*, *ndhJ*, *rpoB*, *rpoC1*, *ycf*, *atpF-H*, *psbK-I*, *rbcL*, *rbcLa*, *trnH-psbA* และ *trnL(P6)* เป็นต้น แต่ที่ได้รับความสนใจได้แก่ยีนจากส่วนของนิวเคลียส ได้แก่ ITS และส่วนที่มาจากพลาสติด (plastid) เช่น *matK*, *rpoB*, *rpoC1*, *atpF-H*, *psbK-I*, *rbcL* และ *trnH-psbA* ซึ่งสามารถนำลำดับเบสมาต่อกันเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของพืชที่มีความใกล้เคียงกันสูงได้ (Hollingsworth *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2014) ยีนที่ถูกแนะนำให้นำมาต่อกันเพื่อใช้ในการจำแนกพืชบก (land plants) ได้แก่ *matK + rbcL* เนื่องจากมีความชัดเจน สามารถเพิ่มปริมาณได้ง่ายเหมาะสมสำหรับงานที่ต้องทำเป็นประจำ และสามารถแบ่งแยกกลุ่มได้ดีกว่ายีน COI ในสัตว์ (Janzen, 2009) อย่างไรก็ตามพืชที่มีความใกล้เคียงกันสูงสามารถนำเอาส่วนของยีนมาต่อกันได้หลายยีน เช่น ITS + *matK*, *rpoC1 + rpoB + matK*, *rpoC1 + matK + trnH-psbA*, *rbcL + trnH-psbA*, *matK + trnH-psbA*, *rbcL + trnH-psbA*, *matK + atpF-H + psbK-I* และ *matK + atpF-H + trnH-psbA* เป็นต้น (Yu *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015)

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าประเทศไทยจะมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวไว้แล้วด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่หลากหลาย แต่ก็ยังขาดฐานข้อมูลทางชีวโมเลกุลของบัว ซึ่งปัจจุบันฐานข้อมูล NCBI ยังไม่พบข้อมูลด้านดีเอ็นเอบาร์โค้ดของบัวหลวงในประเทศไทยมากนัก จากการค้นข้อมูลเดือนมิถุนายน 2559 ในฐานข้อมูล NCBI ของยีน *rpoC1*, *trnH-psbA*, *matK* และ *rbcL* จากบัวหลวง พบว่ามีข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากยีน *rpoC1* ในบัวหลวงของประเทศไทยเพียง 2 accessionno. ซึ่งมีความยาวประมาณ 551 เบสและยังไม่พบดีเอ็นเอบาร์โค้ดในยีนอื่น ทั้งนี้กรมวิชาการเกษตรเป็นหน่วยงานหนึ่งที่มีการศึกษาวิจัยและอนุรักษ์พันธุกรรมของบัว มีการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์บัวขึ้นมาใหม่ รวมถึงมีการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น จึงจำเป็นต้องศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้นำเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจัดทำข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของบัว เพื่อใช้ประโยชน์ในการจำแนก การปรับปรุงพันธุ์บัว การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และการอนุรักษ์พันธุกรรมของบัวในประเทศไทยต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย(Research Methodology)

อุปกรณ์

1. สารเคมีที่สำคัญ ได้แก่ CTAB(cetyltrimethylammonium bromide), Tris-HCl, Tag DNA polymerase, sodium EDTA, PVP (Polyvinylpyrrolidone), Acetic acid และ NaCl เป็นต้น
2. เครื่อง spectrophotometer (PERKIN ELMER MBA2000)
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
5. ชุดถ่ายภาพและ UV Transilluminators (BIORAD)
6. เครื่องตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนพีซีอาร์ (QIAXcel Advanced System)
7. เครื่องตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนพีซีอาร์ (ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer)
8. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

วิธีการ

1. การทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์บาร์โค้ดสากลของพืชกับตัวอย่างบัว

1.1 ตัวอย่างบัว

การเก็บตัวอย่างใบบัวที่เก็บรวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์ไว้ของสถาบันวิจัยพืชสวน ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ จำนวน 34ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างบัวสาย 10 ตัวอย่าง และบัวหลวง 24 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1.3.1)

ตารางที่ 1.3.1 ตัวอย่างบัวที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์บาร์โค้ดสากล

ลำดับที่	ชนิดบัว	รหัสดีเอ็นเอ	ชื่อตัวอย่าง/รหัสการเก็บอนุรักษ์
1	บัวสาย (<i>Nymphaea lotus</i>)	Nym 1001	Nyp_A011
2	บัวสาย (<i>Nymphaea lotus</i>)	Nym 1002	Nyp_A017
3	บัวสาย (<i>Nymphaea lotus</i>)	Nym 1006	Nyp_B003
4	บัวสาย (<i>Nymphaea lotus</i>)	Nym 1007	Nyp_A003*
5	บัวสาย (<i>Nymphaea lotus</i>)	Nym 1008	Nyp_A004
6	บัวสาย (<i>Nymphaea lotus</i>)	Nym 1009	Nyp_A005*
7	บัวสาย (<i>Nymphaea lotus</i>)	Nym 1010	Nym_Hb013
8	บัวสาย (<i>Nymphaea lotus</i>)	Nym 1011	Nym_Hb014
9	บัวสาย (<i>Nymphaea lotus</i>)	Nym 1017	Nym_Sp005
10	บัวสาย (<i>Nymphaea lotus</i>)	Nym 1020	Nym_Sp008
11	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1021	N.lutea
12	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1022	ปทุม1
13	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1023	Nnu_A010

ตารางที่ 1.3.1(ต่อ)ตัวอย่างบัวที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์บาร์โค้ดสากล

ลำดับที่	ชนิดบัว	รหัสดีเอ็นเอ	ชื่อตัวอย่าง/รหัสการเก็บอนุรักษ์
14	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1025	Nnu_A005
15	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1026	Nnu_A016
16	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1027	Nnu_B007
17	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1028	Nnu_B006
18	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1029	Nnu_B003
19	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1030	Nnu_B005
20	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1031	Nnu_B001
21	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1032	Nnu_C001
22	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1033	Nnu_C002
23	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1034	Nnu_C003
24	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1035	Nnu_C005
25	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1036	Nnu_D004
26	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1037	Nnu_D005
27	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1038	Nnu_D006
28	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1039	Nnu_A001
29	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1040	ลูกผสมจีน
30	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1041	ยโสธร1
31	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1042	Nnu_A003
32	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1043	ขอนแก่น6
33	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1044	ลูกผสมบางพระ 3/2
34	บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	Nu 1045	ประจวบ 29

1.2 การสกัดดีเอ็นเอของบัว

นำใบบัวจากตัวอย่างบัว 34ตัวอย่าง แบ่งเป็นบัวหลวง 24 ตัวอย่าง และบัวสาย 10 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุณทัตย์และคณะ (2552) ดังนี้เตรียมบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

[ประกอบด้วย 20 mM sodium EDTA, และ 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2% (W/V) และ CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2% β -mercaptoethanol นำบัฟเฟอร์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ก่อนการใช้งาน จากนั้นชั่งใบบัว 0.5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผง แบ่ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำหลอดบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (เขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำหลอดออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมโดยการกลับหลอดไปมา 10 นาที นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc ปริมาตร 0.1 เท่า และ Isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่า นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทั้ง ตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าความเข้มข้น (Optical Density) โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสงที่ A260/A280

1.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์บาร์โค้ดสากลของพืชกับตัวอย่างบัว 34 ตัวอย่าง แบ่งเป็นบัวหลวง 24 ตัวอย่าง และบัวสาย 10 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 ยีนได้แก่ *RpoC1* *RbcL* *MatK* และ ITS (ตารางที่ 1.3.2)

ตารางที่ 1.3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
rpoC1F	GGCAAAGAAGGAAGATTTTCG	Paween <i>et al.</i> , 2011
rpoC1R	TGAGAAAACATAAGTAAACGAGC	Paween <i>et al.</i> , 2011
rbcL_F	ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC	Paween <i>et al.</i> , 2011
rbcL_R	CTTCGGCACAAAATAAGAAACGATCTC	Paween <i>et al.</i> , 2011
matK_1F	ATCCATATGGAAATCTTGGTTC	Paween <i>et al.</i> , 2011
matK_1R	GTTCTAGCACACGAAAGTCG	Paween <i>et al.</i> , 2011
ITSu1	GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG	Cheng <i>et al.</i> , 2016
ITSu4	RGTTTCTTTTCCTCCGCTTA	Cheng <i>et al.</i> , 2016

1.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction)

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้น้ำยา Green Gotaq® Flexi (Promega, USA) ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ 5X Green Gotaq® Flexi ปริมาตร 20 ไมโครลิตร 25 mM MgCl₂ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร 2 mM dNTP ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward (5uM) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ reverse (5uM) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร Gotaq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาปริมาตรทั้งหมด 100 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ตามขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวน cycles
---------	----------	------	--------------

Initial denaturation	94 °C	3 นาที	1 cycle
Denaturation	94 °C	30 วินาที	} 35 cycle
Annealing	55 °C	30 วินาที	
Extension	72 °C	30 วินาที	
Final extension	72 °C	7 นาที	1 cycle

1.5 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

ทำการตรวจสอบผล PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

1.6 การทำชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ (PCR purification)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 1.4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® PCR Purification Kit ยี่ห้อ Invitrogen ดังนี้ นำพีซีอาร์ 100 ไมโครลิตร มาเติม PureLink® Binding Buffer (B2) จำนวน 1 เท่าคือ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดของเหลวใส่ลงใน PureLink® Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วปั่นคอลัมน์ให้แห้งอีกรอบนาน 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นชะผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

1.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำตัวอย่างบัว 34 ตัวอย่าง วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' และ 3' ทำการตรวจสอบและคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีภาพโครมาโตแกรมที่สมบูรณ์ มาเปรียบเทียบกับโปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) เพื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เหมาะสม และได้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความยาวเท่ากัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGAx ตามรายงานของ Kumar *et.al.*, 2018 โดยสร้างแผนผังพันธุกรรมด้วยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

2. การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างบัว

2.1 ตัวอย่างบัว

ใช้ตัวอย่างใบบัวที่เก็บรวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์ไว้ของสถาบันวิจัยพืชสวน ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ จำนวน 162 ตัวอย่าง แบ่งเป็น บัวหลวง 110 ตัวอย่าง และบัวสาย 52 ตัวอย่าง (ตารางผนวกที่ 1)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอของบัว

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างบัว 162 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CTAB ตามวิธีการในข้อ 1.1

2.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกมาจากการขั้นตอนที่ 1 จำนวน 2 ยีน ได้แก่ ITS และ *Rpo* (ตารางที่ 2)

2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ ตามวิธีการในข้อ 1.4

2.5 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

ทำการตรวจสอบผล PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีการในข้อ 1.5

2.6 การทำชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ (PCR purification)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 2.4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® PCR Purification Kit ยี่ห้อ Invitrogen ตามวิธีการในข้อ 1.6

2.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำตัวอย่างบัว 162 ตัวอย่าง วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' และ 3' ทำการตรวจสอบและคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีภาพโครมาโตแกรมที่สมบูรณ์ มาเปรียบเทียบกับโปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) เพื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เหมาะสม และได้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความยาวเท่ากัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGAx ตามรายงานของ Kumar *et al.*, 2018 โดยสร้างแผนผังพันธุกรรมด้วยวิธี ML (Maximum Likelihood) ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

2.8 การทำพรรณไม้อ้างอิง

ทำการเตรียมแผงอัดพันธุ์ไม้ เชือกสำหรับผู้ กระดาษอัดพรรณไม้ ป้ายสำหรับผูกพันธุ์ไม้ ดินสอดำ จากนั้นนำตัวอย่างบัวจำนวน 20 สายพันธุ์ แบ่งเป็น บัวสาย 10 ตัวอย่าง บัวหลวง 10 ตัวอย่าง โดยทำการอัดพันธุ์ไม้แล้วผึ่งให้แห้ง

เวลาและสถานที่

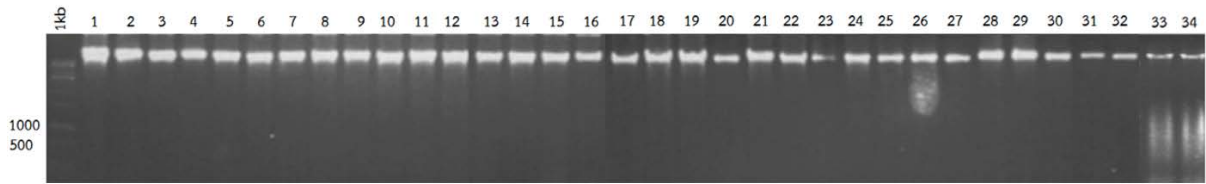
- ระยะเวลาการทดลอง (เริ่มต้น – สิ้นสุด)
ระยะเวลาเริ่มต้นตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2563 รวม 3 ปี
- สถานที่ดำเนินการทดลอง
ห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

ผลการวิจัย (Results)

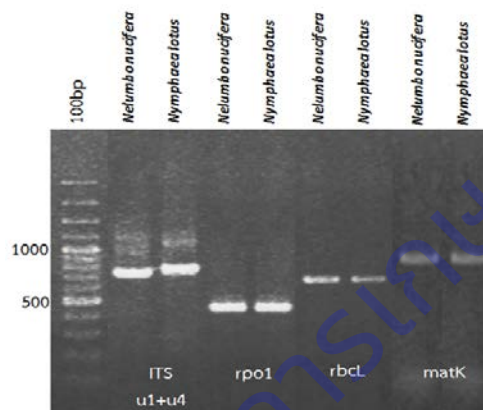
1. การทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์บาร์โค้ดสากลของพืชกับตัวอย่างบัว

การสกัดดีเอ็นเอจากใบบัวทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ บัวสาย (*Nymphaea lotus*) และ บัวหลวง (*Nelumbonucifera*) ด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุโณทัยและคณะ (2552) จำนวน 34 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1.3.1) พบว่า มีค่าความเข้มข้น (Optical Density) ที่ความยาวคลื่นแสงที่ A260/A280 อยู่ในช่วง 1.8 -2.0 และได้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอทางการค้า สามารถแบ่งเก็บรักษาได้จำนวนซ้ำหลายหลอด ทำให้สะดวกต่อการแบ่งเก็บและนำออกมาใช้ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกแบ่งเก็บรักษาแบบระยะยาวไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ในส่วนของการนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอบัวที่ได้ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์สากลที่นิยมใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืช ได้แก่ *RpoC1 RbcL MatK* และ ITS (Li *et al.*, 2011; Paweenet *et al.*, 2011 และ Cheng *et al.*, 2016) ซึ่งการทดลองนี้ทดสอบกับไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ คือ ITSu1+ITSu4 rpoC1F+rpoC1R rbcL_F+ rbcL_R rpo2 และ matK_1F+ matK_1R จากการทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ดังกล่าว สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบัวทั้ง 2 ชนิด และได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีแถบดีเอ็นเอเป้าหมายชัดเจนจำนวนหนึ่ง แถบ (ภาพที่ 1.3.2) จึงมีความเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างบัวเพื่อการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ ได้ผลผลิตพีซีอาร์หรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ยืนยัน *ITS matK rpoC1* และ *RbcL* ขนาดประมาณ 750950 650 และ 450 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปทำบริสุทธิ์ด้วยชุด PCR purification ได้แถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่บริสุทธิ์เพียง 1 แถบ (ภาพที่ 1.3.3) ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์

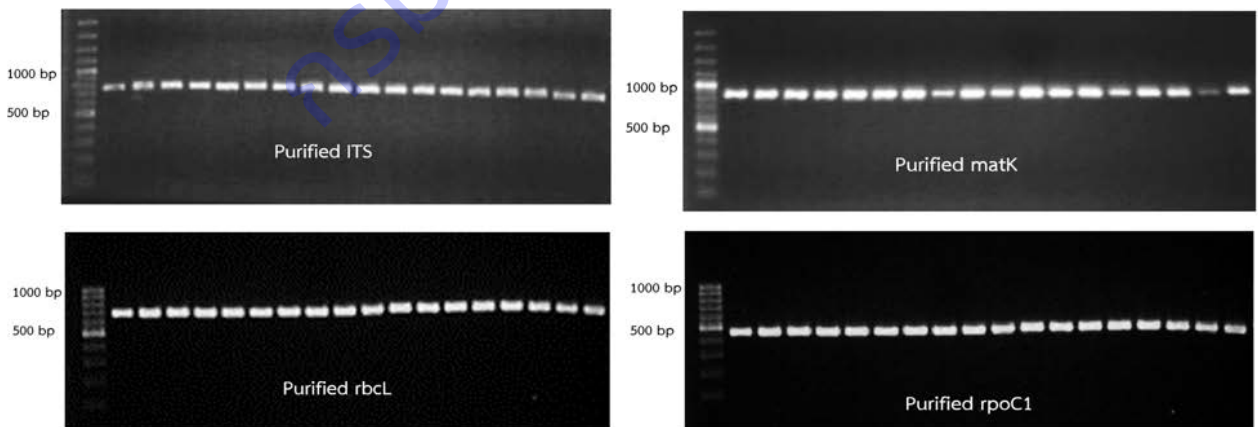
ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งหากผลผลิตพีซีอาร์มีแถบดีเอ็นเออื่นๆ ปะปน จะไม่สามารถทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ ต้องทำการตัดแถบดีเอ็นเอก่อนการทำบริสุทธิ์และการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นการเพิ่มขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในการปฏิบัติงาน



ภาพที่ 1.3.1 ดีเอ็นเอจากใบบัวจำนวน 34 ตัวอย่าง ที่สกัดโดยวิธี CTAB บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1.3.2 ผลผลิตพีซีอาร์ก่อนการทำบริสุทธิ์ จากคูไพรเมอร์ ITSu1+ITSu4 rpoC1F+rpoC1R rbcL_F+rbcL_R rpo2 และ matK_1F+ matK_1R บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

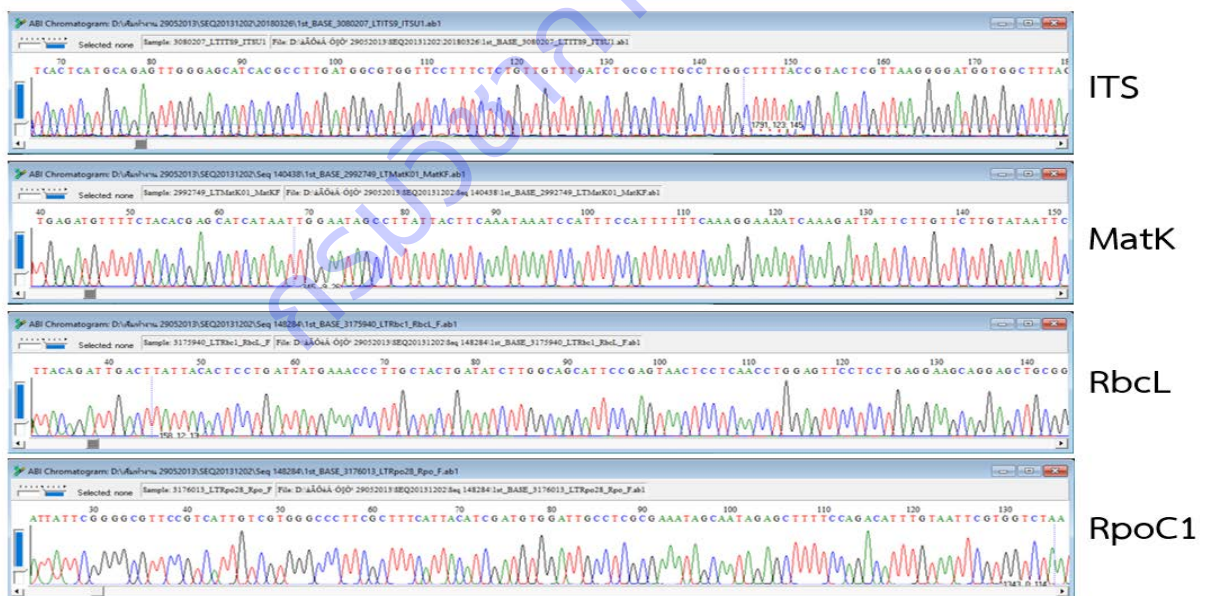


ภาพที่ 1.3.3 แถบดีเอ็นเอจากยีน *ITS*, *matK*, *rpoC1* และ *RbcL* ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ก่อนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งด้านปลาย 5' และ 3' ต้องมีภาพโครมาโตแกรม (Chromatogram) ที่ชัดเจนไม่มีพิกซ้อนทับกัน (ภาพที่ 1.3.4) จึงจะนำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

(alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal Omega เพื่อตรวจสอบและคัดเลือกส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการ โดยตัดส่วนนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5' และ 3' ที่ไม่ได้คุณภาพออกไป ให้ได้ขนาดความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่เท่ากันในทุกตัวอย่าง ตัวอย่างการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของบัวสาย (*Nymphaea lotus*) จากยีน *ITS matK RbcL* และ *rpoC1* ได้ขนาดความยาว 503 600 615 และ 391 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 1.3.5) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เมื่อเทียบกับขนาดแถบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส พบว่าเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *ITS matK RbcL* และ *rpoC1* อยู่ที่ 67 63 94 และ 87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล NCBI พบยีน *ITS* มีคล้ายกับ *N. rubra* *N. nouchali* และ *N. pubescens* ที่ค่าความเหมือน (identity) 98.61 98.21 และ 98.21 ตามลำดับ ยีน *matK* คล้ายกับ *N. pubescens* *N. rubra* และ *N. nouchali* ที่ค่าความเหมือน 100 98.3 และ 98 ตามลำดับ ยีน *rpoC1* คล้ายกับ *N. pubescens* *N. nouchali* และ *N. rubra* ที่ค่าความเหมือน 99.68 99.5 และ 99.03 ตามลำดับ ส่วนยีน *rpoC1* คล้ายกับ *N. capensis* *N. ampla* และ *N. jamesoniana* ที่ค่าความเหมือน 99.74 99.74 และ 99.74 ตามลำดับ

ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบัว 34 ตัวอย่าง ถูกนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGAx โดยสร้างแผนผังพันธุกรรม (Phylogenetic tree) แบบ ML (Maximum Likelihood) ที่ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ ผลการวิเคราะห์พบแผนผังพันธุกรรมของยีน *ITS matK rpoC1* และ *RbcL* สามารถแยกกลุ่มพันธุกรรมของตัวอย่างบัวสายออกจากบัวหลวงได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 1.3.6, 1.3.7, 1.3.8 และ 1.3.9) โดยมีค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุดจากยีน *ITS matK rpoC1* และ *RbcL* อยู่ที่ 0.481 0.207 0.030 และ 0.082 ตามลำดับ (ตารางที่ 1.3.3, 1.3.4, 1.3.5 และ 1.3.6)



ภาพที่ 1.3.4 ภาพลักษณะ Chromatogram ที่นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

```
>ITS
CTGGGGTCGCTTTAGCTGAACAAGAAGCCGAAGCCGCTTGCCCTCAAGAGTCCCAATGGCCTTTCTCGATCAGGTGAGGCACAACCTCACTGGGAAATC
CACCGCTTGTGTGCGGCACAACCTGATCGGCTTAGGCCAAGACGTTTCAACCTACGGCGTGCTTAAAAACAACACGCCGAAGGCCAGTCCTCCGCTC
TCCCTCAGCCTTGGCTCGAAAGCACAAGGGCATGGGAAGGGCGATGCAAAGCTTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTTGGCCGGATGGCCTTGGACGC
AATTGCGTTCAAAAACCTGATGATTCACGGGATTCGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTCCGTACGTTCTTCATCGTGGCCGGAGCCAGATAT
CCGTTGCCGAGAGTCGTTATATTTGGAAGGGAAGAGGGACATCCCGCCACTCTTTCGTGTGGCGGCACGCCCTCTCCTTTCGATCAAAAGTTTTCCTT
GGCACCTAGAGGTTGCCGA
>matK
```


ATGTTTTCTACACGAGCATCATAATGGAAATAGCCTTATTACTTCAAATAAATCCATTTCATTTTTTCAAAGGAAAATCAAAGATTATCTTGTTC
 TTGTATAATTCTCATGTATATGAATGCGAATCCGTATTAGTTTTCTTCGTAACAATCCTCTCATTTACGGTCAATATCTTCTTAGCCTTTCTTG
 AGAGAAAGACATTTTTATGGAAAAATCAAACATCTTGTAGTGACGCCTCATAATGATTCTCAAATGACCCCTGCCCTCTGGTTCTTCAAGGAACCTTT
 GATGCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCCATTATGGCTTCAAGGTGTAATAATTTACTGATGAAGAAATGGAAATATTACCTTGTACATTTCTGG
 CAATGTCATTTTCACTTATGGTCTCAACCGGGTAGGATCCATATAAATGAATTATCCAATCATTTCTATTTTCTGGGCTATCTTTCCGGGTGAC
 GACTAACGCCTTGGGTGATAAGGAGTCAAATGCTAGAGAATTCATTTATGATCGATACAGCTGTTAAGAGATTGATACAATAGTCCCAATTTTTTC
 TCTGATTGGATCGTTGGT

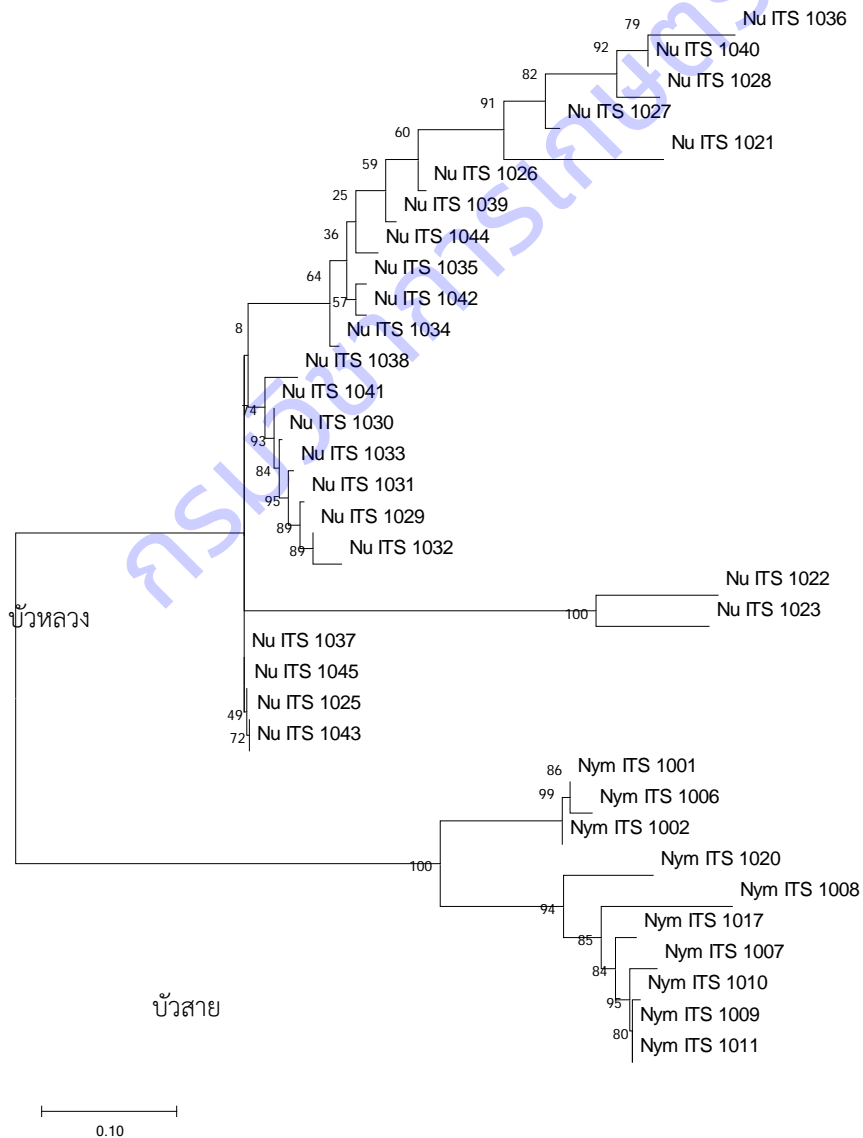
>RbcL

GCTGGTGTAAAGATTACAGATTGACTTATTACACTCCTGATTATGAAACCCCTTGTACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGG
 AGTTCCTCCTGAGGAAGCAGGAGCTGCGGTGGCTGCCGAATCTTCCACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGT
 TACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCTGTTGCTGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTACCCCTTGGACCTTTTGGGAAGGTT
 CTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTAATTTGGGTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAGGATCTGAGAATTCCTCCTGCTTA
 TTCTAAAACCTTTCCAGGGCCACCTCATGGAATCCAAGTTGAGAGAGATAAATGGAACAAGTATGGTCTGCCCTATTGGGATGACTATTAACCA
 AAATTGGGGTTATCTGCAAAGAATATGGGAGAGCGGTTTATGAGTGTCTCCGTGGTGGACTTGATTTTACCAAGGATGATGAAAACGTGAACCTCC
 AACCGTTTATGCTTGGAGAGATCGTTTCTTAT

>RpoC1

GTCCCGTCATTGTGGTAGGCCCTTCGCTTTCACATGCAATGTGGATTACCTCGAGAAAATAGCAATAGAGCTTTTTCAGACATTTGTAATTCGTGG
 TCTAATCAGACAACATCTTGCTTCCAACATAGGACTTGCTAAAAGTAAAATTCGGGAAAAGAACCCATTGTATGGGAAATACGCAAGAAGTTATG
 CAGGGGCATCCTGTATTGCTAAAATAGAGCACCCACTTTGCATAGATTAGGCATACAGCGCTTCCAACCTATTTTGTAGTGGAGGACGAGCTATTTGTT
 TACATCCATTGGTTTGAAGGGATTCAATGCGGACTTCGATGGAGATCAAATGGCTGTTTATGATACCTTTATCTTTGGAAGCTCAAGCAGAAGCTCG
 TTT

ภาพที่ 1.3.5 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของบัวสาย (*Nymphaea lotus*) จากยีน ITS *matK* *RbcL* และ *rpoC1* ที่ผ่านการตรวจสอบและคัดเลือก มีขนาดความยาว 503 600 615 และ 391 คู่เบส ตามลำดับ

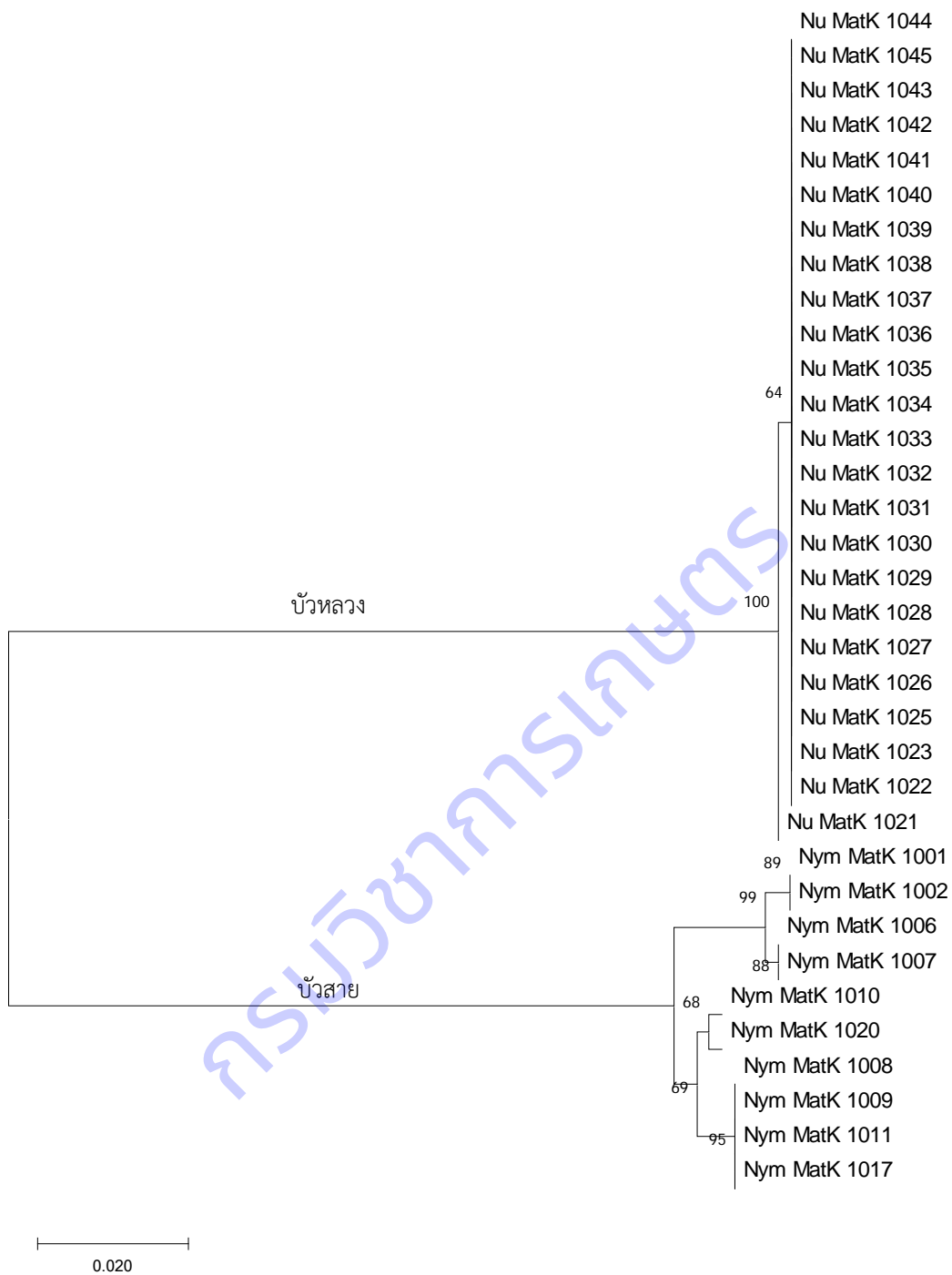


ภาพที่ 1.3.6 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 34 ตัวอย่าง จากยีน *ITS* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.3.3 ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรม (Pairwise distances) ของยีน ITS ในบัวจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx

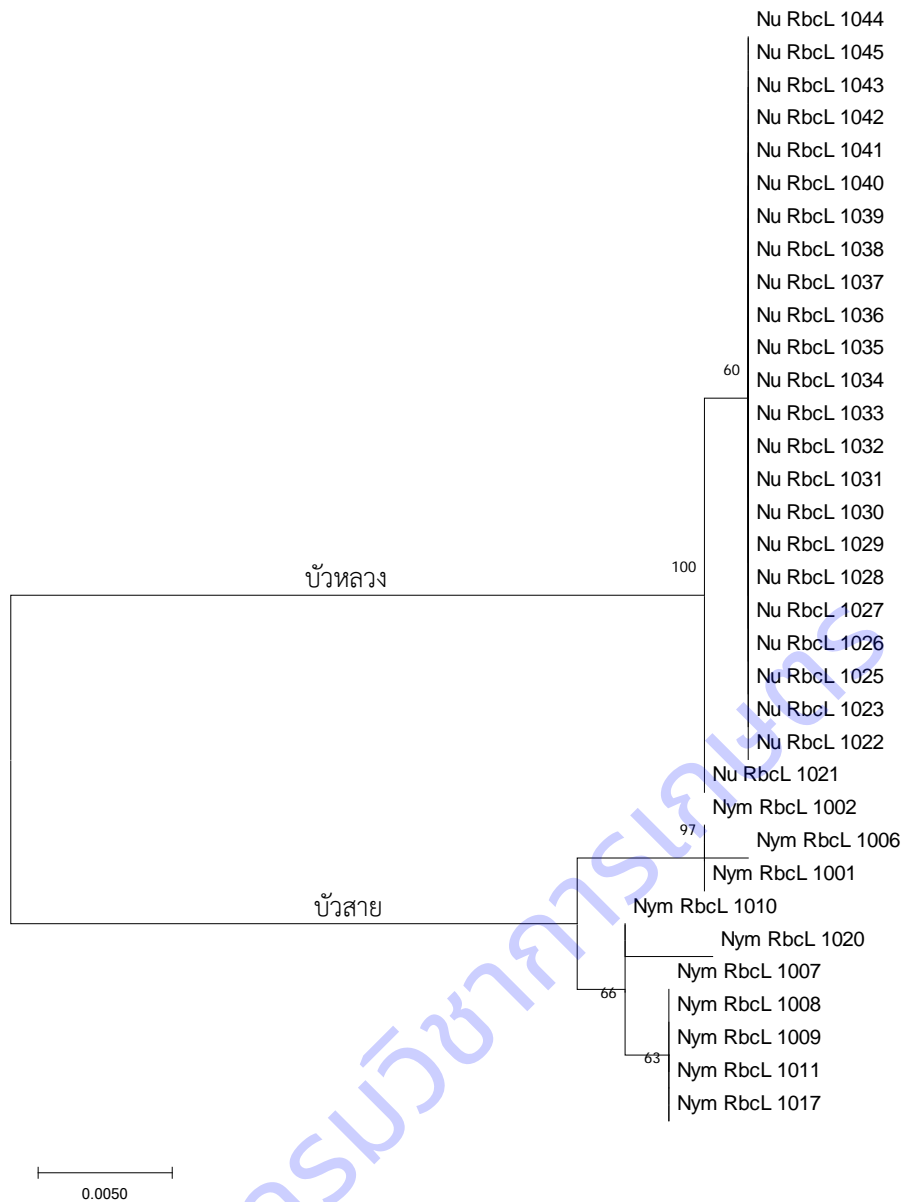
	1001	1002	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1017	1020	1021	1022	1023	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045		
Nym ITS_1001																																				
Nym ITS_1002	0.003																																			
Nym ITS_1006	0.009	0.013																																		
Nym ITS_1007	0.130	0.127	0.136																																	
Nym ITS_1008	0.163	0.159	0.169	0.068																																
Nym ITS_1009	0.128	0.125	0.134	0.013	0.066																															
Nym ITS_1010	0.128	0.125	0.135	0.016	0.066	0.003																														
Nym ITS_1011	0.128	0.125	0.134	0.013	0.066	0.000	0.003																													
Nym ITS_1017	0.130	0.130	0.136	0.025	0.070	0.016	0.019	0.016																												
Nym ITS_1020	0.136	0.134	0.142	0.074	0.109	0.066	0.069	0.066	0.065																											
Nu ITS_1021	0.406	0.404	0.405	0.428	0.410	0.428	0.431	0.428	0.422	0.432																										
Nu ITS_1022	0.474	0.474	0.469	0.474	0.484	0.475	0.478	0.475	0.473	0.473	0.274																									
Nu ITS_1023	0.481	0.481	0.476	0.484	0.495	0.485	0.487	0.485	0.479	0.476	0.259	0.094																								
Nu ITS_1025	0.290	0.288	0.285	0.294	0.324	0.298	0.300	0.298	0.295	0.296	0.170	0.183	0.171																							
Nu ITS_1026	0.365	0.363	0.360	0.369	0.365	0.372	0.375	0.372	0.368	0.370	0.112	0.217	0.195	0.062																						
Nu ITS_1027	0.406	0.404	0.401	0.414	0.409	0.415	0.416	0.415	0.409	0.411	0.095	0.225	0.200	0.113	0.065																					
Nu ITS_1028	0.436	0.434	0.431	0.447	0.446	0.447	0.450	0.447	0.441	0.445	0.122	0.218	0.198	0.156	0.113	0.054																				
Nu ITS_1029	0.302	0.301	0.298	0.309	0.330	0.310	0.313	0.310	0.305	0.309	0.165	0.198	0.183	0.030	0.064	0.110	0.147																			
Nu ITS_1030	0.297	0.296	0.293	0.302	0.326	0.302	0.304	0.302	0.297	0.299	0.167	0.193	0.179	0.013	0.065	0.111	0.148	0.016																		
Nu ITS_1031	0.305	0.303	0.300	0.310	0.331	0.311	0.313	0.311	0.306	0.307	0.169	0.193	0.178	0.025	0.068	0.115	0.150	0.007	0.011																	
Nu ITS_1032	0.311	0.309	0.306	0.315	0.335	0.318	0.320	0.318	0.313	0.315	0.166	0.200	0.185	0.040	0.073	0.115	0.145	0.012	0.028	0.017																
Nu ITS_1033	0.304	0.302	0.299	0.307	0.329	0.308	0.311	0.308	0.303	0.305	0.170	0.191	0.174	0.021	0.069	0.116	0.153	0.011	0.007	0.008	0.021															
Nu ITS_1034	0.341	0.339	0.336	0.340	0.339	0.344	0.346	0.344	0.340	0.342	0.147	0.211	0.199	0.042	0.036	0.096	0.152	0.053	0.050	0.053	0.065	0.056														
Nu ITS_1035	0.352	0.350	0.347	0.354	0.353	0.359	0.362	0.359	0.355	0.357	0.141	0.214	0.199	0.048	0.036	0.092	0.145	0.060	0.059	0.062	0.072	0.063	0.019													
Nu ITS_1036	0.436	0.434	0.431	0.449	0.446	0.449	0.451	0.449	0.445	0.444	0.145	0.231	0.213	0.120	0.085	0.077	0.073	0.122	0.125	0.127	0.128	0.130	0.112	0.107												
Nu ITS_1037	0.292	0.291	0.288	0.297	0.325	0.303	0.304	0.303	0.299	0.300	0.167	0.182	0.171	0.002	0.060	0.110	0.153	0.028	0.015	0.023	0.039	0.020	0.040	0.045	0.117											
Nu ITS_1038	0.301	0.299	0.296	0.314	0.334	0.317	0.323	0.317	0.313	0.311	0.167	0.204	0.192	0.022	0.068	0.121	0.163	0.032	0.021	0.027	0.043	0.026	0.052	0.060	0.120	0.021										
Nu ITS_1039	0.357	0.355	0.352	0.361	0.358	0.364	0.367	0.364	0.361	0.365	0.119	0.210	0.195	0.058	0.021	0.067	0.124	0.064	0.062	0.065	0.075	0.066	0.029	0.028	0.097	0.055	0.065									
Nu ITS_1040	0.436	0.434	0.431	0.440	0.442	0.440	0.443	0.440	0.435	0.442	0.125	0.208	0.191	0.130	0.090	0.052	0.032	0.122	0.125	0.127	0.127	0.130	0.127	0.122	0.037	0.127	0.133	0.100								
Nu ITS_1041	0.297	0.296	0.293	0.302	0.325	0.303	0.306	0.303	0.300	0.302	0.168	0.193	0.183	0.012	0.064	0.113	0.150	0.017	0.004	0.012	0.030	0.008	0.046	0.055	0.121	0.011	0.017	0.061	0.126							
Nu ITS_1042	0.341	0.340	0.337	0.343	0.349	0.349	0.352	0.349	0.345	0.347	0.141	0.214	0.199	0.041	0.037	0.099	0.152	0.056	0.054	0.057	0.067	0.058	0.019	0.008	0.114	0.038	0.056	0.028	0.130	0.050						
Nu ITS_1043	0.290	0.288	0.285	0.294	0.324	0.298	0.300	0.298	0.295	0.296	0.170	0.183	0.171	0.000	0.062	0.113	0.156	0.030	0.013	0.025	0.040	0.021	0.042	0.048	0.120	0.002	0.022	0.058	0.130	0.012	0.041					
Nu ITS_1044	0.349	0.347	0.346	0.353	0.354	0.355	0.357	0.355	0.349	0.351	0.138	0.224	0.208	0.053	0.038	0.091	0.151	0.059	0.057	0.061	0.071	0.062	0.022	0.021	0.126	0.051	0.063	0.026	0.129	0.059	0.016	0.053				
Nu ITS_1045	0.292	0.290	0.287	0.294	0.322	0.300	0.302	0.300	0.296	0.298	0.169	0.181	0.171	0.001	0.061	0.111	0.155	0.028	0.015	0.023	0.039	0.019	0.041	0.047	0.118	0.001	0.021	0.057	0.128	0.011	0.040	0.001	0.052			



ภาพที่ 1.3.7 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 34 ตัวอย่าง จากยีน *MatK* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ครั้ง

ตารางที่ 1.3.4 ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรม (Pairwise distances) ของยีน *MatK* ในบัวจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx

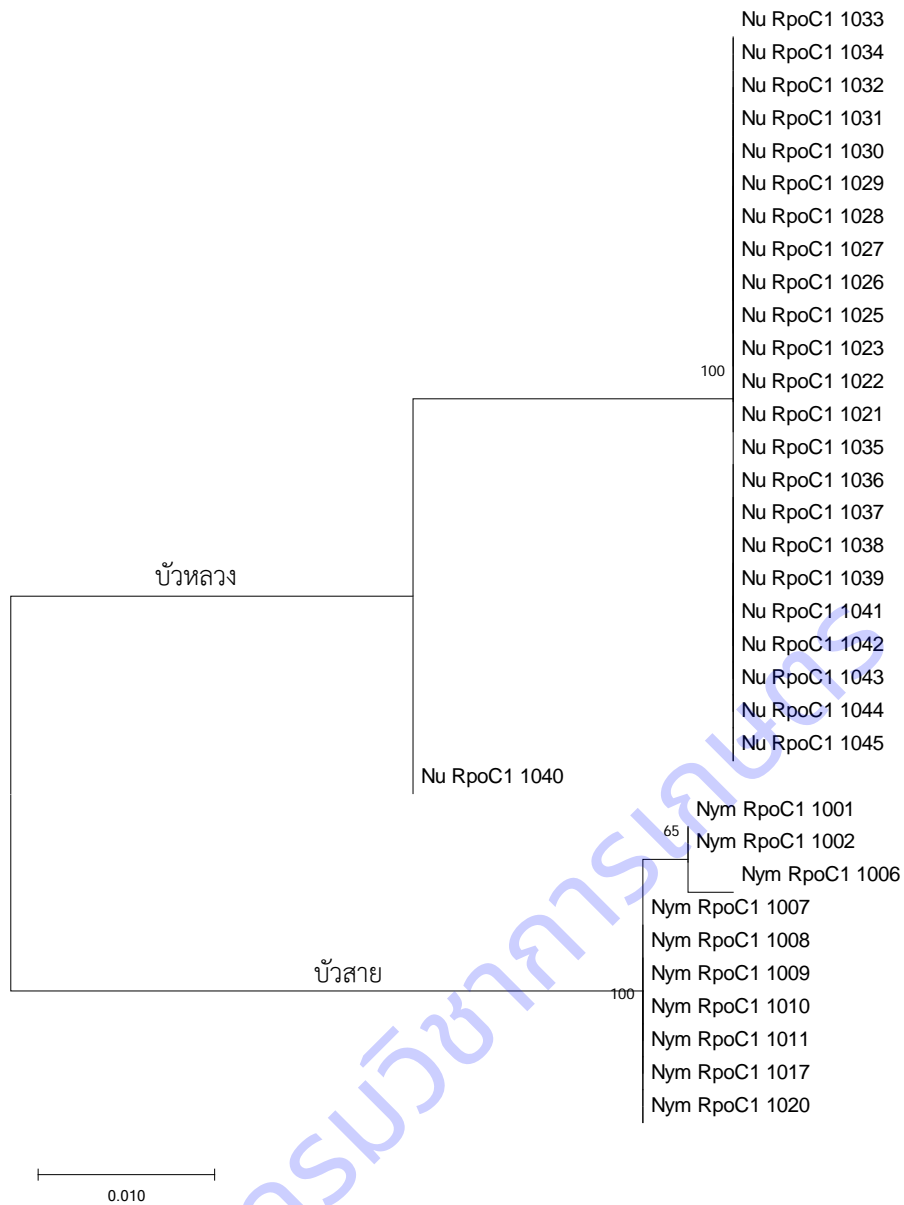
	1001	1002	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1017	1020	1021	1022	1023	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045		
Nym_MatK_1001																																				
Nym_MatK_1002	0.000																																			
Nym_MatK_1006	0.005	0.005																																		
Nym_MatK_1007	0.005	0.005	0.000																																	
Nym_MatK_1008	0.024	0.024	0.022	0.022																																
Nym_MatK_1009	0.024	0.024	0.022	0.022	0.000																															
Nym_MatK_1010	0.020	0.020	0.019	0.019	0.007	0.007																														
Nym_MatK_1011	0.024	0.024	0.022	0.022	0.000	0.000	0.007																													
Nym_MatK_1017	0.024	0.024	0.022	0.022	0.000	0.000	0.007	0.000																												
Nym_MatK_1020	0.020	0.020	0.019	0.019	0.007	0.007	0.003	0.007	0.007																											
Nu_MatK_1021	0.207	0.207	0.207	0.207	0.195	0.195	0.195	0.195	0.195	0.196																										
Nu_MatK_1022	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002																									
Nu_MatK_1023	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000																								
Nu_MatK_1025	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000																							
Nu_MatK_1026	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000																						
Nu_MatK_1027	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000																					
Nu_MatK_1028	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																				
Nu_MatK_1029	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																			
Nu_MatK_1030	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																		
Nu_MatK_1031	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																	
Nu_MatK_1032	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																
Nu_MatK_1033	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000															
Nu_MatK_1034	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000														
Nu_MatK_1035	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000													
Nu_MatK_1036	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000												
Nu_MatK_1037	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
Nu_MatK_1038	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
Nu_MatK_1039	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
Nu_MatK_1040	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
Nu_MatK_1041	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
Nu_MatK_1042	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
Nu_MatK_1043	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
Nu_MatK_1044	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
Nu_MatK_1045	0.204	0.204	0.204	0.204	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



ภาพที่ 1.3.8 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบั่ว จำนวน 34 ตัวอย่าง จากยีน *RbcL* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

ตารางที่ 1.3.5 ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรม (Pairwise distances) ของยีน *RbcL* ในบัวจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx

	1001	1002	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1017	1020	1021	1022	1023	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045		
Nym_RbcL_1001																																				
Nym_RbcL_1002	0.000																																			
Nym_RbcL_1006	0.001	0.001																																		
Nym_RbcL_1007	0.005	0.005	0.005																																	
Nym_RbcL_1008	0.005	0.005	0.005	0.000																																
Nym_RbcL_1009	0.005	0.005	0.005	0.000	0.000																															
Nym_RbcL_1010	0.004	0.004	0.005	0.001	0.001	0.001																														
Nym_RbcL_1011	0.005	0.005	0.005	0.000	0.000	0.000	0.001																													
Nym_RbcL_1017	0.005	0.005	0.005	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000																												
Nym_RbcL_1020	0.005	0.005	0.006	0.003	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003																											
Nu_RbcL_1021	0.028	0.028	0.030	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.030																										
Nu_RbcL_1022	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001																								
Nu_RbcL_1023	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000																							
Nu_RbcL_1025	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000																							
Nu_RbcL_1026	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000																						
Nu_RbcL_1027	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000																					
Nu_RbcL_1028	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																				
Nu_RbcL_1029	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																			
Nu_RbcL_1030	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																		
Nu_RbcL_1031	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																	
Nu_RbcL_1032	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																
Nu_RbcL_1033	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000															
Nu_RbcL_1034	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000														
Nu_RbcL_1035	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000													
Nu_RbcL_1036	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
Nu_RbcL_1037	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
Nu_RbcL_1038	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
Nu_RbcL_1039	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
Nu_RbcL_1040	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
Nu_RbcL_1041	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
Nu_RbcL_1042	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
Nu_RbcL_1043	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
Nu_RbcL_1044	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
Nu_RbcL_1045	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.031	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	



ภาพที่ 1.3.9 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบั่ว จำนวน 34 ตัวอย่าง จากยีน *RpoC1* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

ตารางที่ 1.3.6 ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรม (Pairwise distances) ของยีน *RpoC1* ในบัวจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx

	1001	1002	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1017	1020	1021	1022	1023	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045		
Nym_RpoC1_1001																																				
Nym_RpoC1_1002	0.000																																			
Nym_RpoC1_1006	0.003	0.003																																		
Nym_RpoC1_1007	0.003	0.003	0.005																																	
Nym_RpoC1_1008	0.003	0.003	0.005	0.000																																
Nym_RpoC1_1009	0.003	0.003	0.005	0.000	0.000																															
Nym_RpoC1_1010	0.003	0.003	0.005	0.000	0.000	0.000																														
Nym_RpoC1_1011	0.003	0.003	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000																													
Nym_RpoC1_1017	0.003	0.003	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																												
Nym_RpoC1_1020	0.003	0.003	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																											
Nu_RpoC1_1021	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079																										
Nu_RpoC1_1022	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000																									
Nu_RpoC1_1023	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000																								
Nu_RpoC1_1025	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000																							
Nu_RpoC1_1026	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000																						
Nu_RpoC1_1027	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																					
Nu_RpoC1_1028	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																				
Nu_RpoC1_1029	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																			
Nu_RpoC1_1030	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																		
Nu_RpoC1_1031	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																	
Nu_RpoC1_1032	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																
Nu_RpoC1_1033	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000															
Nu_RpoC1_1034	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000														
Nu_RpoC1_1035	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000													
Nu_RpoC1_1036	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000												
Nu_RpoC1_1037	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
Nu_RpoC1_1038	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
Nu_RpoC1_1039	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
Nu_RpoC1_1040	0.062	0.062	0.062	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018								
Nu_RpoC1_1041	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018		
Nu_RpoC1_1042	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000		
Nu_RpoC1_1043	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	
Nu_RpoC1_1044	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000
Nu_RpoC1_1045	0.082	0.082	0.082	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000

2. การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างบัว

การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างบัว ได้คัดเลือกชิ้นส่วนยีนที่ศึกษาไว้ในขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์บาร์โค้ดสากลของพืชกับตัวอย่างบัว จำนวน 34 ตัวอย่าง โดยขั้นตอนนี้ได้คัดเลือกชิ้นส่วนยีนที่มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุด ได้แก่ *ITS* และ *rpoC1* ถึงแม้ชิ้นส่วนยีน *matK* จะมีค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมที่สูงกว่า แต่มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ยาวกว่า ทำให้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประสบความสำเร็จน้อยกว่าชิ้นส่วนยีน *rpoC1* ที่มีขนาดที่สั้นกว่าและมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จที่ 87 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับยีน *matK* มีเพียง 63 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของบัวจึงใช้ยีน *ITS* และ *rpoC1* ศึกษาในตัวอย่างบัวที่เก็บอนุรักษ์ไว้ทั้งหมด จำนวน 162 ตัวอย่าง แบ่งเป็น บัวหลวง 110 ตัวอย่าง และบัวสาย 52 ตัวอย่าง (ตารางผนวกที่ 1.3.1)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างบัวทั้งหมดถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยยีน *ITS* ทำการวิเคราะห์ทางด้านปลาย 5' และ 3' ส่วนยีน *rpoC1* ทำการวิเคราะห์เฉพาะด้านปลาย ปลาย 5' จากนั้นทำการตรวจสอบและคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีภาพโครมาโตแกรมที่สมบูรณ์ มาเปรียบเทียบกันทุกตัวอย่างด้วยโปรแกรม Clustal Omega เพื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เหมาะสม และได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวเท่ากัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGAx ตามรายงานของ Kumar *et al.*, 2018 โดยสร้างแผนผังพันธุกรรมด้วยวิธี ML (Maximum Likelihood) ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ พบว่า การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน *ITS* สามารถแยกกลุ่มบัวสายออกจากบัวหลวงได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 1.3.10) การจัดทำแผนผังพันธุกรรมมีค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุดอยู่ที่ 1.08 การทำ alignment ด้วย ClustalW ของโปรแกรม MEGAx แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอประเภทเดียวกัน (transition mutation) และการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอต่างชนิดกัน (transversion mutation) รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1.3.7 ทั้งในบัวหลวง (ภาพที่ 1.3.11) และบัวสาย (ภาพที่ 1.3.12) ซึ่งบัวสายจะมีลักษณะคู่เบสแบบเพิ่มเข้ามา (insertion) และขาดหายไป (deletion) ที่พบมากกว่าบัวหลวง สำหรับการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน *rpoC1* สามารถแยกกลุ่มบัวสายออกจากบัวหลวงเช่นกัน (ภาพที่ 1.3.13) โดยมีค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุดอยู่ที่ 0.08 การทำ alignment ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับคู่เบสในบัวหลวง (ภาพที่ 1.3.14) แต่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอประเภทเดียวกัน และการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอต่างชนิดกันในบัวสาย (ภาพที่ 1.3.15) ทั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างบัวทั้งหมดจะนำไปลงทะเบียนในฐานข้อมูล NCBI ต่อไป อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงร่วมกับการลงทะเบียนจะช่วยความน่าเชื่อถือมากขึ้น การทดลองนี้ได้ดำเนินวิจัยไปควบคู่การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของบัวในการทดลองอื่นๆ ของทางสถาบันวิจัยพืชสวนและพืชสวนศรีสะเกษ นอกจากนี้การปลูกเปรียบเทียบกับปัญหาโรคและแมลงที่ทำลายต้นบัวที่เก็บอนุรักษ์ไว้ จึงทำให้ได้ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงเพียง 20 ตัวอย่าง และมีสภาพที่ไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 1.3.16)

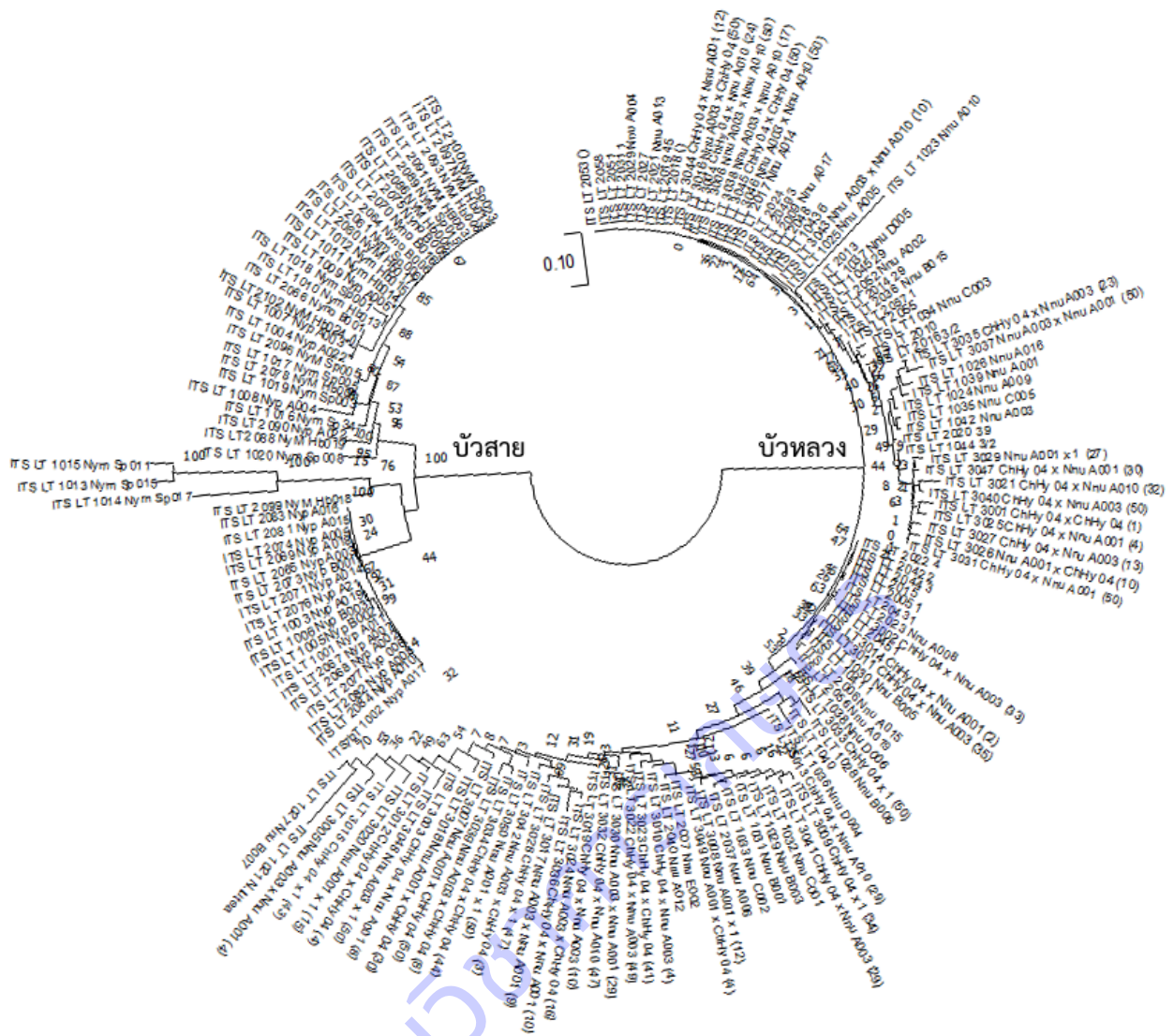
ตารางที่ 1.3.7 รูปแบบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์

รูปแบบ	รายละเอียด
Transition mutation	เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอประเภทเดียวกัน ได้แก่ - เปลี่ยนจากเบส Purine เป็นเบส Purine เช่น เปลี่ยนเบส Adenine เป็นเบส Guanine

	<ul style="list-style-type: none"> - เปลี่ยนจากเบส Pyrimidine เป็นเบส Pyrimidine เช่น เปลี่ยนเบส Cytosine เป็นเบส Thymine
Transversion mutation	<p>เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอต่างชนิดกัน ได้แก่</p> <ul style="list-style-type: none"> - เปลี่ยนจากเบส Purine เป็นเบส Pyrimidine เช่น เปลี่ยนเบส Adenine เป็นเบส Thymine - เปลี่ยนจากเบส Pyrimidine เป็นเบส Purine เช่น เปลี่ยนเบส Cytosine เป็นเบส Guanine

แหล่งที่มา: Yao *et al.*, 2017

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชมีประโยชน์หลายด้าน และได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในปัจจุบันแต่การนำมาประยุกต์ใช้จริงยังมีปัญหาและข้อจำกัดหลายประการและการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานเพียงบริเวณเดียวไม่สามารถระบุชนิดพืชได้แม่นยำเท่ากับการใช้มากกว่าหนึ่งบริเวณ แม้ว่าจะมีรายงานการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานบริเวณอื่นเพิ่มเติมขึ้นมาแต่ยังไม่มีบริเวณใดที่เหมาะสมกับพืชทุกกลุ่ม ซึ่งทำให้การใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชยังไม่สมบูรณ์แบบพอที่จะนำไปใช้ได้กับพืชทุกกลุ่มได้ นอกจากนี้ข้อจำกัดในการใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดพืช ละข้อพึงระวังหลายประการโดยเฉพาะขั้นตอนการสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดต้องอาศัยความรู้ทางด้านอนุกรมวิธานอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ดังนั้น การไปประยุกต์ใช้ในพืชต้องตระหนักถึงข้อจำกัดของดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งจะทำให้สามารถเลือกใช้ข้อมูลได้ถูกต้องและน่าเชื่อถือ ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะก้าวหน้ามากขึ้นอย่างไรก็ตามดีเอ็นเอบาร์โค้ดไม่สามารถมาทดแทนศาสตร์ทางด้านอนุกรมวิธาน แต่สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบการระบุชนิดหรือกลุ่มพืชได้



ภาพที่ 1.3.10 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 162 ตัวอย่าง จากยีน ITS ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAX โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ



ภาพที่ 1.3.13 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 162 ตัวอย่าง จากยีน *RpoC1* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

1. Rpo LT 1037 Nnu D005	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
2. Rpo LT 2001 Nnu B008	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
3. Rpo LT 2002 Nnu C004	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
4. Rpo LT 2003 Nnu A022	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
5. Rpo LT 2004 4	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
6. Rpo LT 2005 1	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
7. Rpo LT 2006 Nnu A015	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
8. Rpo LT 2007 Nnu E002	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
9. Rpo LT 2008 Nnu E003	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
10. Rpo LT 2009 Nnu A017	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
11. Rpo LT 2010	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
12. Rpo LT 2011 6	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
13. Rpo LT 2012	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
14. Rpo LT 2013	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
15. Rpo LT 2014 29	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
16. Rpo LT 2015	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
17. Rpo LT 2016 3/2	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
18. Rpo LT 2017 Nnu A014	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
19. Rpo LT 2018 ()	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
20. Rpo LT 2019 45	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
21. Rpo LT 2020 39	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
22. Rpo LT 2021 Nnu A013	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
23. Rpo LT 2022 4	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
24. Rpo LT 2023 Nnu A008	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
25. Rpo LT 2024	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
26. Rpo LT 2025 Nnu A007	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
27. Rpo LT 2026 2	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
28. Rpo LT 2027	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
29. Rpo LT 2028 Nnu B002	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A
30. Rpo LT 2029 Nnu A004	G	T	T	C	C	G	T	C	A	T	T	G	T	C	G	T	G	G	C	C	C	T	T	C	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	A	T	C	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	G	C	C	T	C	G	C	G	A

ภาพที่ 1.3.14 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ตัวอย่างบัวหลวงด้วยโปรแกรม MEGAx

131. Rpo LT 2064 Nyno B006	T	A	T	G	G	G	A	A	A	T	A	C	T	T	C	A	A	G	A	A	G	T	T	A	T	G	C	A	G	G	G	G	C	A	T	C	C	T	G	T	A	T	T	G	C	T	A	A	A	T	A	G	A	G	C	A	C
132. Rpo LT 2065 Nyp A003	T	A	T	G	G	G	A	A	A	T	A	C	T	G	C	A	A	G	A	A	G	T	T	A	T	G	C	A	G	G	G	G	C	A	T	C	C	T	G	T	A	T	T	G	C	T	A	A	A	T	A	G	A	G	C	A	C
133. Rpo LT 2066 Nyno B001	T	A	T	G	G	G	A	A	A	T	A	C	T	G	C	A	A	G	A	A	G	T	T	A	T	G	C	A	G	G	G	G	C	A	T	C	C	T	G	T	A	T	T	G	C	T	A	A	A	T	A	G	A	G	C	A	C
134. Rpo LT 2067 Nyp A007	T	A	T	G	G	G	A	A	A	T	A	C	T	G	C	A	A	G	A	A	G	T	T	A	T	G	C	A	G	G	G	G	C	A	T	C	C	T	G	T	A	T	T	G	C	T	A	A	A	T	A	G	A	G	C	A	C
135. Rpo LT 2068 Nyp A002	T	A	T	G	G	G	A	A	A	T	A	C	T	G	C	A	A	G	A	A	G	T	T	A	T	G	C	A	G	G	G	G	C	A	T	C	C	T	G	T	A	T	T	G	C	T	A	A	A	T	A	G	A	G	C	A	C
136. Rpo LT 2069 Nyp A018	T	A	T	G	G	G	A	A	A	T	A	C	T	G	C	A	A	G	A	A	G	T	T	A	T	G	C	A	G	G	G	G	C	A	T	C	C	T	G	T	A	T	T	G	C	T	A	A	A	T	A	G	A	G	C	A	C
137. Rpo LT 2070 Nyno B016	T	A	T	G	G	G	A	A	A	T	A	C	T	G	C	A	A	G	A	A	G	T	T	A	T	G	C	A	G	G	G	G	C	A	T	C	C	T	G	T	A	T	T	G	C	T	A	A	A	T	A	G	A	G	C	A	C
138. Rpo LT 2071 Nyp A014	T	A	T	G	G	G	A	A	A	T	A	C	T	G	C	A	A	G	A	A	G	T	T	A	T	G	C	A	G	G	G	G	C	A	T	C	C	T	G	T	A	T	T	G	C	T	A	A	A	T	A	G	A	G	C	A	C
139. Rpo LT 2072 Nyno B004	T	A	T	G	G	G	A	A	A	T	A	C	T	G	C	A	A	G	A	A	G	T	T	A	T	G	C	A	G	G	G	G	C	A	T	C	C	T	G	T	A	T	T	G	C	T	A	A	A	T	A	G	A	G	C	A	C
140. Rpo LT 2073 Nyp B001	T	A	T	G	G	G	A	A	A	T	A	C	T	G	C	A	A	G	A	A	G																																				

1. การทดลองดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัว ทำให้ได้ข้อมูลและองค์ความรู้หลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงและบัวสาย ให้นักปรับปรุงพันธุ์บัว นักศึกษา นักวิชาการ และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมบัว นำไปศึกษา จำแนก และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัว ไม่ว่าจะเป็นที่สำรวจพบใหม่หรือการปรับปรุงพันธุ์ขึ้นมาใหม่ต่อไป

2. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอบาร์โค้ดในบัวยังมีปัญหาและข้อจำกัดหลายประการซึ่งการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพียงบริเวณเดียวไม่สามารถระบุชนิดพืชได้แม่นยำเท่ากับการใช้มากกว่าหนึ่งบริเวณ นอกจากนี้ขั้นตอนการสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดต้องอาศัยความรู้ทางด้านอนุกรมวิธาน ซึ่งจะทำให้สามารถเลือกใช้ข้อมูลได้ถูกต้องและน่าเชื่อถือ แม้ว่าเทคโนโลยีสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะก้าวหน้ามากขึ้นอย่างไรก็ตามยังไม่สามารถมาทดแทนศาสตร์ทางด้านอนุกรมวิธาน แต่สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบการระบุชนิดหรือกลุ่มพืชได้

3. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างบัวทั้งหมดจะนำไปลงทะเบียนในฐานข้อมูล NCBI ต่อไป อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างพรรณไม้อ่างอิงร่วมกับการลงทะเบียนจะช่วยความน่าเชื่อถือมากขึ้น การทดลองนี้ได้ดำเนินวิจัยไปควบคู่การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของบัวในการทดลองอื่นๆ ของทางสถาบันวิจัยพืชสวนและศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ นอกจากนี้การปลูกเปรียบเทียบกับปัญหาโรคและแมลงที่ทำลายต้นบัวที่เก็บอนุรักษ์ไว้ จึงทำให้ได้ตัวอย่างพรรณไม้อ่างอิงเพียง 20 ตัวอย่าง และมีสภาพที่ไม่สมบูรณ์

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ(Conclusion and Suggestion)

1. การทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์บาร์โค้ดสากลของพืชกับตัวอย่างบัว 2 ชนิด ได้แก่ บัวสาย (*Nymphaea lotus*) และ บัวหลวง (*Nelumbonucifera*) จากยีน *ITS matK rpoC1* และ *RbcL* มีขนาดแถบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสประมาณ 750950 650 และ 450 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์และคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพได้ขนาดความยาว 503 600 615 และ 391 คู่เบส พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพ อยู่ที่ 67 63 94 และ 87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากบัว 34 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGAx โดยสร้างแผนผังพันธุกรรม (Phylogenetic tree) แบบ ML (Maximum Likelihood) ที่ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ พบว่าสามารถแยกกลุ่มพันธุกรรมของตัวอย่างบัวสายออกจากบัวหลวงได้อย่างชัดเจน โดยมีค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุดจากยีน *ITS matK rpoC1* และ *RbcL* อยู่ที่ 0.481 0.207 0.030 และ 0.082 ตามลำดับ

2. การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างบัว ได้คัดเลือกชิ้นส่วนยีน *ITS* และ *rpoC1* มาใช้กับตัวอย่างบัวที่เก็บอนุรักษ์ไว้ทั้งหมด จำนวน 162 ตัวอย่าง แบ่งเป็น บัวหลวง 110 ตัวอย่าง และบัวสาย 52 ตัวอย่าง โดยยีน *ITS* ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' และ 3' ส่วนยีน *rpoC1* ทำการวิเคราะห์เฉพาะด้านปลายปลาย 5' เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGAx ยีน *ITS* ได้แผนผังพันธุกรรมที่มีค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุดอยู่ที่ 1.08 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอประเภทเดียวกัน และการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอต่างชนิดกันซึ่งบัวสายจะมีลักษณะคู่เบสแบบเพิ่มเข้ามา และขาดหายไปมากกว่าบัวหลวง สำหรับยีน *rpoC1* สามารถแยกกลุ่มบัวสายออกจากบัวหลวงเช่นกัน โดยมีค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุดอยู่ที่ 0.08 การทำ alignment ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับคู่เบสในบัวหลวง แต่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอประเภทเดียวกัน และการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอต่างชนิดกันในบัวสาย

3. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของบัวสายและบัวหลวงสามารถนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวได้ทั่วโลกจากฐานข้อมูล NCBI อีกทั้งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกพันธุ์ ระบุชนิด และอนุรักษ์

พันธุ์กรรมตัวอย่างบัวที่เก็บรักษาไว้ของกรมวิชาการเกษตร รวมถึงใช้เป็นแนวทางการปรับปรุงพันธุ์บัวให้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น

การทดลองที่ 1.4

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของพืชวงศ์กล้วยไม้ที่มีศักยภาพเป็นพืชสมุนไพร

DNA Barcode for Identification of Medicinal Orchids

ชื่อผู้วิจัย

บุญเรือนรัตน์ เพียรงาน อรุณทัย ชาววาอัญชลี แก้วดวง

Boonraunrat Peanngan Aroonothai Sawwa Anchalee Kaewdoug

คำสำคัญ: เครื่องหมายดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอในพลาสติก กล้วยไม้ สมุนไพร

Key words : DNA barcode, Chloroplast, , Orchids , Orchidaceae, Medicinal orchids

บทคัดย่อ

ได้เก็บรวบรวมกล้วยไม้พื้นเมืองที่มีศักยภาพเป็นพืชสมุนไพร จำนวน 40 ชนิด แล้วนำไปสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ matK, rbcL และ trnH-psbA intergenic spacer โดยเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ matK, rbcL, trnH-psbA และITS โดยขึ้นส่วนบริเวณยีน matK ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส บริเวณ rbcL ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1400 คู่เบส ขึ้นส่วนบริเวณยีน trnH-psbA ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส และขึ้นส่วนบริเวณยีน ITS ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส เช่นกัน เมื่อนำขึ้นส่วนยีนต่าง ๆ เหล่านี้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำมารวมเป็นสายเดียวกันก่อนทำการวิเคราะห์จึงสามารถให้ความแตกต่างได้ ทั้งนี้ได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละสายไปเปรียบเทียบกับข้อมูลกล้วยไม้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blast พบว่ากล้วยไม้ที่เก็บรวบรวมไว้มีความเหมือนกับกล้วยไม้ที่มีรายงานในฐานข้อมูล สามารถจำแนกชนิดได้ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ phylogenetic tree สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้พื้นเมืองที่เก็บรวบรวมได้ออกเป็น 7 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ไอยเรศใบช้าง เอื้องสายมรกต เอื้องตะขาบเอื้องจำปาเอื้องสายน้ำเขียวเอื้องคำตาดำเพชรหึงเข็มเหลือง และเอื้องหวาดพราหมณ์ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย เหลืองจันทร์บูรเอื้องโมกสิงโตสมอหิน สิงโตใบพัดแดง เอื้องสายม่วง มัจฉานูเอื้องสายคำปอน กุหลาบแม่เมย กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย กุหลาบกระบี่เอื้องเทียน หางกระรอก กุหลาบน่าน ตอติเล เอื้องสายหลวง สิงโตนกกล่าม มัจฉานูชมพู เอื้องสายน้ำผึ้ง และ เอื้องทองกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย ช้างกระเข็มแสด เข็มแดง และ เข็มม่วงกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย เอื้องสายสั้พระอินทร์ และเอื้องมะลิกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย เขาพระวิหาร เตลีไอขาว และกลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย เอื้องแปรงสีฟัน และเอื้องช้างน้ำ

Abstract

40 native orchids that have potential as medicinal plants was collected from parts of Thailand. They were then used to create DNA barcode markers at matK, rbcL and trnH-psbA intergenic spacer regions. The extracted DNA was tested for DNA markers with bar code by PCR technique using matK, rbcL, trnH-psbA and ITS primers. The matK fragment yielded 900 base pair DNA bands, rbcL contained 1400 base pair DNA bands, trnH-psbA fragments yielded 900

base pair DNA bands, and ITS fragments yielded 900 base pair DNA bands. When these gene fragments were read in nucleotide sequences, and then combine them into the same line before analysis, so that the difference can be made. The nucleotide sequence data of each species was compared with the orchid data in the GenBank database using Blast program. The collected orchids were similar to those reported in the database. They can be classified when analyzed by phylogenetic tree relationships, the collected native orchids can be grouped into 7 groups as follows: The first group consists of Aiyaret Bai Chang, Emerald Saiyan, Centipede, Champa, Green Sai Nam, Black-eyed Kham, Phet Huang, Yellow Needle, and Mustard Prahman. The second group consisted of Lueang Chanthaboon, Aung Mok, Anchor Stone Lion, and Red Fan Lion. Purple Saiyan Orchid, Matchanu Orchid, Sai Khampon Orchid, Mae Moei Rose. The third group consists of Krabi roses. Aung Tian, Squirrel Tail, Nan Roses, Tortiles, Uang Sai Luang Muscular lion, Machanu Chomphu, Sai Nam Phueng and Aurangthong. The fourth group consists of elephants, kraals, seded needles, red needles, and purple needles. The 5th group consisted of the serpent, the whip, the Indra. and jasmine. The 6th group consists of Khao Phra Viharn, Deli Khao and the 7th group consists of a toothbrush and the maw of elephants.

บทนำ (Introduction)

กล้วยไม้เป็นพืชที่มีความหลากหลายทั้งในด้านพันธุกรรม และการนำไปใช้ประโยชน์ ที่ได้รับความนิยมนำมาเป็นสมุนไพรกว่า 150 ปีมาแล้วในประเทศจีนและประเทศต่าง ๆ ในภูมิภาคอาเซียน รวมถึงประเทศไทย ที่มีการผลิตกล้วยไม้ตัดดอกเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก จึงทำให้กล้วยไม้เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ ปัจจุบันจึงมีการนำกล้วยไม้มาใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพรมากขึ้น เนื่องจากกล้วยไม้มีสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ เช่น สารกลุ่ม flavonoids, alkaloids, carotenoid, phytosterols, bibenzyl, phenanthrene และ fluorenone (Hossain, 2011; Yang et al., 2006) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาของสารกลุ่ม bibenzyl โดยเฉพาะสาร moscatilin ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่างคือฤทธิ์ต้านการเจริญของหลอดเลือด (anti-angiogenic), ฤทธิ์ต้านการเจริญของเนื้องอกหรือมะเร็ง (antitumor), ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Liu et al., 2010; Kowitdamrong et al., 2013; Tsai et al., 2010) นอกจากนี้กล้วยไม้ยังมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพรใช้รักษาโรคได้ เช่น กล้วยไม้สายพันธุ์ *Acampe rigida* (Buch.-Ham. Ex Sm) P.F. Hunt หรือ เอื้องสารภี ในตำรายาของจีน ใช้ใบและรากในการคลายกล้ามเนื้อ และข้อต่อ ช่วยในการไหลเวียนโลหิต บรรเทาอาการปวด รวมทั้งรักษาแผลถลอก กระจุกหักหรือกระจุกแตก ในประเทศไทยใช้ทั้งต้นเพื่อบำรุงร่างกาย จากการศึกษาทางพฤกษเคมีพบว่า กล้วยไม้ชนิดนี้มีสารที่เป็นประโยชน์หลายชนิด เช่น 4-hydroxybenzoic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของพาราเบน (parabens) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Acriopsis liliifolia* (J.Koenig) Seidenf. หรือ เอื้องนมหนู ใช้รักษาอาการไข้ นอกจากนี้ยังมีการนำหัว (pseudobulbs) ไปต้มและนำน้ำที่ต้มมาหยอดหูเพื่อรักษาอาการเจ็บหู *Aerides odorata* Lour. หรือ เอื้องกุหลาบกระเป่าเปิด ในประเทศอินเดีย ใช้ผลรักษาบาดแผล ใช้น้ำที่สกัดได้จากใบใช้รักษาตุ่มหรือสิวในหูและจมูก และในรัฐโอริสสา มีการนำรากของกล้วยไม้ชนิดนี้มาผสมกับรากของโสก (*Saraca asoca* (Roxb.) Wilde) เปลือกของสะเดา (*Azadirachta indica* A. Juss.) และเกลือ เป็นส่วนผสมของตำหรับยาสมุนไพร รักษาอาการเจ็บปวดตามข้อต่อต่างๆ ในเวียดนามเชื่อว่า เมื่อนำเมล็ดมาโรยบนแผลจะช่วยสมานแผลและรักษาโรคผิวหนังได้ รวมทั้งใช้ใบในการรักษาวัณโรคอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในเนปาลใช้ใบเป็นส่วนผสมในการทายาพอกแผลฉีกขาด

และบริเวณที่มีอาการบอบช้ำ *Anoectochilus roxburghii*(Wall.) Lindl. หรือ ว่านไผ่หมา กล้วยไม้ชนิดนี้มีสรรพคุณมากมาย จนถูกขนานนามว่า “King of Medicines” โดยทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ของจีนและไต้หวันมีการใช้กล้วยไม้ชนิดนี้ในการรักษาโรคตับอักเสบ โรคเกี่ยวกับม้าม ความดันโลหิตสูง มะเร็ง วัณโรค กระตุ้นสมรรถภาพทางเพศ รักษาอาการไข้ งูกัด และบำรุงเด็กที่เจริญเติบโตช้า ในประเทศอินเดียมีการใช้ต้นและใบเป็นส่วนผสมในน้ำมันสมุนไพร ซึ่งมีการใช้กันมาอย่างยาวนาน นอกจากนี้ ในเนปาลก็มีรายงานการใช้รักษาอาการวัณโรคเช่นกัน จากการศึกษาสารพฤกษเคมีพบว่า มีสารประกอบมากกว่า 18 ชนิด ที่สกัดได้จากกล้วยไม้ชนิดนี้ และเป็นที่น่าสนใจว่า สาร บางชนิดมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด จากการทดสอบกับหนูในห้องปฏิบัติการ (Zhang et al., 2007) ซึ่งอาจมีการพัฒนาไปเป็นยารักษาเบาหวานในอนาคต *Apostasia wallichii* R. Br. หรือ ตานขโมย ใช้รากดองเหล้าเพื่อเป็นยาบำรุงกำลัง ในประเทศแถบมาเลเซียใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน *Cymbidium ensifolium*(L.) Sw. หรือ จุหลัน ในประเทศจีนมีการใช้เพื่อระงับอาการปวดท้อง และรักษาอาการโรคในลาว กัมพูชา และเวียดนาม มีการใช้ดอกในการล้างตา และใช้ใบกระตุ้นการหลั่งปัสสาวะ กล้วยไม้ชนิดนี้ยังไม่มีการศึกษาข้อมูลทางพฤกษเคมีและเภสัชวิทยาที่ชัดเจน แต่มีการรายงาน ว่า พอลิเมอร์ของน้ำตาล และกรดอะมิโนเชิงเดี่ยว เรียกว่า cymbidine A ซึ่งสกัดได้จากกล้วยไม้ในสกุลเดียวกัน (*C. goeringii* (Rchb.f.) Rchb.f.) มีฤทธิ์ลดสภาวะความดันโลหิตต่ำและขับปัสสาวะ *Dendrobium nobile*Lindl. หรือ เอื้องเกือกัว ในประเทศจีน ลาว และเวียดนาม มีการใช้กล้วยไม้ชนิดนี้บรรเทาอาการอาหารไม่ย่อย ลดไข้ และกระตุ้นการหลั่งน้ำลาย และมักจะถูกใช้บรรเทาอาการปวดที่ไม่รุนแรง รวมทั้งลดความดันโลหิต จากการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาพบว่า กล้วยไม้ชนิดนี้มีสารกลุ่ม phenanthrenes ได้แก่ lusianthridin และ denbinobin ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (human lung adenocarcinoma epithelial, A549), เซลล์มะเร็งรังไข่ (human ovary adenocarcinoma, SK-OV-3) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (human promyelocytic leukemia, HL-60) ของมนุษย์ในสภาพปลอดเชื้อได้ *Mycaran thespanea* (Lindl.) S.C.Chen & J.J.Wood หรือ เอื้องพรรณณี ในประเทศอินเดียใช้ในการรักษาโรคผื่นคันตามผิวหนัง กล้วยไม้ชนิดนี้ยังไม่มีข้อมูลทางด้านพฤกษเคมีและเภสัชวิทยาที่แน่ชัด แต่มีการศึกษาในกล้วยไม้ชนิดอื่นที่อยู่ในสกุลใกล้เคียง เช่น *Eria flava* Griff. พบว่า มีสารประกอบจำพวก polyphenols ในกลุ่ม stilbenes ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ มะเร็ง และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัสเป็นต้น *Nervilia aragoana* Gaudich. หรือ แผ่นดินเย็น กล้วยไม้ดิน มีหัวใต้ดิน ใบพับจีบ ช่อดอกตั้งตรง ดอกสีเขียวมียลายตาข่ายสีน้ำตาลบนกลีบดอก กลีบปากสีขาว กลางกลีบมีขนและมีเส้นสีน้ำตาลบริเวณกลีบปากด้านข้าง กระจายพันธุ์ในญี่ปุ่น ภูฏาน เนปาล อินเดีย บังกลาเทศ พม่า ไทย ลาว เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ นิวกีนิ และออสเตรเลีย ในประเทศมาเลเซีย นำใบมาต้มและนำน้ำจากการต้มมาดื่มเพื่อบำรุงสตรีหลังคลอด จากการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาพบว่า สารสกัดจากพืชชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Cryptococcus neoformans* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในสภาพปลอดเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่า มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (ฐิติพร, 2561) นอกจากนี้ Rosa และ Pérez (2010) ได้รวบรวมข้อมูลการใช้กล้วยไม้เป็นพืชสมุนไพร โดยศึกษาด้านพฤกษเคมีและสรรพคุณทางการรักษาโรคจากกล้วยไม้ทั่วโลกจำนวน 44 ชนิด และยังมีกล้วยไม้สายพันธุ์ *Dendrobium crumenative*, *Eulophia campestris*, *Orchis latifolia*, *Vanda roxburghii* และ *Vanda tessellata* ที่มีสรรพคุณทางยาด้วย (Singh และ Duggal, 2009)

ดังนั้นจึงควรมีการศึกษา และรวบรวมไว้สำหรับเป็นข้อมูลเพื่อนำไปพัฒนาการผลิตสมุนไพรต่อไป ในการเก็บรวบรวมไว้แล้วนั้นจะต้องมีการจำแนกชนิดให้ถูกต้องด้วยจึงใช้เทคนิค ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่พัฒนาแนวคิดจากการทำบาร์โค้ดในสินค้าต่าง ๆ แล้วนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดและจำแนกสิ่งมีชีวิตเพื่อลดความผิดพลาด มีความรวดเร็วในการจำแนกสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยอาศัยหลักการว่า สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่แสดงลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ๆ แตกต่างไปจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

และสามารถจำแนกได้ทุกระยะพัฒนาการชีวิตจึงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลสมุนไพรมาก ๆ ที่ต้องการความสะดวกรวดเร็ว อ้างอิงตามมาตรฐานสากลได้และเมื่อพัฒนาจนกลายเป็นลักษณะประจำพันธุ์แล้วก็จะนำไปใช้อ้างอิงได้ต่อไปในอนาคต ซึ่งจะทำให้สามารถคุ้มครองทรัพยากรพันธุ์พืชของไทยไว้ได้และตรวจสอบการปลอมปนกรณีที่เกิดเป็นสมุนไพรวัวแล้ว นอกจากนี้เมื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ให้มีความแม่นยำมากขึ้น ให้เป็นที่ยอมรับตามหลักนิติวิทยาศาสตร์ ก็ย่อมมีประโยชน์มากมายและสามารถทดแทนเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นที่ยุ่งยาก และมีราคาแพงในการตรวจวิเคราะห์

งานวิจัยครั้งนี้จึงใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcodes) ในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการจำแนกกล้วยไม้เพื่อการใช้เป็นยาสมุนไพรวัวได้เริ่มการทดลองโดยการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับส่วนของคลอโรพลาสต์ 3 บริเวณได้แก่ matK, rbcL และ trnH-psbA intergenic spacer โดยศึกษาในกล้วยไม้สกุลต่างๆ ที่มีสารพฤกษเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟิแนนทรินส์ และเทอร์ปีนอยด์ เช่น สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) สกุลแวนด้า (*Vanda* spp.) สกุลกุหลาบ (*Aerides*) สกุลสิงโต (*Bulbophyllum*) และสกุลอื่นๆ ที่เก็บรวบรวมไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยพืชสวน ไม่น้อยกว่า 40 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากใบมาสกัดดีเอ็นเอ บางส่วนของดีเอ็นเอจะเก็บไว้เพื่อเป็นดีเอ็นเอต้นทุน (stock DNA) อีกส่วนนำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และนำมาศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจสอบความถูกต้องโดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลสากล NCBI หรือฐานข้อมูลดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นทำการประเมินคุณภาพลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยวิเคราะห์ร่วมกับการระบุชนิดของพันธุ์กล้วยไม้ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้และมีความถูกต้องไว้ในฐานข้อมูลสากล NCBI เพื่อเก็บเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดเลือกสายพันธุ์กล้วยไม้ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านเวชสำอาง ด้านเภสัชวิทยาและเพิ่มคุณภาพกล้วยไม้เชิงเภสัชอุตสาหกรรม และเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้งรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ ต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้และการสกัดดีเอ็นเอ

1.1 เก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลต่างๆ ที่มีรายงานเป็นพืชสมุนไพรวัว ซึ่งมีรายงานพบสารพฤกษเคมีกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ ฟิแนนทรินส์ และ เทอร์ปีนอยด์ ของศูนย์วิจัยพืชสวน และเครือข่ายเช่น ศูนย์วิจัยพืชสวน เชียงราย ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ และหน่วยงานภายในกรมวิชาการเกษตร

1.2 สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Lodhi et al., (1994) หรือการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัด Nanodrop จากนั้นเจือจางดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปทำพีซีอาร์

2. การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ matK, rbcL และ trnH-psbA intergenic spacer

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ปริมาตร 20 ul ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ul, DreamTaq Green Master Mix 10 ul, 50 M Primer ด้าน forward และด้าน reverse อย่างละ 1 ul และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 7 ul โดยใช้คูไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้

บริเวณ matK คือ 5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3' และ 5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTT C-3'

บริเวณ rbcL คือ 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' และ 5'-GTAAAATCAAGTCCACCRGC-3'

บริเวณ trnH-psbA intergenic spacer คือ 5'-G TTATGCATGAACGTAATGCTC-3' และ 5'-CGCGCATGGTGGATTACAATCC-3'

โปรแกรมที่ใช้ทำ PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ pre-denaturation ที่ 94°C (1 นาที) 1 รอบ denaturation ที่ 94°C (30 วินาที) annealing 50°C (20 วินาที) และ extension ที่ 72°C (50 วินาที) เป็นจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72°C (5 นาที) 1 รอบ

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.1 ส่งตัวอย่างยีนที่เพิ่มปริมาณได้จากเทคนิคพีซีอาร์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.2 นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 6 หรือโปรแกรมอื่นที่คล้ายกัน เพื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วส่งข้อมูลไปเก็บไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank เพื่อให้ผู้สนใจศึกษาจากทั่วโลกเข้าถึงข้อมูลนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

4. การทดสอบการระบุชนิดของกล้วยไม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

เมื่อได้เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมแล้วจึงตรวจสอบการนำไปใช้ระบุชนิดโดยนำตัวอย่างกล้วยไม้ มาสกัดดีเอ็นเอและทำ PCR ด้วยบริเวณมาตรฐานเดียวกันกับตัวอย่างที่ทราบชนิดแล้ว แล้วนำผลนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์

5. การจัดทำตัวอย่างอ้างอิง

จัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย (Voucher specimen) ตามวิธีการจัดทำพรรณไม้แห้งและส่งเก็บรักษา ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK)

6. การลงทะเบียนในฐานข้อมูล NCBI

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปลงทะเบียนดีเอ็นเอบาร์โค้ดในฐานข้อมูล NCBI เพื่อนำหมายเลข accession มาประกอบในการจัดทำฐานข้อมูลชีวโมเลกุลกล้วยไม้

ผลการวิจัย (Results)

1. การรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้สกุลต่างๆ ที่มีรายงานเป็นพืชสมุนไพร

เก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลต่างๆ ที่มีรายงานเป็นพืชสมุนไพร ซึ่งมีรายงานพบสารพฤกษเคมีกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ ฟิแทนทรินส์ และ เทอร์ปีนอยด์ จากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 40 ตัวอย่างบันทึกชื่อ แหล่งที่มา สามารถรวบรวมได้ดังตาราง 1.4.1

ตารางที่ 1.4.1 ตัวอย่างกล้วยไม้ที่มีรายงานเป็นพืชสมุนไพร

ลำดับ	สายพันธุ์	แหล่งที่มา
1	เอื้องสายเส้าพระอินทร์	บุรีรัมย์
2	เข็มแสด	มุกดาหาร
3	เข็มม่วง	มุกดาหาร
4	ช้างกระ	มุกดาหาร
5	เอื้องแปรงสีฟัน	บุรีรัมย์
6	เอื้องช้างน้ำ	บุรีรัมย์
7	เอื้องมะลิ	จันทบุรี
8	กุหลาบน่าน	มุกดาหาร
9	ตอติเล	มุกดาหาร
10	เอื้องเทียน	มุกดาหาร

11	กุหลาบกระบี่	มุกดาหาร
12	ทางกระรอก	มุกดาหาร
13	มัจฉานุชมพู	จันทบุรี
14	เอื้องสายน้ำผึ้ง	บุรีรัมย์
15	เข็มเหลือง	มุกดาหาร
16	เอื้องสายมรกต	บุรีรัมย์
17	หนวดพรหม	บุรีรัมย์
18	เอื้องจำปา	บุรีรัมย์
19	ไอยเรศใบช้าง	มุกดาหาร
20	เอื้องคำตาดำ	บุรีรัมย์
21	กุหลาบแม่เมย	มุกดาหาร
22	เอื้องสายม่วง	บุรีรัมย์
23	มัจฉานุ	มุกดาหาร
24	เหลืองจันทบูร	ตราด
25	เดลิโอ ขาว	ตราด
26	เอื้องสายน้ำเขียว	ตราด
27	เอื้องสายคำปอน	บุรีรัมย์
28	เอื้องสายนกระจิบ	บุรีรัมย์
29	สิงโตนักกล่อม	มุกดาหาร
30	เขาพระวิหาร	อุบลราชธานี
31	เอื้องสายหลวง	อุบลราชธานี
32	สิงโตสมอหิน	อุบลราชธานี
33	แววมยุรา	อุบลราชธานี
34	เข็มแดง	มุกดาหาร
35	เพชรหึง	มุกดาหาร
36	โมก	มุกดาหาร
37	มาลัยแดง	อุบลราชธานี
38	เอื้องทอง	อุบลราชธานี
39	ตะขาบ	อุบลราชธานี
40	สิงโตใบพัดแดง	มุกดาหาร

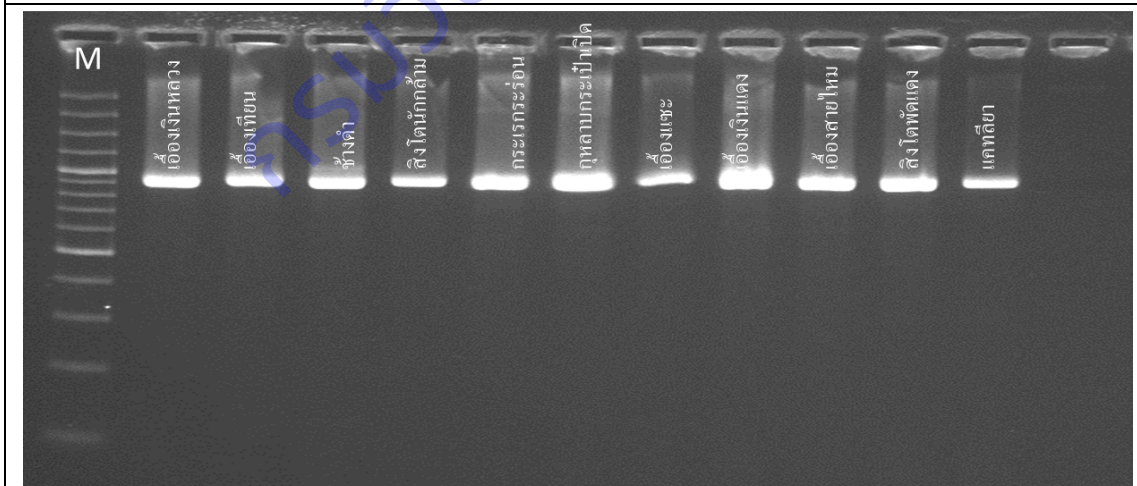
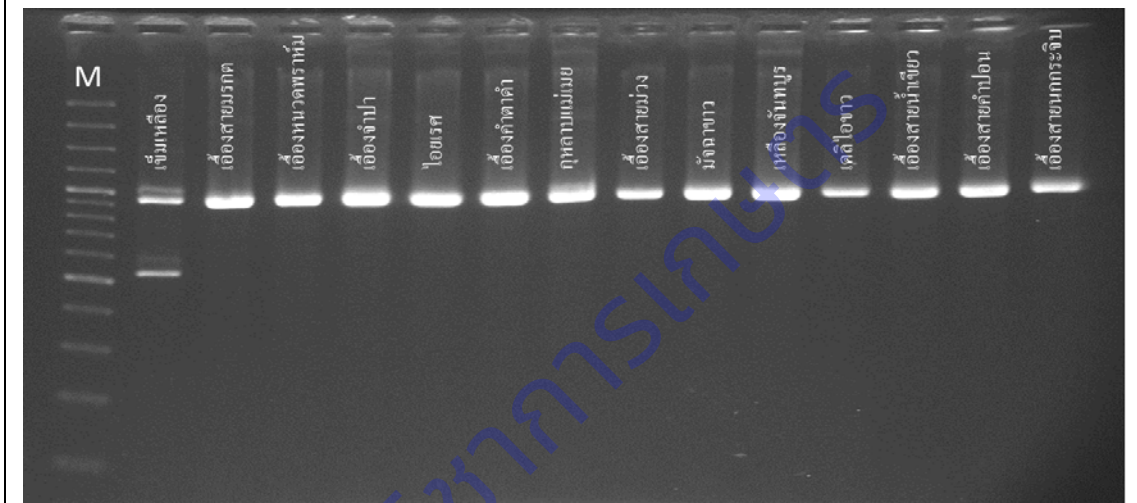
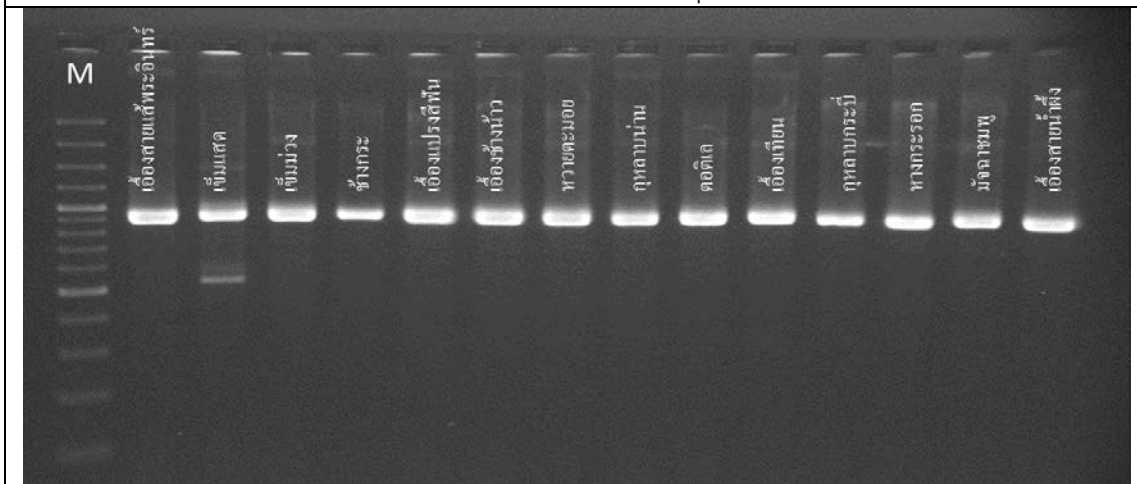
2. จัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิง



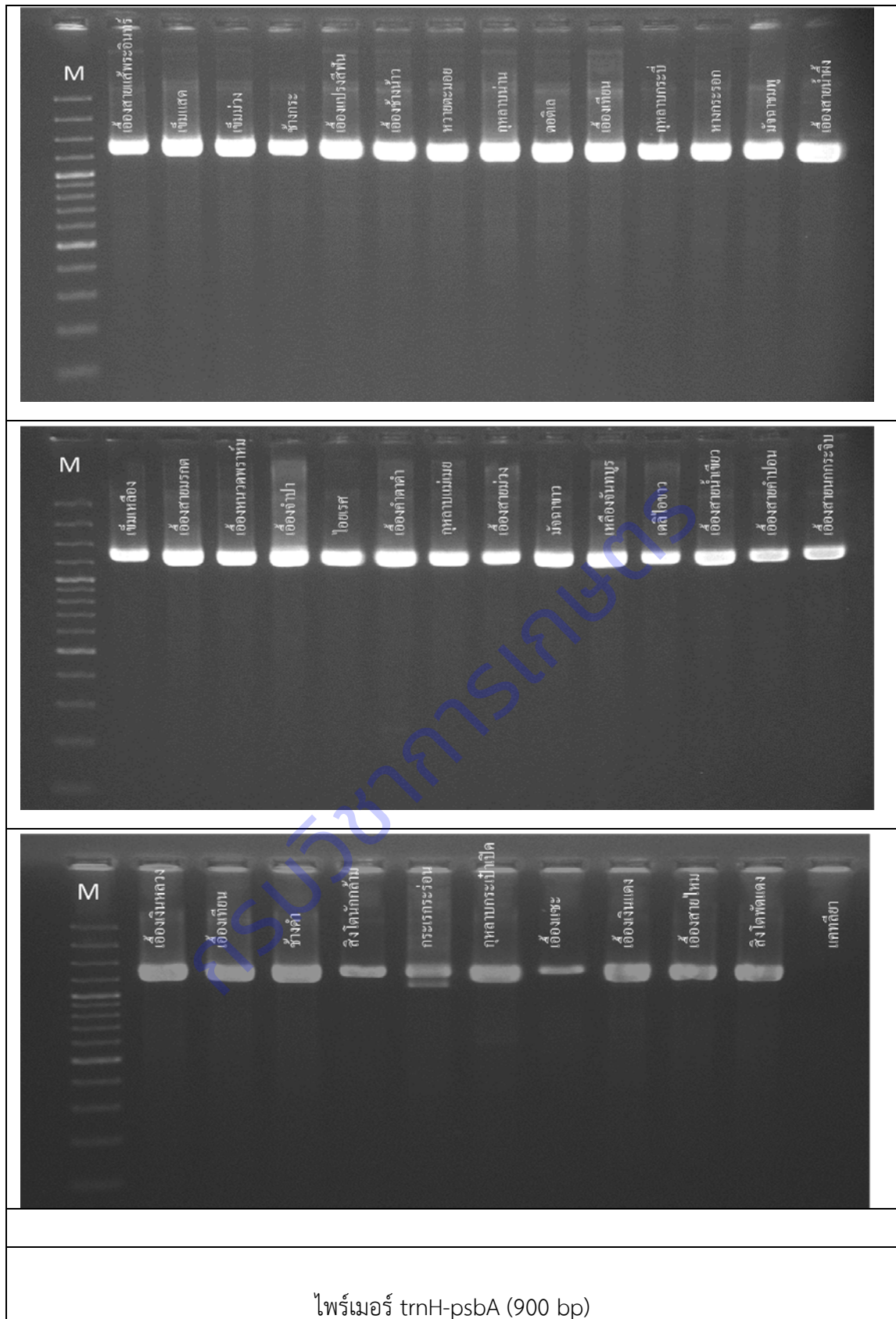
ภาพที่ 1.4.1 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิง

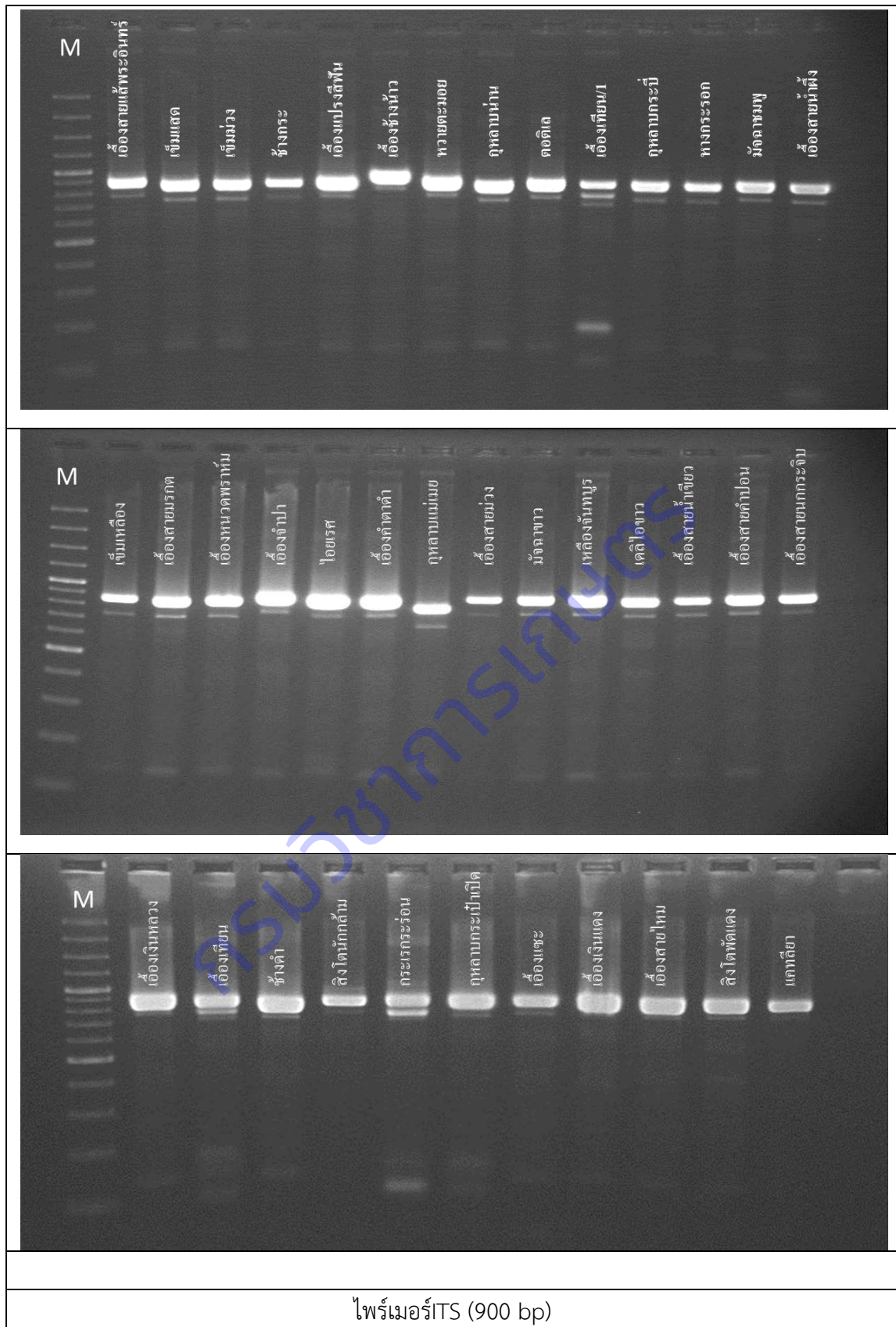
3. สกัดดีเอ็นเอตัวอย่างกล้วยไม้ด้วยวิธี CTAB จำนวน 40 ตัวอย่าง นำไปเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงต่อไป
4. การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA* และ intergenic spacer ได้แถบดีเอ็นเอ ดังภาพ 1.4.2

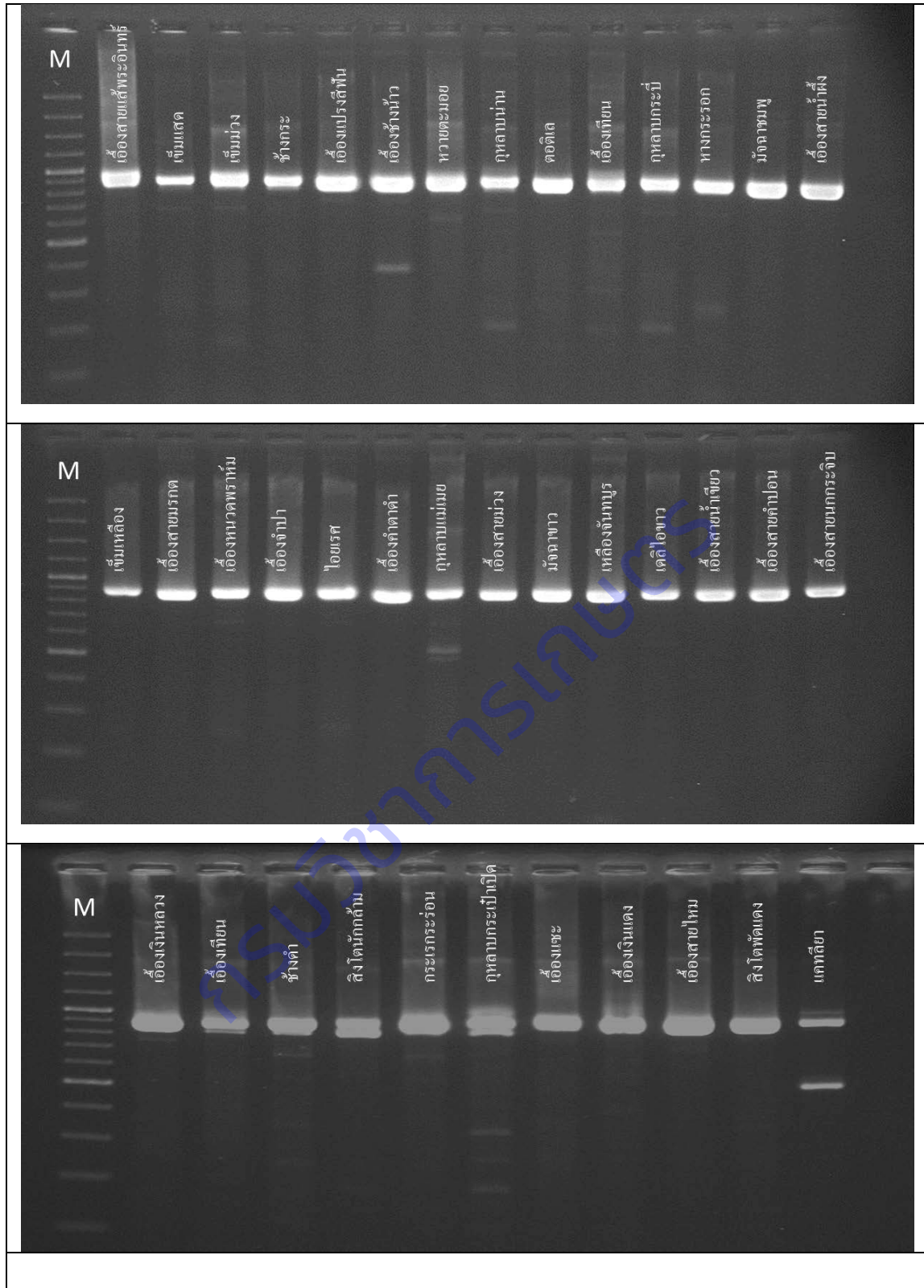
ไพรเมอร์ matK (900 bp)



ไพรเมอร์ rbcL (1400 bp)



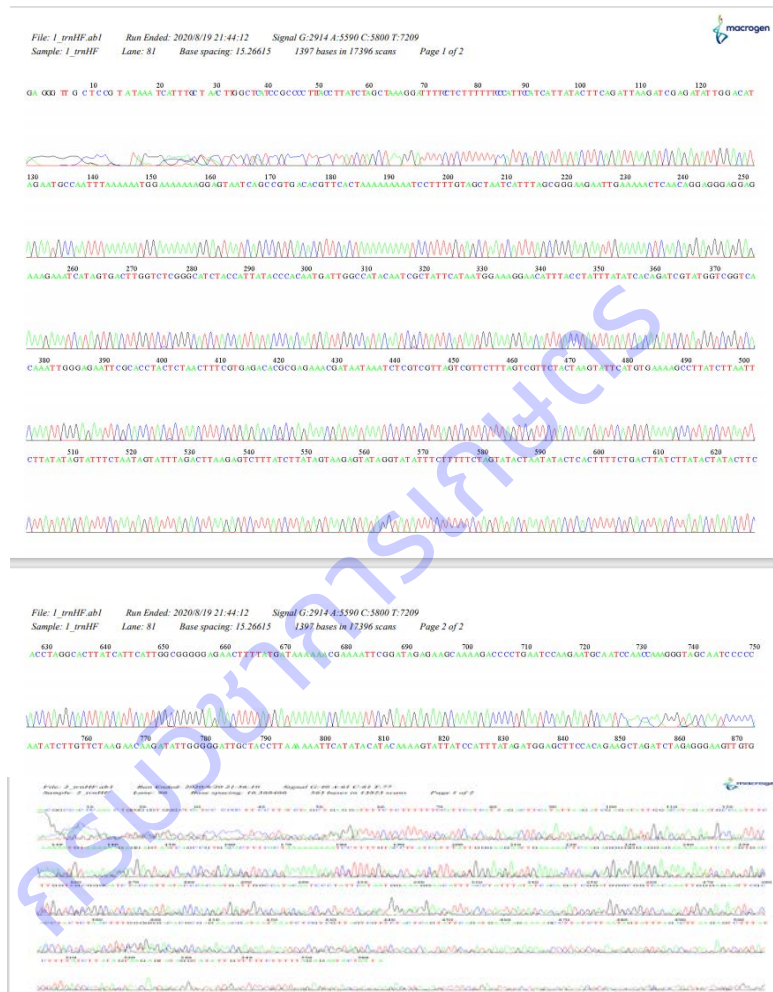




ภาพที่ 1.4.2 ผลการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus M : DNA ladder 100 bp plus

ผลการทดสอบพีซีอาร์กับดีเอ็นเอตัวอย่างกล้วยไม้ จำนวน 40 ตัวอย่างกับไพรเมอร์ matK, rbcL, trnH-psbA และ ITS พบว่า ไพรเมอร์ matK ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 900 bp ไพรเมอร์ rbcL ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1400 bp ไพรเมอร์ trnH-psbA ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 900bp และไพรเมอร์ ITS ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 900 bp

จากการนำแถบดีเอ็นเอที่ได้ของกล้วยไม้สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 40 สายพันธุ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ข้อมูลดังนี้



ภาพที่ 1.4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้สายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล จะได้รายชื่อกล้วยไม้ดังตารางที่ 1.4.2

ตารางที่ 1.4.2 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรวจวิเคราะห์ได้กับฐานข้อมูล GenBank

ลำดับ	สายพันธุ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	Identities
1	เอื้องสายเส้าพระอินทร์	<i>Dendrobium findlayanum</i> voucher JH17-SH photosystem II	96%

		protein D1 (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer and rpl22 pseudogene, complete sequence; ribosomal protein S19 (rps19) gene, complete cds; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast Sequence ID: FJ216473.1 Length: 844 Number of Matches: 2	
2	เข็มแสด	Neofinetia xichangensis voucher Z.J. Liu 2747 plastid, complete genome Sequence ID: NC_047197.1 Length: 146681 Number of Matches: 2	96%
3	เข็มม่วง	Vanda miniata photosystem II protein D1 (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast Sequence ID: KT581391.1 Length: 851 Number of Matches: 1	99%
4	ช้างกระ	Rhynchostylis gigantea psbA-rps19 intergenic spacer, partial sequence; ribosomal protein S19 (rps19) gene, complete cds; rps19-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast Sequence ID: KC693494.1 Length: 735 Number of Matches: 1	95%
5	เอื้องแปรงสีฟัน	Dendrobium crepidatum voucher Jin X.H.072 PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast Sequence ID: KJ174252.1 Length: 841 Number of Matches: 2	99%

ลำดับ	สายพันธุ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	Identities
6	เอื้องช้างน้ำ	Dendrobium moschatum voucher Jin X-H 11886 psbA-trnH intergenic spacer, partial sequence; chloroplast Sequence ID: KF177531.1 Length: 742 Number of Matches: 3	99%
7	เอื้องมะลิ	Dendrobium crumenatum photosystem II protein D1 (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	99%

		Sequence ID: JF693815.1 Length: 810 Number of Matches: 2	
8	กุหลาบน่าน	Aerides krabiensis maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast Sequence ID: EF655784.2 Length: 1679 Number of Matches: 1	99%
9	ตอติเล	Dendrobium tortile voucher KFBG3098D maturase K (matK) gene, partial cds; plastid Sequence ID: KY966874.1 Length: 1147 Number of Matches: 1	99%
10	เอื้องเทียน	Thecostele sp. Chase O-373 maturase K-like (matK) gene, partial sequence; chloroplast gene for chloroplast product Sequence ID: AY368431.1 Length: 1432 Number of Matches: 1	99%
11	กุหลาบกระปี่	Coelogyne longpasiaensis trnK gene, partial intron sequence; and matK pseudogene, complete sequence; chloroplast genes for chloroplast products Sequence ID: AF463365.1 Length: 1826 Number of Matches: 1	77%

ลำดับ	สายพันธุ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	Identities
12	หางกระรอก	Rhynchostylis retusa clone M4 maturase K (matk) gene, partial cds; chloroplast Sequence ID: EU558938.1 Length: 1613 Number of Matches: 1	99%
13	มัจฉานุชมพู	Dendrobium thyriflorum chloroplast, complete genome Sequence ID: MN306203.1 Length: 160123 Number of Matches:1	99%
14	เอื้องสายน้ำผึ้ง	Dendrobium cretaceum voucher KFBG2605A maturase K (matK) gene, partial cds; plastid Sequence ID: KY966818.1 Length: 1147 Number of Matches: 1	99%
15	เข็มเหลือง	Vanda pumila 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	98%

		internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: EF670372.1 Length: 992 Number of Matches: 1	
16	เอื้องสายมรกต	Dendrobium chrysanthum voucher NCHU-D89331201-1010 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: HM590376.1 Length: 885 Number of Matches: 1	97%
17	หมวดพรหม	Holcoglossum kimballianum 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 Sequence ID: EF670359.1 Length: 947 Number of Matches: 1	99%
ลำดับ	สายพันธุ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	Identities
18	เอื้องจำปา	Dendrobium fimbriatum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 26S rRNA, partial sequence Sequence ID: AB593562.1 Length: 846 Number of Matches: 1	99%
19	ไอยเรศใบช้าง	Boesenbergia rotunda 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: AF478726.1 Length: 641 Number of Matches: 1	96%
20	เอื้องคำตาดำ	Dendrobium chrysotoxum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 26S rRNA, partial sequence, bio_material: TBG<JPN>:118321 Sequence ID: AB593533.1 Length: 847 Number of Matches: 1	99%
21	กุหลาบแม่เมย	Vandopsis lissochiloides plastid, complete genome Sequence ID: MN124443.1 Length: 148866	95%

		Number of Matches: 1	
22	เอื้องสายม่วง	Dendrobium parishii chloroplast DNA, complete genome Sequence ID: LC193518.1 Length: 151689 Number of Matches: 1	97%
23	มัจฉานุ	Dendrobium wangliangii chloroplast, complete genome Sequence ID: NC_052727.1 Length: 160052 Number of Matches: 1	96%
24	เห่ลิ่งจันทบูร	Dendrobium flexicaule ZSY05441 chloroplast DNA, complete genome Sequence ID: LC348965.1 Length: 152191 Number of Matches: 1	98%

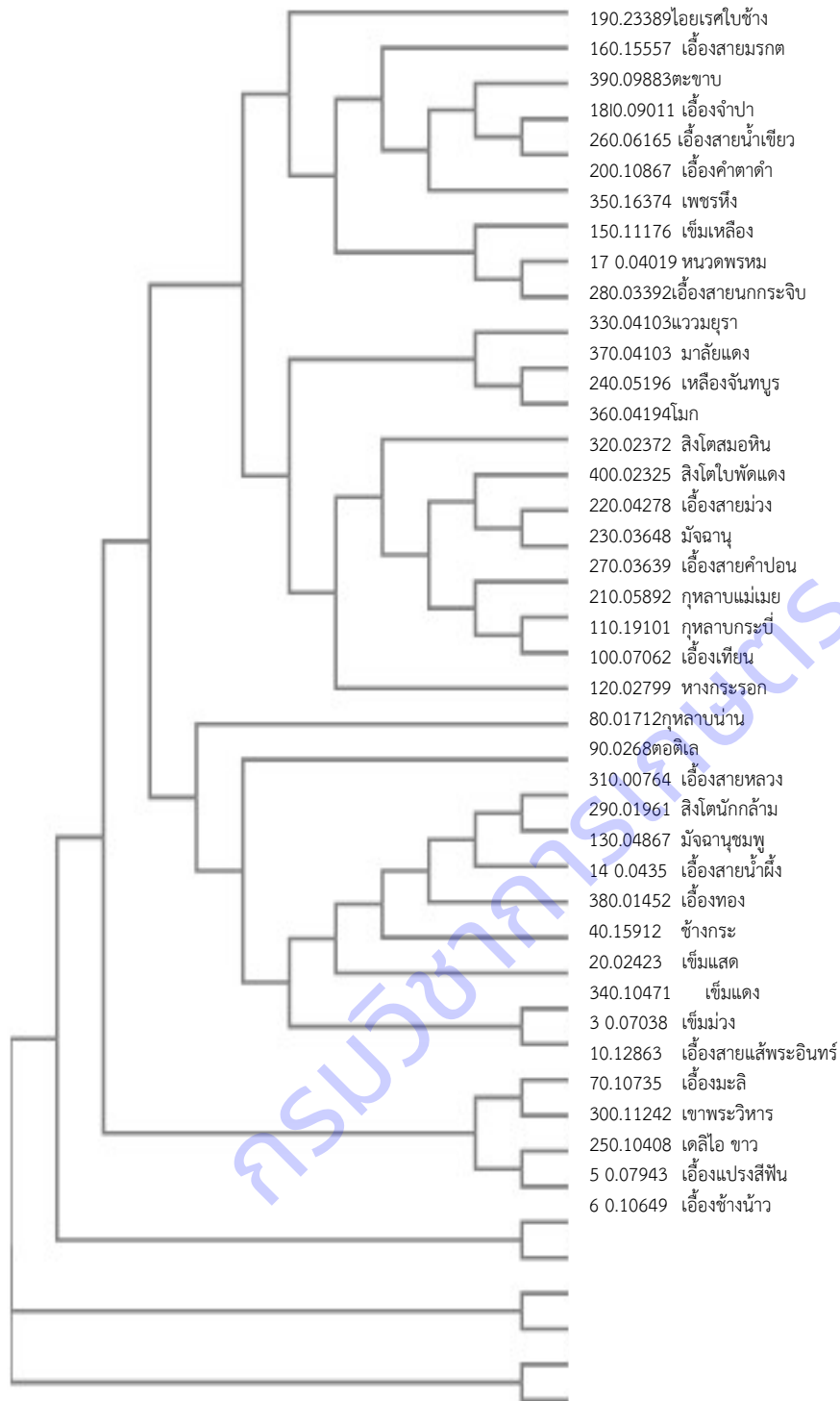
ลำดับ	สายพันธุ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	Identities
25	เดหลีไอ ขาว	Dendrobium ellipsophyllum voucher Jin X-H 13066 PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast Sequence ID: KF177494.1 Length: 821 Number of Matches: 2	99%
26	เอื้องสายน้ำเขียว	Dendrobium primulinum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 26S rRNA, partial sequence, bio_material: TBG<JPN>:159445 Sequence ID: AB593641.1 Length: 846 Number of Matches: 1	99%
27	เอื้องสายคำปอน	Dendrobium gratiosissimum chloroplast DNA, complete genome Sequence ID: LC192958.1 Length: 151829 Number of Matches: 1	97%
28	เอื้องสายนกระจิบ	Dendrobium loddigesii chloroplast DNA, complete genome Sequence ID: LC192960.1 Length: 152493 Number of Matches: 1	98%
29	สิงโตนักกล่อม	Vandopsis gigantea plastid, complete genome Sequence ID: MN124403.1 Length: 149130 Number of Matches: 1	99%
30	เขาพระวิหาร	Dendrobium primulinum isolate JH22 photosystem II protein	99%

		D1 (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer and rpl22 pseudogene, complete sequence; ribosomal protein S19 (rps19) gene, complete cds; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast Sequence ID: EU887936.1 Length: 838 Number of Matches: 2	
--	--	---	--

ลำดับ	สายพันธุ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	Identities
31	เอื้องสายหลวง	Phalaenopsis pulcherrima maturase K (matK) pseudogene and tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; chloroplast Sequence ID: EF079282.1 Length: 1767 Number of Matches: 1	99%
32	สิงโตสมอหิน	Bulbophyllum inconspicuum chloroplast, complete genome Sequence ID: NC_046811.1 Length: 149548 Number of Matches: 1	98%
33	แวมยูรา	Dendrobium fimbriatum chloroplast DNA, complete genome Sequence ID: LC193521.1 Length: 151673 Number of Matches: 1	97%
34	เข็มแดง	Holcoglossum subulifolium PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-rps19 intergenic spacer, complete sequence; ribosomal protein S19 (rps19) gene, complete cds; rps19-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast Sequence ID: KC693491.1 Length: 841 Number of Matches: 2	97%
35	เพชรหึง	Huperzia selago small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: MT117946.1 Length: 5956 Number of Matches: 1	88%
36	โมก	Phalaenopsis wilsonii chloroplast, complete genome Sequence ID: MT800926.1 Length: 145445 Number of Matches: 1	98%
37	มาลัยแดง	Vandopsis lissochiloides plastid, complete genome	98%

		Sequence ID: MN124443.1 Length: 148866 Number of Matches: 1	
ลำดับ	สายพันธุ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	Identities
38	เอื้องทอง	Dendrobium ellipsophyllum chloroplast DNA, complete genome Sequence ID: LC193519.1 Length: 152026 Number of Matches: 1	99%
39	ตะขาบ	Dendrobium parciflorum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 26S rRNA, partial sequence, bio_material: TBG<JPN>:118261 Sequence ID: AB593628.1 Length: 863 Number of Matches: 1	96%
40	สิงโตใบพัดแดง	Bulbophyllum inconspicuum chloroplast, complete genome Sequence ID: NC_046811.1 Length: 149548 Number of Matches: 1	97%

เมื่อนำชิ้นส่วนทั้งสี่ส่วนมารวมกันแล้วนำไปวิเคราะห์แผนภูมิ phylogenetic tree สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้พื้นเมืองที่เก็บรวบรวมได้ออกเป็น 7 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ไอยเรศใบช้าง เอื้องสายมรกต เอื้องตะขาบ เอื้องจำปา เอื้องสายน้ำเขียว เอื้องคำตาดำ เพชรหึง เข็มเหลือง และเอื้องหนวดพราหมณ์ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย เหลืองจันทบูร เอื้องโมก สิงโตสมอหิน สิงโตใบพัดแดง เอื้องสายม่วง มัจฉานุ เอื้องสายคำปอน กุหลาบแม่เมย กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย กุหลาบกระบี่ เอื้องเทียน หางกระรอก กุหลาบน่าน ตอติเล เอื้องสายหลวง สิงโตนกกล้ำม มัจฉานุชมพู เอื้องสายน้ำผึ้ง และ เอื้องทอง กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย ช้างกระ เข็มแสด เข็มแดง และ เข็มม่วง กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย เอื้องสายเส้าพระอินทร์ และเอื้องมะลิ กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย เขาพระวิหาร เตลิวขาว และกลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย เอื้องแปรงสีฟัน และเอื้องช้านาว ดังภาพที่ 1.4.4



ภาพที่ 1.4.4 แสดงความสัมพันธ์ในรูปแบบ Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้พื้นเมืองที่มีศักยภาพเป็นพืชสมุนไพรด้วยโปรแกรม Mega 6

อภิปรายผล (Discussion)

ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อระบุชนิดของพืชวงศ์กล้วยไม้ที่มีศักยภาพเป็นพืชสมุนไพรนั้น ได้เริ่มทำการเก็บรวบรวมกล้วยไม้สายพันธุ์พื้นเมืองที่มีศักยภาพเป็นพืชสมุนไพรจากภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วประเทศ แต่เนื่องจากประสบปัญหาการเดินทางรวบรวมตัวอย่างเนื่องจากสถานการณ์การระบาดของโรคโควิด - 19 ในช่วงระยะเวลาวิจัยทั้ง 2 ปีคือ 2563 -2564 จึงสามารถเก็บตัวอย่างได้จากภาคอีสาน เป็นส่วนใหญ่คือจังหวัดขอนแก่น บุรีรัมย์และมุกดาหาร และในพื้นที่เขตภาคตะวันออกได้แก่จังหวัดจันทบุรีและจังหวัดตราด เป็นต้น ในการวิจัยนี้สามารถรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้ได้จำนวน 40 ชนิด ได้แก่ เอื้องสายเส้พระอินทร์เข็มแสดเข็มม่วงข้างกระเอื้องแปรงสีฟันเอื้องข้างน้ำเอื้องมะลิกุหลาบ น่านตอติเลเอื้องเทียนกุหลาบกระบี่หางกระรอกมัจฉานุชมพูเอื้องสายน้ำผึ้งเข็มเหลืองเอื้องสายมรกต หนวดพรหมเอื้องจำปาโอยเรศใบข้างเอื้องคำตาคำกุหลาบแม่เมยเอื้องสายม่วงมัจฉานุชเหลืองจันทบูร เตลื่อ ขาวเอื้องสายน้ำเขียวเอื้องสายคำปอนเอื้องสายนกกระจิบสิงโตนักกล่อมเขาพระวิหารเอื้องสาย หลวงสิงโตสมอหินแววมยุราเข็มแดงเพชรหึงเอื้องโมกมาลัยแดงเอื้องทองตะขาบสิงโตใบพัดแดง เป็นต้น ได้รวบรวมตัวอย่างไว้ที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อำเภोधัญบุรี จังหวัดปทุมธานี และเก็บตัวอย่างแห้งตลอดจนดีเอ็นเอไว้

ในการคัดเลือกส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้คัดเลือกไว้ 4 บริเวณได้แก่ การสร้าง เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ matK, rbcLtrnH-psbA และ intergenic spacer โดยเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ matK, rbcL, trnH-psbA และITS พบว่าชิ้นส่วนบริเวณยีน matK ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส บริเวณ rbcL ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1400 คู่เบส ชิ้นส่วนบริเวณยีน trnH-psbA ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส และชิ้นส่วนบริเวณยีน ITS ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส เช่นกัน เมื่อนำชิ้นส่วนยีนต่าง ๆ เหล่านี้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำมารวมเป็นสายเดียวกันก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม วิเคราะห์ phylogenetic tree จึงสามารถให้ความแตกต่างได้ ทั้งนี้ได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของแต่ละสายไปเปรียบเทียบกับข้อมูลกล้วยไม้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blast พบว่ากล้วยไม้ที่เก็บรวบรวมไว้มีความเหมือนกับกล้วยไม้ที่มีรายงานในฐานข้อมูล ดังแสดงในตารางที่ 1.4.2 และเมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ phylogenetic tree สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้พื้นเมืองที่ เก็บรวบรวมได้ออกเป็น 7 กลุ่ม ดังนี้กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย โอยเรศใบข้าง เอื้องสายมรกต เอื้อง ตะขาบเอื้องจำปาเอื้องสายน้ำเขียวเอื้องคำตาคำเพชรหึงเข็มเหลือง และเอื้องหนวดพรหม กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย เหลืองจันทบูรเอื้องโมกสิงโตสมอหิน สิงโตใบพัดแดง เอื้องสายม่วง มัจฉานุช เอื้องสาย คำปอน กุหลาบแม่เมย กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย กุหลาบกระบี่เอื้องเทียน หางกระรอก กุหลาบ น่านตอติเล เอื้องสายหลวง สิงโตนักกล่อม มัจฉานุชมพู เอื้องสายน้ำผึ้ง และ เอื้องทองกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย ข้างกระ เข็มแสด เข็มแดง และ เข็มม่วงกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย เอื้องสายเส้พระอินทร์ และเอื้องมะลิกกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย เขาพระวิหาร เตลื่อขาว และกลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย เอื้องแปรง สีฟัน และเอื้องข้างน้ำ

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (conclusion and Suggestion)

จากการเก็บรวบรวมพืชวงศ์กล้วยไม้ที่มีศักยภาพเป็นพืชสมุนไพรจำนวน 40 ชนิดได้แก่ เอื้องสายเส้ พระอินทร์เข็มแสดเข็มม่วงข้างกระเอื้องแปรงสีฟันเอื้องข้างน้ำเอื้องมะลิกุหลาบ น่านตอติเลเอื้อง เทียนกุหลาบกระบี่หางกระรอกมัจฉานุชมพูเอื้องสายน้ำผึ้งเข็มเหลืองเอื้องสายมรกตหนวดพรหมเอื้อง

จำปาไอยเรศใบข้างเอื้องคำตาตำกุหลาบแม่เมยเอื้องสายม่วงมัจฉานุเหลืองจันทบูรเตลือขาวเอื้องสายน้ำเขียวเอื้องสายคำปอนเอื้องสายนกระจิบสิงโตนักกล้ำเขาพระวิหารเอื้องสายหลวงสิงโตสมอหินแวมยุราเข็มแดงเพชรหึงเอื้องโมกมาลัยแดงเอื้องทองตะขาบสิงโตใบพัดแดง เป็นต้น ได้รวบรวมตัวอย่างไว้ที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อำเภอรัญบุรี จังหวัดปทุมธานี และเก็บตัวอย่างแห้งตลอดจนดีเอ็นเอไว้ในธนาคารดีเอ็นเอ และพิพิธภัณฑพืช กรมวิชาการเกษตร ได้นำไปสกัดดีเอ็นเอจำนวน 40 ตัวอย่างและนำไปสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ matK, rbcLtrnH-psbA และ intergenic spacer ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ matK, rbcL, trnH-psbA และITS พบว่าชิ้นส่วนบริเวณยีน matK ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส บริเวณ rbcL ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1400 คู่เบส ชิ้นส่วนบริเวณยีน trnH-psbA ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส และชิ้นส่วนบริเวณยีน ITS ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส เช่นกัน เมื่อนำชิ้นส่วนยีนต่าง ๆ เหล่านี้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมารวมเป็นสายเดียวกันก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย โปรแกรมวิเคราะห์ phylogenetic tree จึงสามารถให้ความแตกต่างได้ ทั้งนี้ได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละสายไปเปรียบเทียบกับข้อมูลกล้วยไม้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blast พบว่ากล้วยไม้ที่เก็บรวบรวมไว้มีความเหมือนกับกล้วยไม้ที่มีรายงานในฐานข้อมูลเมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ phylogenetic tree สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้พื้นเมืองที่เก็บรวบรวมได้ออกเป็น 7 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไอยเรศใบข้าง เอื้องสายมรกต เอื้องตะขาบเอื้องจำปาเอื้องสายน้ำเขียวเอื้องคำตาตำเพชรหึงเข็มเหลือง และเอื้องหนวดพราหมณ์ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย เหลืองจันทบูรเอื้องโมกสิงโตสมอหิน สิงโตใบพัดแดง เอื้องสายม่วง มัจฉานุ เอื้องสายคำปอน กุหลาบแม่เมย กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย กุหลาบกระปี่เอื้องเทียน หางกระรอก กุหลาบน่าน ตอติเล เอื้องสายหลวง สิงโตนักกล้ำ มัจฉานุชมพู เอื้องสายน้ำผึ้ง และ เอื้องทองกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย ช้างกระ เข็มแสด เข็มแดง และ เข็มม่วงกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย เอื้องสายเส้พระอินทร์ และเอื้องมะลิกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย เขาพระวิหาร เตลือขาว และกลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย เอื้องแปรงสีฟัน และเอื้องช้านาว ทั้งนี้จะได้นำข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้ทั้งหมดไปเก็บรวบรวมในฐานข้อมูลต่อไป

การทดลองที่ 1.5

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริก

DNA Barcoding and Genetic Diversity of Chilli

ชื่อผู้วิจัย

นายธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์ นางกัญญาภรณ์ พิพิธแสงจันทร์

นางสาวอภิญา วงศ์เปี้ย นางวิลาวัลย์ ไคร์ครวญ

Theerapat Luangsaphabool Kunyaporn Pipithsangchan

Aphinya Wongpia Wilawan Kraikruan

คำสำคัญ: พริก ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Key words : Chilli DNA barcode Genetic diversity

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกในประเทศไทยด้วยวิธีดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณตำแหน่งยีน *ITS*, *rbcl* และ *trnH-psbA* โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพริกที่เก็บรวบรวมเชื้อพันธุ์พริกจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยได้จำนวน 84 ตัวอย่างพันธุ์ ด้วยวิธี PCR และนำผลผลิต PCR มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของชนิดพริกกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี maximum likelihood และ Bayesian inference วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (haplotype diversity) ด้วยการสร้างเครือข่าย haplotype ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อประมาณประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ด ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า สามารถจัดจำแนกพริกที่พบในประเทศไทยได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq. และ *C. frutescens* L. และจากการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ตำแหน่ง *ITS* เป็นตำแหน่งที่มีอัตราความสำเร็จทำที่ต่ำเพียง 71% และผลการทดสอบความคล้ายคลึงกันของชนิดพริกกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนตำแหน่ง *rbcl* และ *trnH-psbA* ไม่สามารถระบุชนิดพริกได้ ขณะที่ยีนตำแหน่ง *ITS* สามารถระบุความแตกต่างของ *C. annuum* ออกจากพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* ได้ และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของยีนแต่ละตำแหน่ง พบว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนในคลอโรพลาสต์ (*rbcl* และ *trnH-psbA*) เป็นตำแหน่งที่ไม่มีประสิทธิภาพในการเป็นดีเอ็นเอบาร์สำหรับใช้จัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์พริก โดยยีนตำแหน่ง *rbcl* ไม่สามารถใช้ในการจำแนกชนิดภายในกลุ่มพริก *C. annuum*, *C. baccatum* และ *C. pubescens* และกลุ่มพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* ออกจากกันได้ และ *trnH-psbA* สามารถใช้ระบุชนิดพริก *C. baccatum* ออกจากพริกชนิดอื่นๆ ได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ในขณะที่ยีนบริเวณนิวเคลียส คือ ตำแหน่ง *ITS* เป็นตำแหน่งที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับใช้เป็นที่ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพริก โดยสามารถใช้จัดจำแนกความแตกต่างระดับชนิดและระดับสายพันธุ์ของพริกในประเทศไทยได้ โดยเฉพาะในกลุ่มพริก *C. annuum* นอกจากตำแหน่ง *ITS* จะแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ในกลุ่ม *C. annuum* ได้แล้วยังสามารถใช้จำแนกความแตกต่างในระดับชนิดระหว่าง *C. annuum*, *C. baccatum* และ *C. pubescens* ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม ตำแหน่ง *ITS* กลับไม่สามารถจัดจำแนกชนิดระหว่างพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* ออกจากกันได้ โดยการจับกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมปรากฏมีความสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของสีกลีบดอกด้วย และจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกกลุ่ม *C. annuum* มีค่อนข้างสูง พบว่าสามารถแบ่งได้ถึง 20 haplotypes และยังพบว่ากลุ่มพริกบางช่วงมีความแปรผันทางพันธุกรรมที่มีความหลากหลายสูงถึง 5 haplotypes โดยความแปรผันนั้นไม่ขึ้นกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีนบริเวณนิวเคลียสมีประสิทธิภาพที่ดีกว่ายีนบริเวณคลอโรพลาสต์ การศึกษาและพัฒนาโปรแกรมที่มีความจำเพาะกับชนิดพืชและดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ใหม่เหมาะสมจะช่วยให้สามารถจัดจำแนกชนิดพริกได้ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

Abstracts

Genetic diversity of chilli (*Capsicum*) in Thailand was studied by DNA barcoding based on *ITS rbcL* and *trnH-psbA* regions. Eighty-four of chilli samples were amplified via PCR method and then transferred the PCR products to DNA sequencing. These DNA sequences were compared to species similarity with GenBank databases by BLAST program. Molecular phylogeny was implemented by maximum likelihood Bayesian inference protocols. Haplotype diversity was analyzed by construct the haplotype network. Morphological characters were used to co-analyzed in this study. The *Capsicum* species in Thailand was divided in to 4 species based on taxonomic characters that including as *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* and *C. frutescens*. The *ITS* locus showed low late for success of DNA sequencing (71%). Two DNA loci of *rbcL* and *trnH-psbA* did not used for identify chilli species, while *ITS* region can be separate the *C. annuum* from *C. chinense* and *C. frutescens*. The phylogenetic trees were constructed based on chloroplast DNA (each of *rbcL* and *trnH-psbA* trees) that showed as low DNA barcoding capacity for classification *Capsicum* into species and variety level. The *rbcL* region did not delimit species within the group of *C. annuum*, *C. baccatum* and *C. pubescens* and group of *C. chinense* and *C. frutescens*, and *trnH-psbA* locus can be separate only *C. baccatum* species. The nuclear DNA (*ITS*) showed a high effective for DNA barcoding of *Capsicum*, which can be identified into species and variety level of *Capsicum* species in Thailand, especially *C. annuum* group. The *ITS* region was not only revealed to the difference of variety within *C. annuum* group but also was identified between *C. annuum*, *C. baccatum* and *C. pubescens* species. Although, *ITS* locus showed as a good DNA barcoding but did not using to separate *C. chinense* and *C. frutescens* species. The *ITS* phylogeny results that showed the relationship related to only a petal color. In this study, *C. annuum* group revealed to a high genetic diversity, which can be divided into 20 haplotypes. In addition, *C. annuum* (Bang Chang) group showed a high genetic variation and haplotype diversity as 5 haplotypes, which this haplotype diversity did not related to morphological characters. This studies indicated that DNA barcode based on nuclear DNA gene was more DNA barcode effective than the chloroplast DNA gene. The future study should be investigates and develops the plant species-specific primer and new DNA barcoding region for helps to ensure classify *C. annuum* species.

บทนำ (Introduction)

พริก (chilli, chili, chile หรือ pepper) เป็นพืชในวงศ์ Solanaceae เช่นเดียวกับมะเขือ ยาสุบ มันฝรั่งและพืชน้ำ โดยจัดอยู่ในสกุล *Capsicum* ซึ่งในปัจจุบันพบมากกว่า 38 ชนิด (USDA-ARS, 2011) แต่ที่นิยมนำมาเพาะปลูกนั้นมีอยู่ 6 ชนิด ได้แก่ *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* และ *C. assamicum* โดยชนิดหลังเพิ่งได้รับการระบุ

ว่าเป็นพริกเพาะปลูกชนิดใหม่ที่มีถิ่นกำเนิดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย ซึ่งพริกดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* เพียงแต่ต่างกันที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Purukayastha et al., 2012) พริกมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ ก่อนที่จะแพร่กระจายไปยังทวีปยุโรป แอฟริกา และเอเชียตามลำดับ (Bosland, 1996) การเพาะปลูกพริกในปัจจุบันมีเป้าหมายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทั้งบริโภคแบบพืชมัก ใช้เป็นเครื่องเทศปรุงรสอาหาร ใช้ในทางการแพทย์ ใช้ในการผลิตแก๊สน้ำตา และปลูกเป็นไม้ประดับ เป็นต้น พริกอุดมไปด้วยฟลักซ์เคมี (phytochemical) ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยมีปริมาณวิตามินซีสูงกว่าส้มถึง 7 เท่า และยังประกอบด้วยสารเมแทบอลิต์ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น แคโรทีนอยด์ (โปรวิตามินเอ) กรดแอสคอร์บิก ฟลาโวนอยด์ และพอลิฟีนอล (Nadeem et al., 2011) จึงช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคหอบหืด เจ็บคอ ปวดหัว และเบาหวาน สำหรับพริกแดง (red pepper) ยังมีไลโคพีนซึ่งเชื่อว่ามีสมบัติในการต้านทานโรคมะเร็งได้ด้วย (Simonne et al., 1997) นอกจากนี้พริกยังมีแคปไซซินและไฮโดรแคปไซซิน ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิในกลุ่มแคปไซซินอยด์อันเป็นสาเหตุของความเผ็ดในผลพริก และความเผ็ดนี้เป็นลักษณะที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่างพริกเผ็ด (hot pepper) และพริกหวาน (sweet pepper) แคปไซซินสามารถใช้เป็นตัวยาบรรเทาความเจ็บปวดระหว่างการบำบัดด้วยวิธีทางเคมีและการฉายรังสีได้ (Berger et al., 1995)

จากข้อมูลข้างต้น จะเห็นได้ว่าพริกมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและเต็มไปด้วยฟลักซ์เคมีที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ เมื่อมองในมุมของมูลค่าเชิงเศรษฐกิจของประเทศไทย รายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรโดยความร่วมมือของกรมศุลกากร (2560) แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของมูลค่าการส่งออกที่เพิ่มสูงขึ้นของพริกในรูปพริกแห้งในช่วง 5 ปีหลัง โดยในปี พ.ศ. 2559 มีการส่งออกพริกแห้งปริมาณ 9,086 ตัน คิดเป็นมูลค่าถึง 469 ล้านบาท จึงนับได้ว่าพริกเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยในการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์พืชให้มีศักยภาพทางเศรษฐกิจนั้นจะต้องมีองค์ความรู้เกี่ยวกับพืชชนิดนั้นๆ เสียก่อน โดยทั่วไปการเก็บข้อมูลพันธุ์พืชจะอาศัยการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ตามลักษณะปรากฏหรือฟีโนไทป์ของพืช อย่างไรก็ตามลักษณะเหล่านี้แปรผันตามอิทธิพลของสภาพแวดล้อม นอกจากนี้สายพันธุ์พริกในประเทศไทยมีความหลากหลายและมีความแปรปรวนของความเผ็ดและลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ (เช่น ขนาดผล รูปร่าง และสี) ค่อนข้างสูง จึงเป็นที่มาของการเก็บข้อมูลในรูปของลักษณะทางพันธุกรรมของพืช

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางชีววิทยาโมเลกุล ทำให้เกิดเทคนิคใหม่ๆ ขึ้นมากมายที่เป็นประโยชน์ต่อการพิสูจน์ทราบหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพืชและจัดทำฐานข้อมูลชีวโมเลกุลจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้อาทิเช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis Diagnostic Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) และ Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) เป็นต้น ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านี้มีข้อดีและข้อจำกัดต่างๆ กันไป นอกจากนี้เทคนิคข้างต้นแล้วการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) เป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่กำลังได้รับความสนใจ เพราะเป็นเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิต โดยในพืชนิยมใช้กลุ่มยีนบนคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส ได้แก่ maturase K (*matK*) rubisco L (*rbcl*) และ internal transcribed spacers (*ITS*) เป็นต้น ดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้รับความสนใจมาก เพราะมีประสิทธิภาพ และมีความแม่นยำ สามารถนำมาประยุกต์ใช้

ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ในระยะเวลาอันสั้น ช่วยยืนยันการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทาง สัณฐานวิทยาให้เป็นไปอย่างถูกต้อง รวดเร็ว รวมทั้งเป็นประโยชน์สำหรับการค้นคว้าวิจัยด้าน วิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ การอนุรักษ์พันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต รวมถึงเป็นประโยชน์ใน การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะเด่นเพื่อปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจต่อไปในอนาคตอีกด้วย

การทบทวนวรรณกรรม

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) เป็นเทคนิคทางอนุกรมวิธานที่ใช้ในการระบุเอกลักษณ์ ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็วโดยใช้ลำดับเบสสายสั้น (400-800 bp) ที่วางตำแหน่งอยู่บนดีเอ็นเอของ สิ่งมีชีวิต โดยลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมนั้นจะมีความแปรผันสูงและมีลักษณะเฉพาะในแต่ละ สิ่งมีชีวิต (Hebert et al., 2003; Kress and Erickson, 2008) ยีนหรือตำแหน่งบนดีเอ็นเอหรือที่ ใช้เป็นบาร์โค้ดนั้นต้องผ่านการตกลงและยอมรับ (standardized genetic loci) ให้เป็นบาร์โค้ดของ สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ โดยสามารถระบุชนิดหรือเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกับบาร์โค้ดที่สามารถ ระบุชนิดสินค้าได้ ตำแหน่งที่ใช้เป็นบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตสามารถพบในดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย คลอโรพลาสต์ และนิวเคลียส สำหรับการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชนั้น นิยมใช้ตำแหน่งบนดีเอ็นเอ ที่ผ่านการวิจัยและยอมรับให้ใช้เป็นบาร์โค้ดสำหรับพืชหลายตำแหน่งด้วยกัน ตัวอย่างเช่น *matK**rbcL* internal transcribed spacers (ITS) *psbA-trnH* intergenic spacer และ *trnL-trnF* intergenic spacer เป็นต้น (สรวงและคณะ, 2554; Kress and Erickson, 2008)

การใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมควบคู่ไปกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นที่นิยมมากขึ้นในการจัด จำแนกพืชชนิดต่างๆ รวมถึงพืชกลุ่มพริกด้วย ซึ่งได้มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลและเทคนิคทาง อนุกรมวิธานต่างๆ เพื่อช่วยในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกและช่วยในการระบุ เอกลักษณ์สายพันธุ์ โดย Thul et al., (2012) ได้ใช้เทคนิค ISSR และ RAPD เพื่อช่วยในการจัด จำแนกสายพันธุ์พริกในสกุล *Capsicum* จำนวน 6 ชนิด ที่ยากต่อการจัดจำแนกด้วยลักษณะทาง สัณฐานวิทยา ได้แก่ *C. annuum**C. baccatum**C. chinense**C. eximium**C. frutescens* และ *C. luteum* โดยมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของวิธี ISSR และ RAPD อยู่ในช่วง 23–88% และ 11– 96% ตามลำดับ ในประเทศบังคลาเทศได้มีการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และประเมินความหลากหลาย ของเชื้อพันธุกรรมพริกจำนวน 22 ตัวอย่างพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 13 เครื่องหมาย (Hossain et al., 2014) ซึ่งพบว่า SSR จำนวน 4 เครื่องหมาย (*Hpms 1-41* *Hpms 1- 155* *Hpms 2-2* และ *Hpms 2-21*) สามารถทำให้เกิดความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้โดยสามารถ ตรวจวัดแอลลีลได้ทั้งหมด 27 แอลลีล และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) อยู่ ระหว่าง 0.704-0.926 ซึ่งบ่งชี้ว่าสายพันธุ์พริกเหล่านี้มีแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกันไป เมื่อสร้าง แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพริกแต่ละสายพันธุ์สามารถจำแนกพริกได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะนำไปปรับปรุงลักษณะสายพันธุ์พริกที่สนใจได้ สำหรับในประเทศไทยมีการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล RAPD ในการประเมินพันธุกรรมพริก ได้แก่ *C. annuum* var. *acuminatum**C. chinensis**C. frutescens* และ *Solanum melongena* (Kaewdoudgdee and Tanee, 2013)

นอกจากนี้การใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดควบคู่ไปกับการประเมินทางสัณฐานวิทยาเป็นที่นิยมเพิ่มมากขึ้นเพื่อให้ได้มาซึ่งองค์ความรู้ที่ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น การคัดเลือกและการศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับใช้เป็นบาร์โค้ดนับเป็นขั้นตอนสำคัญเพื่อให้ได้มาซึ่งการจัดจำแนกพืชได้อย่างถูกต้องและแม่นยำเพิ่มมากขึ้น โดยเครื่องหมายทางพันธุกรรมหลายชนิด ได้แก่ *trnS-trnfMtrnL-trnTtrnH-psbAtrnF-trnLtrnD-trnTtrnCrpoBrps16* และ *matK* และยีนบนนิวเคลียส *waxy* introns ได้ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพของการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อจัดจำแนกและระบุเอกลักษณ์ของพริกในสกุล *Capsicum* จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *C. annuum* *C. baccatum* *C. chinense* *C. frutescens* *C. pubescens* *C. chacoense* และ *C. rhomboideum* ที่ปลูกอยู่ในประเทศจอร์เจีย โดยพบว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ตำแหน่ง *trnL-trnTtrnF-trnL* และ *trnH-psbA* มีความแปรผันทางพันธุกรรมมากพอที่ทำให้สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมที่มีความซับซ้อนของกลุ่ม *C. annuum* complex (*C. annuum* *C. chinense* และ *C. frutescens*) ออกจากสายพันธุ์อื่นๆ ได้ นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงแทนที่ลำดับเบสที่ตำแหน่งยีน *waxy* ยังสามารถใช้ในการระบุความแตกต่างระหว่างชนิดได้ โดยได้มีการเสนอให้ใช้ *trnH-psbA* หรือ *trnL-trnT* และ *waxy* introns เป็นตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับประเมินสายพันธุ์ของ *C. annuum* complex (*C. annuum* *C. chinense* และ *C. frutescens*) (Jarret, 2008) นอกจากนี้ยีนตำแหน่ง *psbA-trnH* เป็นเพียงตำแหน่งเดียวที่มีการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดกับพริกในประเทศไทย จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *C. annuum* var. *acuminatum* *C. chinensis* และ *C. frutescens* เพียงชนิดละ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์เท่านั้น โดยมีช่วงความแปรผันทางพันธุกรรมประมาณ 0.23-0.26 (Kaewdougdee and Tanee, 2013)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าข้อมูลในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกยังมีอย่างจำกัด และไม่เพียงพอต่อการอ้างอิงฐานข้อมูลพันธุกรรมพริก โดยเฉพาะสายพันธุ์พริกในประเทศไทย ดังนั้นการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพริกในประเทศไทยจะช่วยให้งานด้านอนุกรมวิธานและการจัดจำแนกสายพันธุ์พริกมีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้นอกจากจะให้ประโยชน์ด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมแล้ว ยังสามารถระบุเอกลักษณ์ของสายพันธุ์พริกได้ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการจำแนกพริกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันออกจากกันได้อีกด้วย

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การเก็บตัวอย่างพริก

เก็บรวบรวมความหลากหลายทางชีวภาพของพริกสายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย อย่างน้อย 60 ตัวอย่าง และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2. การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

สกัดดีเอ็นเอของพริก

ปลูกพริกลงในกระถางที่มีวัสดุปลูก โดยใช้ตัวอย่างพริกที่เก็บรวบรวมและอนุรักษ์ไว้จากข้อ 1 เก็บใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB หรือชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป แล้วตรวจวัดคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) และวิธีอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ก่อนคำนวณให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์หรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนในคลอโรพลาสต์จำนวน 2 ยีน (*matK*, *rbcl*, และ *psbA-trnH*) และยีนในนิวเคลียส 1 ยีน (ITS) รวมทั้งหมด 3 ยีน โดยใช้คูปิพรเมอร์สำหรับยีนเหล่านั้น และหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาของคูปิพรเมอร์แต่ละคู่ จากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

4. ทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ (purification kit)

5. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งควรจะได้แถบดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการเพียง 1 แถบและไม่มีแถบอื่นของแถบดีเอ็นเออื่น จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องมือและกรรมวิธีสำหรับการวิเคราะห์

6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพริกแต่ละสายพันธุ์ด้วยการทำ DNA alignment ด้วยโปรแกรม MEGA11 สร้างวงศาคานวิวัฒนาการของพริกด้วยวิธี maximum likelihood และ Bayesian inference ด้วยโปรแกรม RAxML และ MrBayes 3 ตามลำดับ

7. การจัดทำตัวอย่างอ้างอิง

ทำการจัดเก็บตัวอย่างอ้างอิงในรูปแบบดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -80°C ไว้ที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี และจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย (Voucher specimen) ตามวิธีการจัดทำพรรณไม้แห้ง และส่งเก็บรวบรวมไว้ที่สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช

8. การลงทะเบียนในฐานข้อมูล NCBI

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปลงทะเบียนดีเอ็นเอบาร์โค้ดในฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อนำหมายเลข accession มาประกอบในการจัดทำฐานข้อมูลชีวโมเลกุลของพริก

9. การบันทึก สรุปผล และจัดทำฐานข้อมูลชีวโมเลกุล

บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบนิวคลีโอไทด์ สรุปผลข้อมูลด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม และนำข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้ไปจัดทำเป็นฐานข้อมูลต่อไป

2. นำตัวอย่างใบพืชพื้นเมืองภาคใต้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีของ Cuberson and Crespo(2002) โดยเตรียมใบพืชประมาณ 20-50 มิลลิกรัม และ stainless steel beads ขนาด 1 มิลลิเมตร จำนวน 10 เม็ด ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร แช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่อง Mixer MM 400 โดยความเร็ว 30 เฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 2 นาทีหรือจนกว่าตัวอย่างจะละเอียด เติม CTAB extraction buffer หลอดละ 400 ไมโครลิตรและ เติม 5% (w/v) PVPP (Polyvinyl polypyrrolidone) 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (Choloroform / isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์หลอดใหม่เจือจางส่วนใส 3 เท่า ด้วย CTAB precipitation buffer ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอน เติมสารละลาย 1.2 M NaCl ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน เติม

RNAase buffer ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และเติม RNAase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 1.2 M NaCl ปริมาตร 370 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (Choloroform / isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร อีกครั้งผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร บ่ม เหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซ็น ตรีฟิวก์หลอดใหม่ เติมน้ำกลั่น 2-โพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 0.6 เท่า ของปริมาตรส่วน ใสในแต่ละหลอด (ถ้ามีส่วนใส 100 ไมโครลิตร จะเติม 2-โพรพานอล 60 ไมโครลิตร) บ่มเหวี่ยงที่ ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือ เพียงตะกอน เติมน้ำกลั่นความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มเหวี่ยงที่ ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งตะกอน ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ และ เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอในสภาพแช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส

3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ดีเอ็นเอ ต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer without MgCl₂ 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 1 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 1 ไมโครลิตร, ไพริเมอร์ (20 uM) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร ที่จำเพาะของยีนแต่ละตำแหน่ง *ITS*, *rbcL* และ *trnH-psbA* (ตารางที่ 1.5.1), *Pfu* DNA polymerase ยี่ห้อ Vivantis (5 unit) 0.1 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร โดยตั้ง โปรแกรมการทำงานของเครื่อง Simpliamp thermal cycle ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 52-57 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) โดยการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ที่เติม SERVA DNA Stain G ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 10 มิลลิลิตร โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสง อัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV-Transilluminator) และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป

ตารางที่ 1.5.1 คู่ไพริเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *ITS*, *rbcL* และ *trnH-psbA*matK

ลำดับ	ตำแหน่งยีน	ชื่อไพริเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
1	<i>ITS</i>	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990
2	<i>rbcL</i>	rbcLa-F	ATGTACCACAAACAGAGACTAAAGC	Lavin, 2003
		rbcLa-R	GTAAATCAAGTCCACCRG	Kress and Erickson, 2007
3	<i>trnH-psbA</i>	trnHf_05	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	Tate and Simpson, 2003
		psbA3f	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang <i>et al.</i> , 1997

4. นำผลผลิตพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep GEL/ PCR Purification Kit ยี่ห้อ Favorgen ดังนี้ นำพีซีอาร์ 50 ไมโครลิตร มาเติม FADF Buffer จำนวน 5 เท่าคือ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดของเหลวใส่ลงใน FADF Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g นาน 30 วินาที ที่มีส่วนใส ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g นาน 30 วินาที ที่มีส่วนใส แล้วปั่นคอลัมน์ให้แห้งอีกรอบนาน 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นชะผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Elution Buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1x TBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย SERVA DNA Stain G บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณยีน *ITS*, *rbcL* และ *trnH-psbA* และ ไปหาตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

5. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบร้อยละความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และระบุความถูกต้องของชนิดพืชในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาความจำเพาะและประสิทธิภาพในความเหมาะสมในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจัดจำแนกชนิดแต่ละชนิด

6. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชผักพื้นเมืองภาคใต้แต่ละชนิดด้วยการทำ DNA alignment ด้วยโปรแกรม MEGA 11 สร้างวงศ์วานวิวัฒนาการของพริกด้วยวิธี maximum likelihood ด้วยโปรแกรม RAxML หรือ MEGA 11 และวิธี Bayesian inference ด้วยโปรแกรม MrBayes version 3.1.2 เพื่อจัดกลุ่มทางอนุกรมวิธานและยืนยันประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดแต่ละบริเวณและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยการทำ haplotype diversity ด้วยโปรแกรม DnaSP ver. 6.12.03

7. ทำการจัดเก็บตัวอย่างอ้างอิงในรูปแบบดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -80°C ไว้ที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี และจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย (Voucher specimen) ตามวิธีการจัดทำพรรณไม้แห้ง และส่งเก็บรวบรวมไว้ที่สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช

8. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปลงทะเบียนดีเอ็นเอบาร์โค้ดในฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อนำหมายเลข accession มาประกอบในการจัดทำฐานข้อมูลชีวโมเลกุลของพริก

9. เก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพริกไว้ในฐานข้อมูล เพื่อการตรวจสอบย้อนกลับและการเชื่อมโยงข้อมูล ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และดีเอ็นเอของพริก

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Results and Discussion)

1. การเก็บรวบรวมเชื้อพันธุ์และดีเอ็นเออ้างอิงของพริก

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อพันธุ์พริกจากภูมิภาคต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 15 จังหวัด ได้แก่ กำแพงเพชร กาญจนบุรี กาสสินธุ์เชียงใหม่ ชลบุรี ชัยภูมิ น่าน ปทุมธานี พิษณุโลก พัทลุง ยะลา ระยอง ราชบุรี สระแก้วและ สกลนคร โดยสามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อพันธุ์พริก และสกัดดีเอ็นเอเพื่อศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและเก็บรักษาไว้เป็นดีเอ็นเออ้างอิงทั้งหมดจำนวน 84 ตัวอย่าง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1.5.2

ตารางที่ 1.5.2 แสดงรายละเอียดข้อมูลตีเอ็นเอของพริก (*Capsicum* spp.) ที่เก็บรักษาไว้ในธนาคารเชื้อพันธุพืชและจุลินทรีย์ กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	รหัสตัวอย่างตีเอ็นเออ้างอิง	ชนิดพืช	แหล่งที่เก็บ	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์พืช
1	CAP1	พิจิตร 05	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
2	CAP2	พิจิตร 25-1-1-1	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
3	CAP3	พิจิตร 27-2-1-1-1	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
4	CAP4	พริก ศก. 13	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
5	CAP5	พริกช่อ 1	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
6	CAP6	พริกดอกเรื่องทรัพย์	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
7	CAP7	พริกยอดสน #2	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
8	CAP8	พริกยอดสน #3	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
9	CAP9	พริกเหลืองน้ำส้ม	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
10	CAP10	พริก #1	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
11	CAP11	พริกกะเหรี่ยง	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
12	CAP12	พริก #7	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
13	CAP13	พริก #8 ขาว	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
14	CAP14	พริก #8 เขียว	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
15	CAP15	พริกบางช้าง 1	จ.ราชบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
16	CAP16	พริกบางช้าง 2	จ.ราชบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
17	CAP17	พริกบางช้าง 3	จ.ราชบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
18	CAP18	พริกบางช้าง 4	จ.ราชบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
19	CAP19	พริกบางช้าง 5	จ.ราชบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
20	CAP20	พริกบางช้าง 6	จ.ราชบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
21	CAP21	พริกจินดา	จ.เชียงใหม่	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
22	CAP22	พริกเต๋อยไก่	จ.เชียงใหม่	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
23	CAP23	พริกหยวกขาว	จ.สกลนคร	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
24	CAP24	พริกหนุ่มเขียวมัน	จ.สกลนคร	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
25	CAP25	พริกหนุ่มขาว	จ.สกลนคร	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
26	CAP26	พริกชี้หูสวน	จ.สกลนคร	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
27	CAP27	พริกเหลือง	จ.สกลนคร	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
28	CAP28	พริกสร้อยไก่	จ.สกลนคร	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
29	CAP29	พริกตุ้ม	จ.ระยอง	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
30	CAP30	พริกตำระยอง	จ.ระยอง	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
31	CAP31	พริกชี้หูหัวเรือ ศก.13	สวส.กทม.	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
32	CAP32	พริกจินดา	สวส. กทม.	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
33	CAP33	พริกชี้หูสวน	จ.ปทุมธานี	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
34	CAP34	พริกชี้หูสวน กจ. 8-6-10-1-2	สวส.กทม.	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
35	CAP35	พริกชี้หูสวน กจ. 1	จ.ชลบุรี	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
36	CAP36	พริกชี้หูสวน	จ.กำแพงเพชร	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
37	CAP37	พริกชี้หูขาว	กทม.	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae

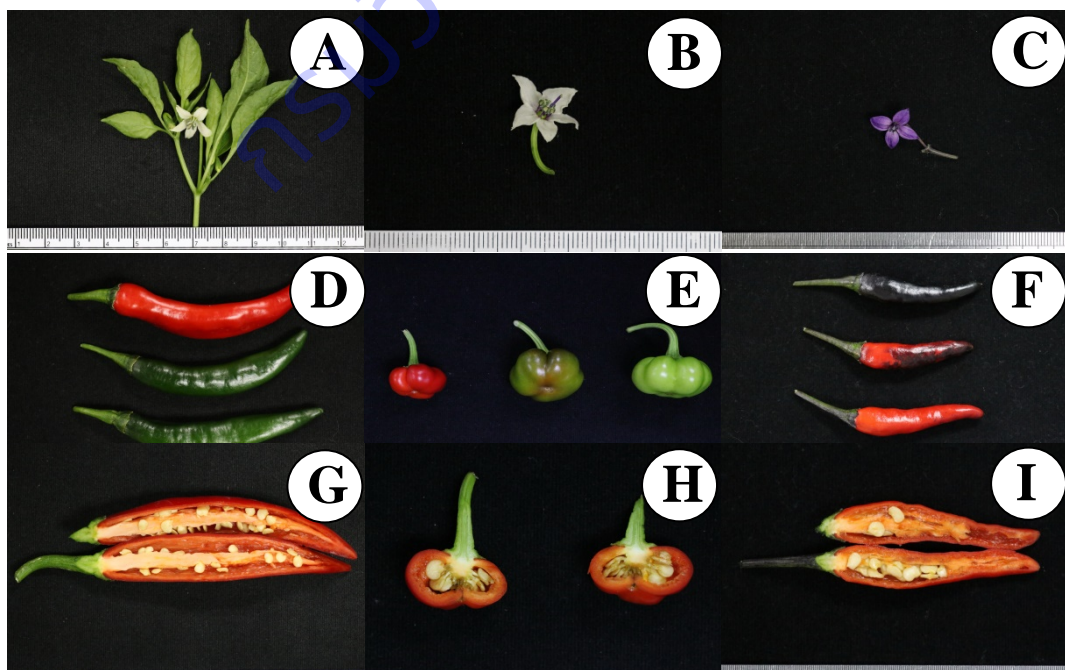
ลำดับ	รหัสตัวอย่าง ดีเอ็นเออ้างอิง	ชนิดพืช	แหล่งที่เก็บ	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์พืช
38	CAP38	พริกไส้เดือน	อ.เวียงสา จ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
39	CAP39	พริกฟักทอง	จ.ปทุมธานี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
40	CAP40	พริกจาราปิโน้	กทม.	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
41	CAP41	พริกหวานยักษ์ #1	กทม.	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
42	CAP42	พริกโกลอง	กทม.	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
43	CAP43	พริกยักษ์พันธุ์เขาวัว	กทม.	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
44	CAP44	พริกเลม่อนตรอป	จ.น่าน	<i>C. baccatum</i>	Solanaceae
45	CAP46	พริกบุตโจโลเกีย	จ.น่าน	<i>C. chinense</i>	Solanaceae
46	CAP47	พริกเกาหลี	จ.ปทุมธานี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
47	CAP48	พริกเส้นยาว	จ.ราชบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
48	CAP49	พริกหวานเซอร์รี่	จ.ราชบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
49	CAP50	พริกเขาวัวยักษ์	จ.ราชบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
50	CAP51	พริกกะเหรี่ยง พัทลุง	จ.พัทลุง	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
51	CAP52	พริกเหลืองพัทลุง	จ.พัทลุง	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
52	CAP53	พริกขี้หนู	จ.น่าน	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
53	CAP55	พริกแคโรไลนา รีฟเปอร์	จ.น่าน	<i>C. chinense</i>	Solanaceae
54	CAP56	พริกบุตโจโลเกีย	จ.น่าน	<i>C. chinense</i>	Solanaceae
55	CAP57	พริกปีศาจ	จ.ราชบุรี	<i>C. chinense</i>	Solanaceae
56	CAP58	พริกหยวก	จ.ราชบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
57	CAP59	พริกหวานยักษ์ #2	กทม.	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
58	CAP60	พริกหนุมยักษ์เขาแพะ	กทม.	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
59	CAP61	พริกยาว	กทม.	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
60	CAP62	พริกจินดา	จ.ชัยภูมิ	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
61	CAP63	พริกจินดา	จ.ชัยภูมิ	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
62	CAP64	พริกจินดา	จ.ชัยภูมิ	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
63	CAP65	พริกจินดา	จ.สระแก้ว	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
64	CAP66	พริกจินดา	จ.กาฬสินธุ์	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
65	CAP67	พริกขี้หนูสวน ยะลา 1	จ.ยะลา	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
66	CAP68	พริกขี้หนูสวน ยะลา 2	จ.ยะลา	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
67	CAP69	พริกขี้หนูสวน ยะลา 3	จ.ยะลา	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
68	CAP70	พริกขี้หนูสวน ยะลา 5	จ.ยะลา	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
69	CAP71	พริกขี้หนูสวน ยะลา 13	จ.ยะลา	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
70	CAP72	พริกกะเหรี่ยง 1	จ.กาญจนบุรี	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
71	CAP73	พริกกะเหรี่ยง 3	จ.กาญจนบุรี	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
72	CAP74	พริกกะเหรี่ยง 4	จ.กาญจนบุรี	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
73	CAP75	พริกขี้หนูขาว	จ.พิษณุโลก	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
74	CAP76	พริกจินดา 2	จ.กาญจนบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
75	CAP77	พริกจินดา 7	จ.กาญจนบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
76	CAP78	พริกจินดา 9	จ.กาญจนบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
77	CAP79	พริกจินดา 10	จ.กาญจนบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง ดีเอ็นเออ้างอิง	ชนิดพืช	แหล่งที่เก็บ	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์พืช
78	CAP80	พริกกะเหรี่ยงยาว	จ.น่าน	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
79	CAP81	พริกชี้ฟ้า	จ.ราชบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
80	CAP82	พริกชี้ฟ้า	กทม.	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
81	CAP83	พริกชี้หนู	จ.ปทุมธานี	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae
82	CAP84	พริกเส้นยาว	จ.ราชบุรี	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
83	CAP85	พริกชี้ฟ้า	ศวพ.น่านจ.น่าน	<i>C. annuum</i>	Solanaceae
84	CAP86	พริกชี้หนู	จ.ปทุมธานี	<i>C. frutescens</i>	Solanaceae

2. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพริก

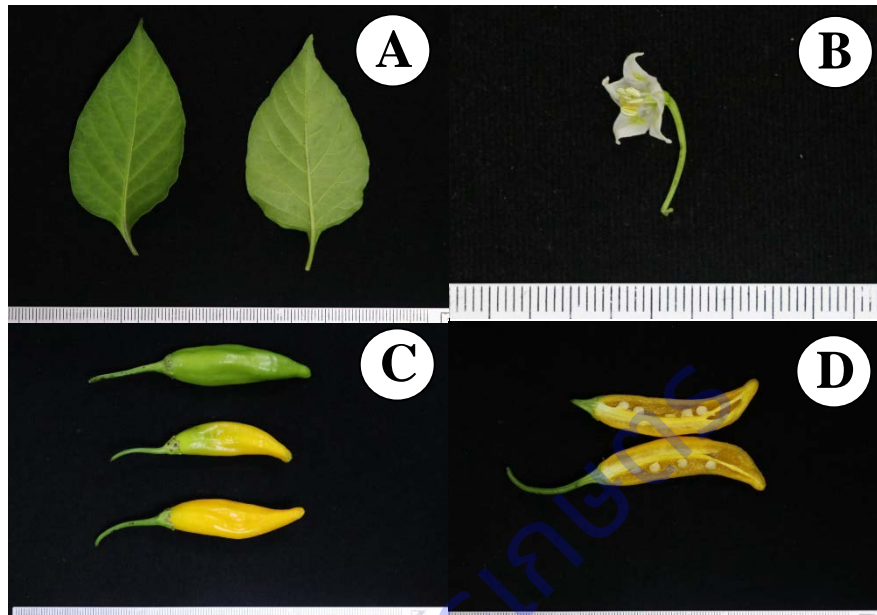
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพริกสายพันธุ์ที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ จำนวน 84 ตัวอย่าง โดยได้ศึกษาลักษณะของต้น ใบ ดอก ผล ตำแหน่งการติดดอกและการติดผล พบว่าสามารถจัดจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพริกในประเทศไทยได้จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *C. annuum* L. *C. baccatum* L. *C. chinense* Jacq. และ *C. frutescens* L. และจากการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า มีลักษณะที่ปรากฏ ดังนี้

1. *Capsicum annuum* มีความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยาสูงมาก โดยมีกลีบดอกสีขาวหรือม่วง กลีบดอกมีจำนวน 5-6 กลีบ ดอกมีจำนวน 1-2 ดอกต่อซอกใบ ยกเว้นพริกช่อสามารถพบได้ถึง 7 ดอกต่อซอกใบอับเกสรตัวผู้สีเขียว เทาอมเขียว หรือ ม่วง ก้านชูดอกมีทั้งแบบตั้งตรง กิ่งห้อยลง หรือห้อยลง ใบสีเขียว รูปไข่ปลายเรียวแหลม ขอบใบเรียบ ลำต้นมีทั้งแบบมีขนและไม่มีขน ผลมีหลายขนาดมีทั้งแบบผลเรียวยาว ผลกลม ไปจนถึงผลขนาดผลใหญ่รูปทรงกระดิ่ง สีผลอ่อนมีทั้ง เขียวอ่อน เขียว เขียวเข้ม หรือม่วงดำ สีผลแก่มีสีเหลือง หรือแดง ลักษณะการติดผลมีทั้งแบบตั้งขึ้นและห้อยลง เมล็ดมีสีขาวครีม (ภาพที่ 1.5.2 ตารางที่ 1.5.3)



ภาพที่ 1.5.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพริก *C. annuum* (A-C) ลักษณะผลพริก (D-F) ลักษณะผลและสีผลระยะต่างๆ (G-I) ผลผ่าตามยาวและเมล็ด

2. *Capsicum baccatum* มีกลีบดอกสีขาวและมีใบสีเขียวที่ใกล้เคียงกับลักษณะของกลีบดอก กลีบดอกมีจำนวน 5 กลีบดอกมีจำนวน 1 ดอกต่อช่อใบ อับเกสรตัวผู้สีขาว ก้านชูดอกตั้งตรง ใบสีเขียว รูปไข่ปลายเรียวแหลม ขอบใบเรียบ ลำต้นไม่มีขน ผลเรียวยาวตรงกลางพองออก รูปกระสวย ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่มีสีเหลือง ลักษณะการติดผลแบบห้อยลง เมล็ดมีสีขาวครีม (ภาพที่ 1.5.3 ตารางที่ 1.5.3)



ภาพที่ 1.5.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพริก *C. baccatum* A) ลักษณะใบ B) ลักษณะดอก C) ลักษณะสีผลระยะต่างๆ และ D) ผลผ่าตามยาวและเมล็ด

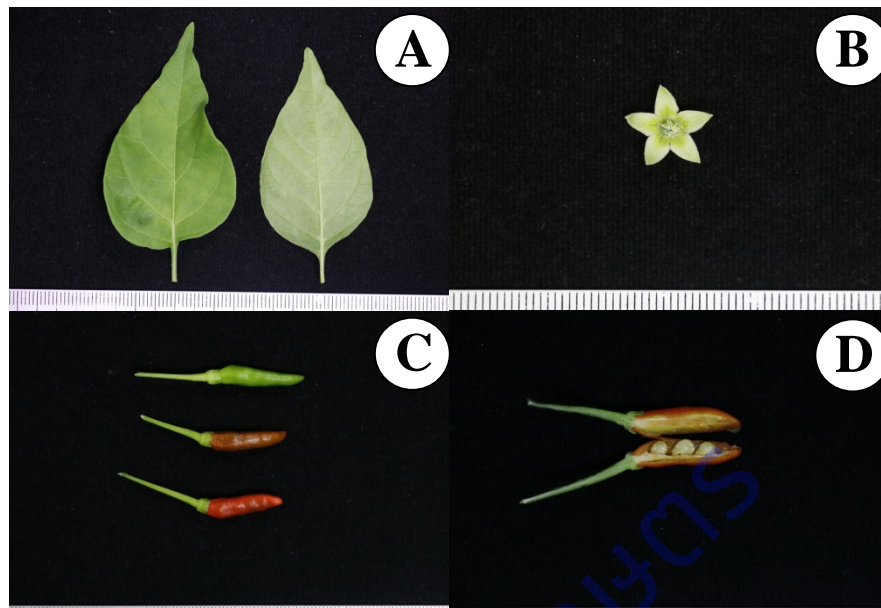
3. *Capsicum chinense* มีกลีบดอกสีขาวครีม กลีบดอกมีจำนวน 5-6 กลีบ ดอกมีจำนวน 3-5 ดอกต่อช่อใบ อับเกสรตัวผู้สีเทาอมม่วง ก้านชูดอกแบบกึ่งห้อยลง ใบสีเขียว รูปไข่ปลายเรียวแหลม ขอบใบเรียบ ลำต้นไม่มีขน ผลมีขนาดปานกลาง รูปร่างไม่แน่นอนส่วนใหญ่มีลักษณะสันด้านหนึ่งพองออกอีกด้านหนึ่งยุบเข้าไม่สมมาตร ผิวผลไม่เรียบ ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่มีสีแดง การติดผลมีลักษณะห้อยลง เมล็ดมีสีขาวครีม (ภาพที่ 1.5.4 ตารางที่ 1.5.3)



ภาพที่ 1.5.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพริก *C. chinense* A) ลักษณะใบ B) ลักษณะดอก C) ลักษณะสีผลระยะต่างๆ และ D) ผลผ่าตามยาวและเมล็ด

4. *Capsicum annuum* มีกลีบดอกสีขาวหรือสีชมพู กลีบดอกมีจำนวน 5 กลีบ ดอกมีจำนวน 3-5 ดอกต่อช่อใบ อับเกสรตัวผู้สีเหลืองหรือสีชมพู ก้านชูดอกแบบตั้งตรง ใบสีเขียว รูปไข่ปลายเรียวแหลม ขอบใบเรียบ ลำต้นไม่มีขน ผลมีขนาดปานกลาง รูปร่างไม่แน่นอนส่วนใหญ่มีลักษณะสันด้านหนึ่งพองออกอีกด้านหนึ่งยุบเข้าไม่สมมาตร ผิวผลไม่เรียบ ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่มีสีแดง การติดผลมีลักษณะห้อยลง เมล็ดมีสีขาวครีม (ภาพที่ 1.5.5 ตารางที่ 1.5.3)

ใบเรียบ ลำต้นไม่มีขน ผลมีหลายขนาดมีทั้งแบบผลขนาดเล็กเรียวยาว หรือขนาดกลางเรียวยาว รูปทรงกระสวย สีผลอ่อนมีทั้ง ขาวเขียว เขียวอ่อน หรือเขียว สีผลแก่มีสีส้มแดง หรือแดง ลักษณะการติดผลมีทั้งแบบตั้งขึ้นและห้อยลง เมล็ดมีสีขาวครีม (ภาพที่ 1.5.5 ตารางที่ 1.5.3)



ภาพที่ 1.5.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพริก *C. frutescens* A) ลักษณะใบ B) ลักษณะดอก C) ลักษณะสีผลระยะต่างๆ และ D) ผลผ่าตามยาวและเมล็ด

ตารางที่ 1.5.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพริกสายพันธุ์ต่างๆ

รหัสตัวอย่าง	ชื่อพันธุ์	ลักษณะสัณฐานวิทยา										
		สีกลีบดอก	การติดดอก	สีีบเกสร	สีปลายเกสรตัวเมีย	จำนวนดอกต่อชอกใบ	ขนตามลำต้น	รูปร่างผล	สีผลอ่อน	สีผลแก่	ทรงต้น	ความสูงต้น (cm)
CAP1	พิจิตร 05	ขาว	ห้อยลง	เหลือง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP2	พิจิตร 25-1-1-1	ขาว	ห้อยลง	เทาอมม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP3	พิจิตร 27-2-1-1-1	ขาว	ห้อยลง	ครีม	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP4	พริก ศก. 13	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาอมม่วง	เหลือง	1-3	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP5	พริกข้อ 1	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาอมม่วง	เหลือง	1-7	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP6	พริกดอกเรืองทรัพย์	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาอมเขียว	เหลือง	1	มีขนเล็กน้อย	เรียวยาว	เขียวอ่อน	แดง	แตกพุ่ม	ผลตั้ง
CAP7	พริกยอดสน #2	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาอมม่วง	เหลือง	1-3	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP8	พริกยอดสน #3	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาอมม่วง	เหลือง	1-3	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP9	พริกเหลืองน้ำส้ม	ขาว	ห้อยลง	เทาอมเขียว	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	เหลือง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP10	พริก #1	ขาว	ห้อยลง	เทาอมเขียว	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP11	พริกกะเหรียง	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาอมเขียว	เหลือง	1	มีขนเล็กน้อย	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP12	พริก #7	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP13	พริก #8 ขาว	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP14	พริก #8 เขียว	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP15	พริกบางช้าง 1	ขาว	ห้อยลง	ครีม	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวเข้ม	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP16	พริกบางช้าง 2	ขาว	ห้อยลง	เทาอมม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวเข้ม	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP17	พริกบางช้าง 3	ขาว	ห้อยลง	เทาอมม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวเข้ม	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP18	พริกบางช้าง 4	ขาว	ห้อยลง	เทาอมม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวเข้ม	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP19	พริกบางช้าง 5	ขาว	ห้อยลง	เทาอมม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวเข้ม	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง

รหัสตัวอย่าง	ชื่อพันธุ์	ลักษณะสัณฐานวิทยา										
		สีกลีบดอก	การติดดอก	สีอับ เกสร	สีปลาย เกสรตัวเมีย	จำนวนดอก ต่อช่อ/ใบ	ขนตาม ลำต้น	รูปร่างผล	สีผลอ่อน	สีผลแก่	ทรงต้น	ความสูงต้น (cm)
CAP20	พริกบางช้าง 6	ขาว	ห้อยลง	เทาอมม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวเข้ม	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP21	พริกจินดา	ขาว	ห้อยลง	เหลือง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวเข้ม	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP22	พริกเตี้ยไก่	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เหลือง	เหลือง	1	มีขน เล็กน้อย	ป้อม	เขียวอ่อน อมเหลือง	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP23	พริกหยวกขาว	ขาว	ห้อยลง	เทา	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวอ่อน อมเหลือง	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP24	พริกหนุ่มเขียวมัน	ขาว	กึ่งตั้ง	เทา	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP25	พริกหนุ่มขาว	ขาว	ห้อยลง	เทาอม เหลือง	เหลือง	1	มีขนปาน กลาง	เรียวยาว	เขียวอ่อน	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP26	พริกขี้หนูสวน	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ครีม	เหลือง	2	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP27	พริกเหลือง	ขาว	กึ่งห้อยลง	เทาครีม	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	เหลือง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP28	พริกสร้อยไก่	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทา	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP29	พริกตุ้ม	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาอมเขียว	เหลือง	1-2	ไม่มีขน	กลม	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP30	พริกคำระยอง	ม่วง	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาอมเขียว	ม่วง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	ม่วงดำ	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP31	พริกขี้หนูหัวเรือ ศก.13	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วงเทา	เหลือง	1-2	มีขน เล็กน้อย	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP32	พริกจินดา	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาอมม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP33	พริกขี้หนูสวน	ขาวอม เหลือง	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เหลือง	เหลือง	1-2	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP34	พริกขี้หนูสวน กจ. 8-6-10-1-2	เหลืองอม เขียว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เหลือง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP35	พริกขี้หนูสวน กจ. 1	ครีม	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เขียว	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP36	พริกขี้หนูสวน	เหลืองอม เขียว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เขียวเหลือง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง

รหัสตัวอย่าง	ชื่อพันธุ์	ลักษณะสัณฐานวิทยา										
		สีกลีบดอก	การติดดอก	สีอับ เกสร	สีปลาย เกสรตัวเมีย	จำนวนดอก ต่อช่อ/ใบ	ขนตาม ลำต้น	รูปร่างผล	สีผลอ่อน	สีผลแก่	ทรงต้น	ความสูงต้น (cm)
CAP37	พริกชี้หนูขาว	เขียวครีม	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาเขียว	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	ขาวครีม	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP38	พริกไส้เดือน	ขาว	กึ่งห้อยลง	เขียวเหลือง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP39	พริกฟักทอง	ขาว	กึ่งห้อยลง	ม่วงเทา	เหลือง	1-2	มีขน เล็กน้อย	กลม	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP40	พริกจาราปิโน้	ขาว	กึ่งห้อยลง	เขียว	เหลือง	1-2	ไม่มีขน	ทรงกรวย	เขียวเข้ม	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP41	พริกหวานยักษ์ #1	ขาว	กึ่งห้อยลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	ทรง กระดิ่ง	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP42	พริกโกลอง	ขาว	ห้อยลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP43	พริกยักษ์พันธุ์เขาวัว	ขาว	กึ่งห้อยลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	ทรงกรวย	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP44	พริกเลมอนดรอปรูป	ขาวมีแปะ เขียวที่ฐาน	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เหลือง	เหลือง	1	ไม่มีขน	ทรงกรวย	เขียวอ่อน	เหลือง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP46	พริกบุตใจโลเกีย	ครีม	กึ่งห้อยลง	เทาม่วง	เหลือง	3-4	ไม่มีขน	รูปทรงไม่ แน่นอน	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP47	พริกเกาหลี่	ขาว	ห้อยลง	เทาม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP48	พริกเส้นยาว	ขาว	ห้อยลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP49	พริกหวานเซอร์รี่	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	กลม	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP50	พริกเขาวัวยักษ์	ขาว	กึ่งห้อยลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP51	พริกกะเหรียง	ครีมเหลือง	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เหลือง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวอ่อน	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP52	พริกเหลืองพัทลุง	ครีมเหลือง	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	ขาวครีม	แดงส้ม	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP53	พริกชี้หนู	เขียวครีม	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เหลือง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลตั้ง
CAP55	พริกแคโรไลนา ริฟเปอร์	ครีมเหลือง	กึ่งห้อยลง	ม่วง	เหลือง	3-5	ไม่มีขน	รูปทรงไม่ แน่นอน	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP56	พริกบุตใจโลเกีย	ครีม	กึ่งห้อยลง	เทาม่วง	เหลือง	3-5	ไม่มีขน	รูปทรงไม่ แน่นอน	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง

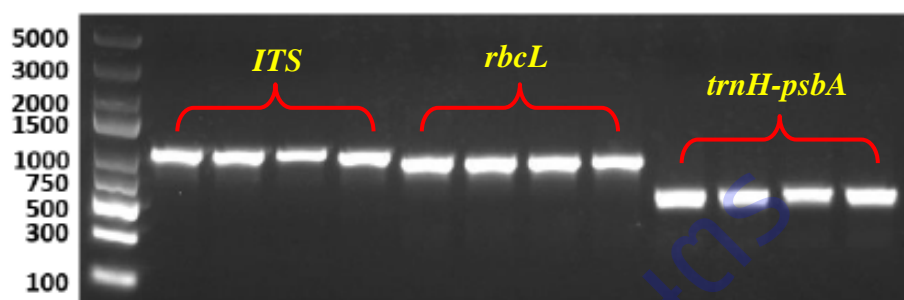
รหัสตัวอย่าง	ชื่อพันธุ์	ลักษณะสัณฐานวิทยา										
		สีกลีบดอก	การติดดอก	สีอับ เกสร	สีปลาย เกสรตัวเมีย	จำนวนดอก ต่อช่อ/ใบ	ขนตาม ลำต้น	รูปร่างผล	สีผลอ่อน	สีผลแก่	ทรงต้น	ความสูงต้น (cm)
CAP57	พริกปีศาจ	ครีม	กิ่งห้อยลง	เทาม่วง	เหลือง	3-5	ไม่มีขน	รูปทรงไม่ แน่นอน	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP58	พริกหยวก	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทา	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวอ่อน	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP59	พริกหวานยักษ์ #2	ขาว	กิ่งห้อยลง	เขียวเหลือง	เหลือง	1-3	ไม่มีขน	ทรง กระดิ่ง	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลห้อยลง
CAP60	พริกหนุ่มยักษ์เขาแพะ	ขาว	กิ่งห้อยลง	เทา	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวอ่อน	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP61	พริกยาว	ขาว	ห้อยลง	เทา	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP62	พริกจินดา	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP63	พริกจินดา	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP64	พริกจินดา	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP65	พริกจินดา	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP66	พริกจินดา	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP67	พริกชี้หูสวน ยะลา 1	เหลืองอม เขียว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาม่วง	เหลือง	1-2	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลตั้ง
CAP68	พริกชี้หูสวน ยะลา 2	เหลืองอม เขียว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาม่วง	เหลือง	1-2	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลตั้ง
CAP69	พริกชี้หูสวน ยะลา 3	เหลืองอม เขียว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาม่วง	เหลือง	1-2	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลตั้ง
CAP70	พริกชี้หูสวน ยะลา 5	เหลืองอม เขียว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาม่วง	เหลือง	1-2	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลตั้ง
CAP71	พริกชี้หูสวน ยะลา 13	เหลืองอม เขียว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาม่วง	เหลือง	1-2	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม	ผลตั้ง
CAP72	พริกกะเหรี่ยง 1	ครีม	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ครีม	เหลือง	1-2	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวอ่อน	แดงส้ม	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP73	พริกกะเหรี่ยง 3	เขียวครีม	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาเขียว	เหลือง	1-2	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวอ่อน	แดงส้ม	ตั้งตรง	ผลตั้ง

รหัสตัวอย่าง	ชื่อพันธุ์	ลักษณะสัณฐานวิทยา										
		สีกลีบดอก	การติดดอก	สีอับ เกสร	สีปลาย เกสรตัวเมีย	จำนวนดอก ต่อช่อ/ใบ	ขนตาม ลำต้น	รูปร่างผล	สีผลอ่อน	สีผลแก่	ทรงต้น	ความสูงต้น (cm)
CAP74	พริกกะเหรียง 4	เขียวครีม	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วงแดง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวอ่อน	แดงส้ม	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP75	พริกขี้หนูขาว	เหลืองอม เขียว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เหลือง	เหลือง	1-2	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียวครีม	แดงส้ม	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP76	พริกจินดา 2	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	ม่วง	เหลือง	1	มีขน เล็กน้อย	เรียวยาว	เขียวเข้ม	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP77	พริกจินดา 7	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาม่วง	เหลือง	1	มีขน เล็กน้อย	เรียวยาว	เขียวเข้ม	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP78	พริกจินดา 9	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาม่วง	เหลือง	1	มีขน เล็กน้อย	เรียวยาว	เขียวเข้ม	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP79	พริกจินดา 10	ขาว	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาม่วง	เหลือง	1	มีขน เล็กน้อย	เรียวยาว	เขียวเข้ม	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP80	พริกกะเหรียงยาว	ครีม	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทา	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP81	พริกขี้ฟ้า	ขาว	กิ่งห้อยลง	ม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP82	พริกขี้ฟ้า	ขาว	ห้อยลง	ม่วง	เหลือง	1	มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP83	พริกขี้หนู	เขียวอม เหลือง	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เขียวเทา	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม แนบราบ	ผลตั้ง
CAP84	พริกเส้นยาว	ขาว	กิ่งห้อยลง	ม่วง	เหลือง	1	มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลห้อยลง
CAP85	พริกกระเหรียง	เหลืองครีม	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาม่วง	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	ตั้งตรง	ผลตั้ง
CAP86	พริกขี้หนู	เขียวเหลือง	ก้านตั้งปลายคว่ำลง	เทาเขียว	เหลือง	1	ไม่มีขน	เรียวยาว	เขียว	แดง	แตกพุ่ม แนบราบ	ผลตั้ง

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยวิธี PCR

เมื่อทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด *ITS*, *rbcL* และ *trnH-psbA* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 1.5.1 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในพืชทั้ง 84 ตัวอย่าง ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้มีขนาดแตกต่างกัน (ภาพที่ 1.5.6) ดังนี้

1. ตำแหน่งยีน *ITS* ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ขนาดประมาณ 800-1000 คู่เบส
2. ตำแหน่งยีน *rbcL* ด้วยคู่ไพรเมอร์ rbcLa-F กับ rbcLa-R ขนาดประมาณ 800-900 คู่เบส
3. ตำแหน่งยีน *trnH-psbA* ด้วยคู่ไพรเมอร์ trnHf_05 กับ psbA_3f ขนาดประมาณ 600-700 คู่เบส

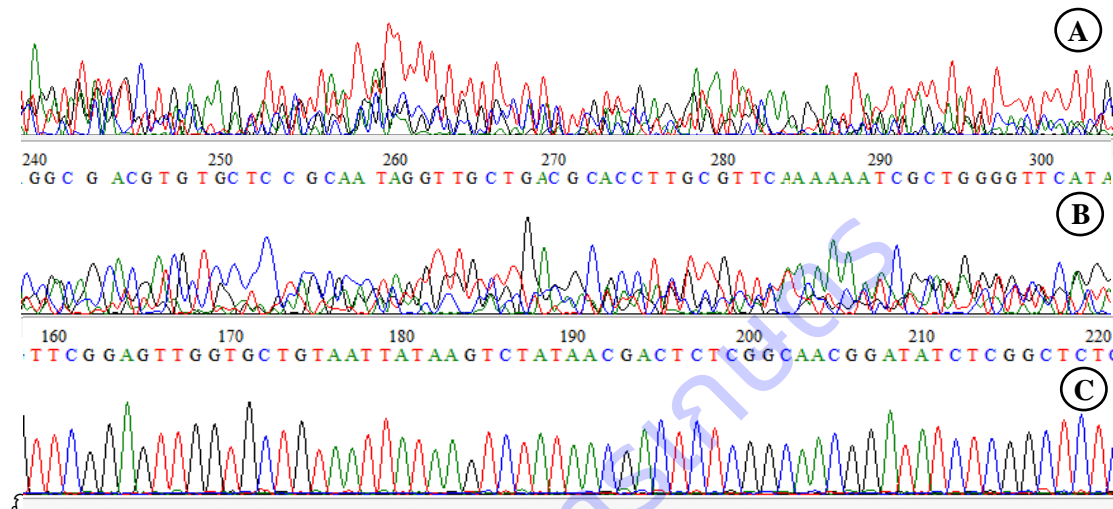


ภาพที่ 1.5.6 แสดงตัวอย่างขนาดดีเอ็นเอของพริกที่เพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR จากดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่งต่างๆ ตำแหน่ง *ITS* (มีขนาดระหว่าง 800-1000 bp) *rbcL* ตำแหน่ง (มีขนาดระหว่าง 800-900 bp) และตำแหน่ง *trnH-psbA* (มีขนาดระหว่าง 600-700 bp)

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *ITS* *rbcL* และ *trnH-psbA* พบว่า สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จำนวน 228 เส้น ได้แก่ *ITS* จำนวน 60 เส้น *rbcL* จำนวน 84 เส้น และ *trnH-psbA* จำนวน 84 เส้น ดังแสดงในตารางที่ 1.5.4 และเมื่อเปรียบเทียบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ยีนตำแหน่ง *rbcL* และ *trnH-psbA* มีโอกาสความสำเร็จมากที่สุดคิดเป็น 100% ส่วนตำแหน่ง *ITS* มีโอกาสความสำเร็จคิดเป็น 71% (ตารางที่ 1.5.5) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มการเป็นตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ดีของตำแหน่ง *rbcL* และ *trnH-psbA* โดยตำแหน่ง *ITS* มีโอกาสประสบความสำเร็จน้อยกว่าตำแหน่งอื่นๆ อาจจะเป็นผลมาจากการปนเปื้อนของจีโนมดีเอ็นเอความไม่จำเพาะของคู่ไพรเมอร์กับชนิดพืชหรือไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้อันเนื่องมาจากการเป็นยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ (universal primer) โดยเฉพาะตำแหน่ง *ITS* เป็นตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ใช้ระบุชนิดได้ทั้งพืชและรา โดยบางไพรเมอร์มีการออกแบบไพรเมอร์ใช้กับราและก็สามารถใช้ได้กับพืชด้วย (white et al. 1990) บางครั้งเราสามารถอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชแบบ symbiotic (Rodriguez et al., 2009) ทำให้มีโอกาสง่ายที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของราจะปนเปื้อนได้ทำให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชในขั้นตอน PCR มีดีเอ็นเอของราปนมาด้วย (Cheng et al., 2015) จึงทำให้ไม่สามารถอ่านผลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้และอีกประการหนึ่งอาจจะมาจากความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ของตำแหน่ง *ITS* ที่นำมาใช้ทำให้มีตำแหน่งจับมากกว่าหนึ่งตำแหน่งหรือการเกิดจากการที่มีช่วงจับของไพรเมอร์ได้หลายช่วงที่แต่ละช่วงมีขนาดไม่เท่ากันและขนาดต่างกันไม่มากนักจึงทำให้สามารถเพิ่มจำนวนหรือไม่สามารถมองเห็นขนาดของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเล็กน้อยได้ ซึ่งทำให้ไม่สามารถอ่านผลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้หรือแม้แต่ว่าอ่านได้ก็ไม่มีความน่าเชื่อถือเนื่องจากรหัสสัญญาณการอ่านผลไม่ชัดเจนและมีสัญญาณอื่นรบกวน

แสดงดังภาพที่ 1.5.7 นอกจากนี้มีรายงานว่าตำแหน่ง *ITS* มีอัตราความสำเร็จในการทำ PCR ค่อนข้างต่ำในพืชหลายกลุ่มโดยพบน้อยกว่า 50% ในกลุ่มสาหร่าย (Saunders and Kucera 2010) และเฟิร์น (Chen et al. 2010) ประมาณ 57.6% ในพืชกลุ่ม gymnosperms และประมาณ 88.0% ในพืชกลุ่ม angiosperms (Li et al. 2011) ดังนั้นจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าควรมีการออกแบบไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง *ITS* ให้เป็นดีเอ็นบาร์ที่จำเพาะกับพืช (plant-specific primers) รวมถึงพืชในกลุ่มพริกมากยิ่งขึ้นเพื่อให้ง่ายต่อการใช้ประโยชน์และการศึกษาต่อยอดต่อไป



วคลิโอไทด์ไม่ได้ B) อ่านผลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้แต่สัญญาณไม่ชัดเจน และ C) อ่านผลลำดับนิวคลีโอไทด์สัญญาณลำดับนิวคลีโอไทด์ชัดเจน

ตารางที่ 1.5.4 แสดงตำแหน่งดีเอ็นบาร์โค้ดและตัวอย่างชนิดพืชที่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

ลำดับ	รหัสตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิง	ชนิดพืช	บริเวณตำแหน่งดีเอ็นบาร์โค้ด		
			<i>ITS</i>	<i>rbcL</i>	<i>trnH-psbA</i>
1	CAP1	พิจิตร 05	✓	✓	✓
2	CAP2	พิจิตร 25-1-1-1	✓	✓	✓
3	CAP3	พิจิตร 27-2-1-1-1	✓	✓	✓
4	CAP4	พริก ศก. 13	✗	✓	✓
5	CAP5	พริกช่อ 1	✗	✓	✓
6	CAP6	พริกคอเรืองทรัพย์	✓	✓	✓
7	CAP7	พริกยอดสน #2	✓	✓	✓
8	CAP8	พริกยอดสน #3	✓	✓	✓
9	CAP9	พริกเหลืองน้ำส้ม	✓	✓	✓

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง ดีเอ็นเออ้างอิง	ชนิดพืช	บริเวณตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ด		
			<i>ITS</i>	<i>rbcL</i>	<i>trnH-psbA</i>
10	CAP10	พริก #1	✓	✓	✓
11	CAP11	พริกกะเหรียง	✓	✓	✓
12	CAP12	พริก #7	✓	✓	✓
13	CAP13	พริก #8 ขาว	✓	✓	✓
14	CAP14	พริก #8 เขียว	✓	✓	✓
15	CAP15	พริกบางช้าง 1	✓	✓	✓
16	CAP16	พริกบางช้าง 2	✓	✓	✓
17	CAP17	พริกบางช้าง 3	✓	✓	✓
18	CAP18	พริกบางช้าง 4	✓	✓	✓
19	CAP19	พริกบางช้าง 5	✓	✓	✓
20	CAP20	พริกบางช้าง 6	✓	✓	✓
21	CAP21	พริกจินดา	x	✓	✓
22	CAP22	พริกเดือยไก่	✓	✓	✓
23	CAP23	พริกหยวกขาว	✓	✓	✓
24	CAP24	พริกหนุ่มเขี้ยวมัน	✓	✓	✓
25	CAP25	พริกหนุ่มขาว	✓	✓	✓
26	CAP26	พริกขี้หนูสวน	✓	✓	✓
27	CAP27	พริกเหลือง	✓	✓	✓
28	CAP28	พริกสร้อยไก่	✓	✓	✓
29	CAP29	พริกตุ้ม	✓	✓	✓
30	CAP30	พริกตำระยอง	✓	✓	✓
31	CAP31	พริกขี้หนูหัวเรือ ศก.13	x	✓	✓
32	CAP32	พริกจินดา	✓	✓	✓
33	CAP33	พริกขี้หนูสวน	✓	✓	✓
34	CAP34	พริกขี้หนูสวน กจ. 8-6-10-1-2	✓	✓	✓
35	CAP35	พริกขี้หนูสวน กจ. 1	✓	✓	✓
36	CAP36	พริกขี้หนูสวน	✓	✓	✓
37	CAP37	พริกขี้หนูขาว	✓	✓	✓
38	CAP38	พริกไส้เดือน	✓	✓	✓
39	CAP39	พริกฟักทอง	x	✓	✓
40	CAP40	พริกจระบีโน้	x	✓	✓
41	CAP41	พริกหวานยักษ์ #1	x	✓	✓
42	CAP42	พริกโกลอง	✓	✓	✓
43	CAP43	พริกยักษ์พันธุ์เขาวัว	x	✓	✓
44	CAP44	พริกเลมอนตรอป	✓	✓	✓
45	CAP46	พริกบุตโจโลเกีย	✓	✓	✓
46	CAP47	พริกเกาหลี	x	✓	✓
47	CAP48	พริกเส้นยาว	x	✓	✓
48	CAP49	พริกหวานเซอร์รี่	x	✓	✓
49	CAP50	พริกเขาวัวยักษ์	✓	✓	✓

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง ดีเอ็นเออ้างอิง	ชนิดพืช	บริเวณตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ด		
			<i>ITS</i>	<i>rbcL</i>	<i>trnH-psbA</i>
50	CAP51	พริกกะเหรียง พัทลุง	✓	✓	✓
51	CAP52	พริกเหลืองพัทลุง	✓	✓	✓
52	CAP53	พริกขี้หนู	✓	✓	✓
53	CAP55	พริกแคโรไลนา รีพเปอร์	✓	✓	✓
54	CAP56	พริกบุตโจโลเกีย	✓	✓	✓
55	CAP57	พริกปีศาจ	✓	✓	✓
56	CAP58	พริกหยวก	✗	✓	✓
57	CAP59	พริกหวานยักษ์ #2	✗	✓	✓
58	CAP60	พริกหนุ่มยักษ์เขาแพะ	✗	✓	✓
59	CAP61	พริกยาว	✗	✓	✓
60	CAP62	พริกจินดา	✓	✓	✓
61	CAP63	พริกจินดา	✗	✓	✓
62	CAP64	พริกจินดา	✗	✓	✓
63	CAP65	พริกจินดา	✓	✓	✓
64	CAP66	พริกจินดา	✓	✓	✓
65	CAP67	พริกขี้หนูสวน ยะลา 1	✓	✓	✓
66	CAP68	พริกขี้หนูสวน ยะลา 2	✓	✓	✓
67	CAP69	พริกขี้หนูสวน ยะลา 3	✓	✓	✓
68	CAP70	พริกขี้หนูสวน ยะลา 5	✓	✓	✓
69	CAP71	พริกขี้หนูสวน ยะลา 13	✓	✓	✓
70	CAP72	พริกกะเหรียง 1	✓	✓	✓
71	CAP73	พริกกะเหรียง 3	✓	✓	✓
72	CAP74	พริกกะเหรียง 4	✓	✓	✓
73	CAP75	พริกขี้หนูขาว	✓	✓	✓
74	CAP76	พริกจินดา 2	✗	✓	✓
75	CAP77	พริกจินดา 7	✗	✓	✓
76	CAP78	พริกจินดา 9	✗	✓	✓
77	CAP79	พริกจินดา 10	✓	✓	✓
78	CAP80	พริกกะเหรียงยาว	✓	✓	✓
79	CAP81	พริกขี้ฟ้า	✗	✓	✓
80	CAP82	พริกขี้ฟ้า	✗	✓	✓
81	CAP83	พริกขี้หนู	✓	✓	✓
82	CAP84	พริกเส้นยาว	✗	✓	✓
83	CAP85	พริกขี้ฟ้า	✓	✓	✓
84	CAP86	พริกขี้หนู	✓	✓	✓
จำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้			60	84	84

ตารางที่ 1.5.5 แสดงร้อยละความสำเร็จของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดแต่ละตำแหน่ง

ตำแหน่ง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์	ความสำเร็จในการวิเคราะห์
---------	---------------	------------------------	--------------------------

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด		(เส้น)	(%)
<i>ITS</i>	84	60	71
<i>rbcl</i>	84	84	100
<i>trnH-psbA</i>	84	84	100
รวม	ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 228 เส้น		

4. การวิเคราะห์ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดและเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank ของพริก

จากการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง *ITS* *rbcl* และ *trnH-psbA* ของพริกจำนวน 84 ตัวอย่าง โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดในแต่ละตัวอย่างและค่าความคล้ายคลึงกันในการระบุชนิดพืช มีดังนี้

ตารางที่ 1.5.6 ตารางเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนแต่ละตำแหน่งของพริกกับฐานข้อมูล GenBank

รหัสตัวอย่าง	เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank					
	<i>ITS</i>		<i>rbcl</i>		<i>trnH-psbA</i>	
	ชนิดพืช	ความเหมือน	ชนิดพืช	ความเหมือน	ชนิดพืช	ความเหมือน
CAP1	<i>C. annuum</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP2	<i>C. annuum</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP3	<i>C. annuum</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP4	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP5	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP6	<i>C. annuum</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP7	<i>C. annuum</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP8	<i>C. annuum</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%

รหัส ตัวอย่าง	เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank					
	ITS		rbcL		trnH-psbA	
	ชนิดพืช	ความ เหมือน	ชนิดพืช	ความ เหมือน	ชนิดพืช	ความ เหมือน
CAP9	<i>C. annuum</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP10	<i>C. annuum</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP11	<i>C. annuum</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP12	<i>C. annuum</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP13	<i>C. annuum</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP14	<i>C. annuum</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP15	<i>C. annuum</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP16	<i>C. annuum</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP17	<i>C. annuum</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP18	<i>C. annuum</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP19	<i>C. annuum</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP20	<i>C. annuum</i>	96%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP21	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%

รหัส ตัวอย่าง	เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank					
	ITS		rbcL		trnH-psbA	
	ชนิดพืช	ความ เหมือน	ชนิดพืช	ความ เหมือน	ชนิดพืช	ความ เหมือน
CAP22	<i>C. annuum</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP23	<i>C. annuum</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP24	<i>C. annuum</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP25	<i>C. annuum</i>	96%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP26	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP27	<i>C. annuum</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP28	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP29	<i>C. annuum</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP30	<i>C. annuum</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP31	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP32	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	92%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP33	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP34	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%

รหัส ตัวอย่าง	เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank					
	ITS		rbcL		trnH-psbA	
	ชนิดพืช	ความ เหมือน	ชนิดพืช	ความ เหมือน	ชนิดพืช	ความ เหมือน
CAP35	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP36	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP37	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP38	<i>C. chinense</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP39	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP40	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP41	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP42	<i>C. chinense</i>	92%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP43	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP44	<i>C. baccatum</i>	92%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. baccatum</i>	100%
CAP46	<i>C. chinense</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP47	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP48	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%

รหัส ตัวอย่าง	เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank					
	ITS		rbcL		trnH-psbA	
	ชนิดพืช	ความ เหมือน	ชนิดพืช	ความ เหมือน	ชนิดพืช	ความ เหมือน
CAP49	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP50	<i>C. chinense</i>	90%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP51	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP52	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP53	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP55	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	96%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP56	<i>Capsicum</i> sp. 'Bhut Jolokia'	96%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP57	<i>Capsicum</i> sp. 'Bhut Jolokia'	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP58	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP59	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP60	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP61	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP62	<i>C. annuum</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%

รหัส ตัวอย่าง	เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank					
	ITS		rbcL		trnH-psbA	
	ชนิดพืช	ความ เหมือน	ชนิดพืช	ความ เหมือน	ชนิดพืช	ความ เหมือน
CAP63	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP64	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP65	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP66	<i>C. annuum</i>	92%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP67	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP68	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP69	<i>C. chinense</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP70	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP71	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP72	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP73	<i>C. frutescens</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP74	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	99%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP75	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%

รหัสตัวอย่าง	เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank					
	ITS		rbcL		trnH-psbA	
	ชนิดพืช	ความเหมือน	ชนิดพืช	ความเหมือน	ชนิดพืช	ความเหมือน
CAP76	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP77	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP78	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP79	<i>C. chinense</i>	90%	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP80	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP81	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP82	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP83	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP84	-	-	<i>C. annuum</i> <i>C. baccatum</i> <i>C. pubescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP85	<i>C. chinense</i>	98%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%
CAP86	<i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	97%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> <i>C. frutescens</i>	100%

จากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดของพริกแต่ละชนิดพบว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ยืนตำแหน่ง ITS rbcL และ trnH-psbA สามารถระบุในระดับสกุลของพริกได้ถูกต้อง คือ สกุล *Capsicum* โดยตำแหน่ง ITS สามารถระบุชนิดของพริกได้ 2 ชนิด คือ *C. baccatum* มีความเหมือนอยู่ที่ 92%

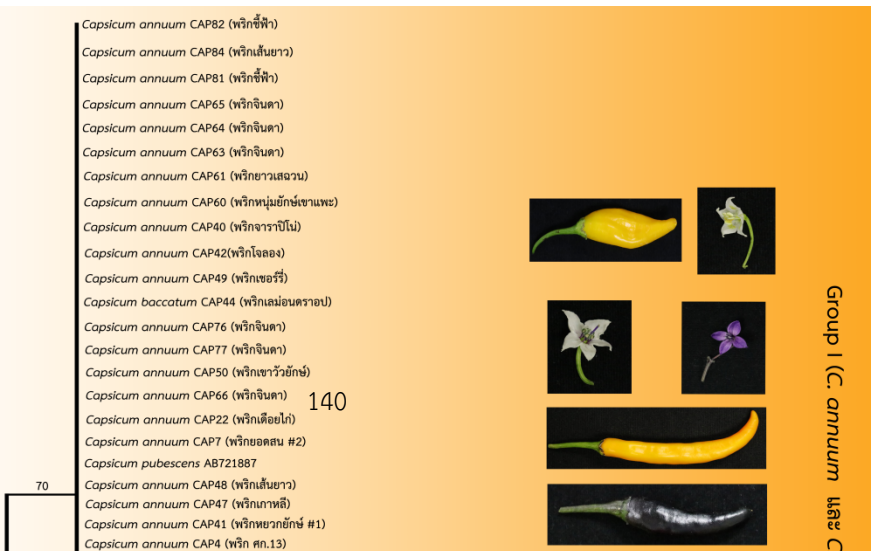
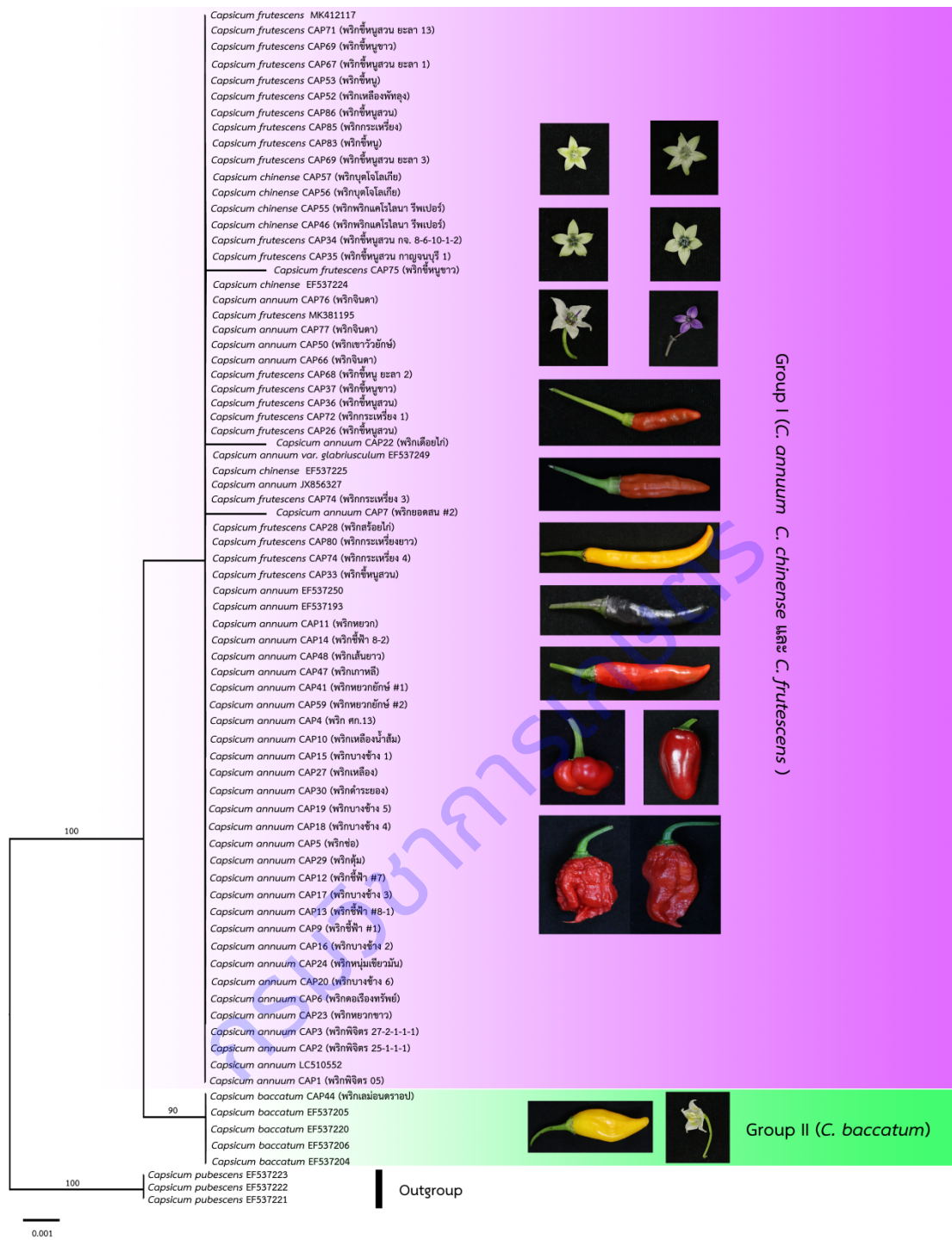
และ *C. annum* มีความเหมือนอยู่ที่ 92-99% ในขณะที่ไม่สามารถแยก *C. chinense* และ *C. frutescens* ออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยให้ค่าความเหมือนอยู่ที่ 90-99% ส่วนยีนตำแหน่ง *rbcl* พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มให้ค่าความเหมือน 100% ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบกับยีนเหมือนกับพริกชนิด *C. annum* *C. baccatum* และ *C. pubescens* และกลุ่มที่ 2 เหมือนกับพริกชนิด *C. annum* *C. chinense* และ *C. frutescens* และที่ยีนทำ *trnH-psbA* พบว่าสามารถระบุพริก *C. baccatum* (CAP44) ได้ และให้ค่าความเหมือน 100% ในขณะที่พริกชนิดอื่นนั้นไม่สามารถใช้ยีนตำแหน่งนี้แยกความแตกต่างกันได้ โดยทั้งหมดมีความเหมือนกับพริก *C. annum* *C. chinense* และ *C. frutescens* ค่าความเหมือนอยู่ที่ 100%

ซึ่งผลจากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพริกแต่ละตำแหน่ง จะเห็นได้ว่าตำแหน่งยีนในคลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA; cpDNA) ได้แก่ *rbcl* และ *trnH-psbA* มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดของพริกได้น้อยกว่ายีนในนิวเคลียส (nuclear DNA; nuDNA) ได้แก่ *ITS* ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการที่ยีนใน cpDNA ไม่มีการแลกเปลี่ยนยีนทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีการอนุรักษ์ไว้สูงและเกิดการแปรผันของยีนต่ำเมื่อเทียบกับ nuDNA (Rosario et al., 2019) ประกอบกับไพรเมอร์ของยีนแต่ละยีนที่นำมาใช้เป็นยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ (universal primer) ที่ออกแบบมาสำหรับใช้กับพืชได้หลายชนิด ไม่ได้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง (species-specific primer) ดังนั้นโอกาสที่จะไม่สามารถแยกความแตกต่างระดับชนิดได้จึงมีค่อนข้างสูง ดังนั้นผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นความจำเป็นในการเลือกใช้ตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดและคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมมีความจำเพาะกับชนิดพืชนั้นๆ จึงจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมกับยีนตำแหน่งอื่นๆ และออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับชนิดพริกเพื่อจะสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการระบุชนิดพริกให้ถูกต้องต่อไป

5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริก

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี maximum likelihood ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดแต่ละตำแหน่งประกอบด้วยตำแหน่ง ITS จำนวน 49 เส้น *rbcl* จำนวน 84 เส้น และ *trnH-psbA* จำนวน 84 เส้น พบว่าที่ตำแหน่ง *trnH-psbA* สามารถแบ่งชนิดของพริกออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่ม I ประกอบด้วย *C. annum* *C. chinense* และ *C. frutescens* และกลุ่มที่ II เป็นกลุ่มของ *C. baccatum* สอดคล้องไปกับลักษณะสัณฐานวิทยาของพริก *C. baccatum* และลำดับดีเอ็นเอที่นำมาประมวลผลวิเคราะห์จากฐานข้อมูล GenBank ในขณะที่กลุ่ม I เป็นกลุ่มที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่หลากหลายโดยผลของ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถใช้ตำแหน่ง *trnH-psbA* ในการจำแนกความแตกต่างและระบุชนิดของพริก *C. annum* *C. chinense* และ *C. frutescens* ได้ ยกเว้นพริก *C. baccatum* (กลุ่ม II) (ภาพที่ 1.5.8)

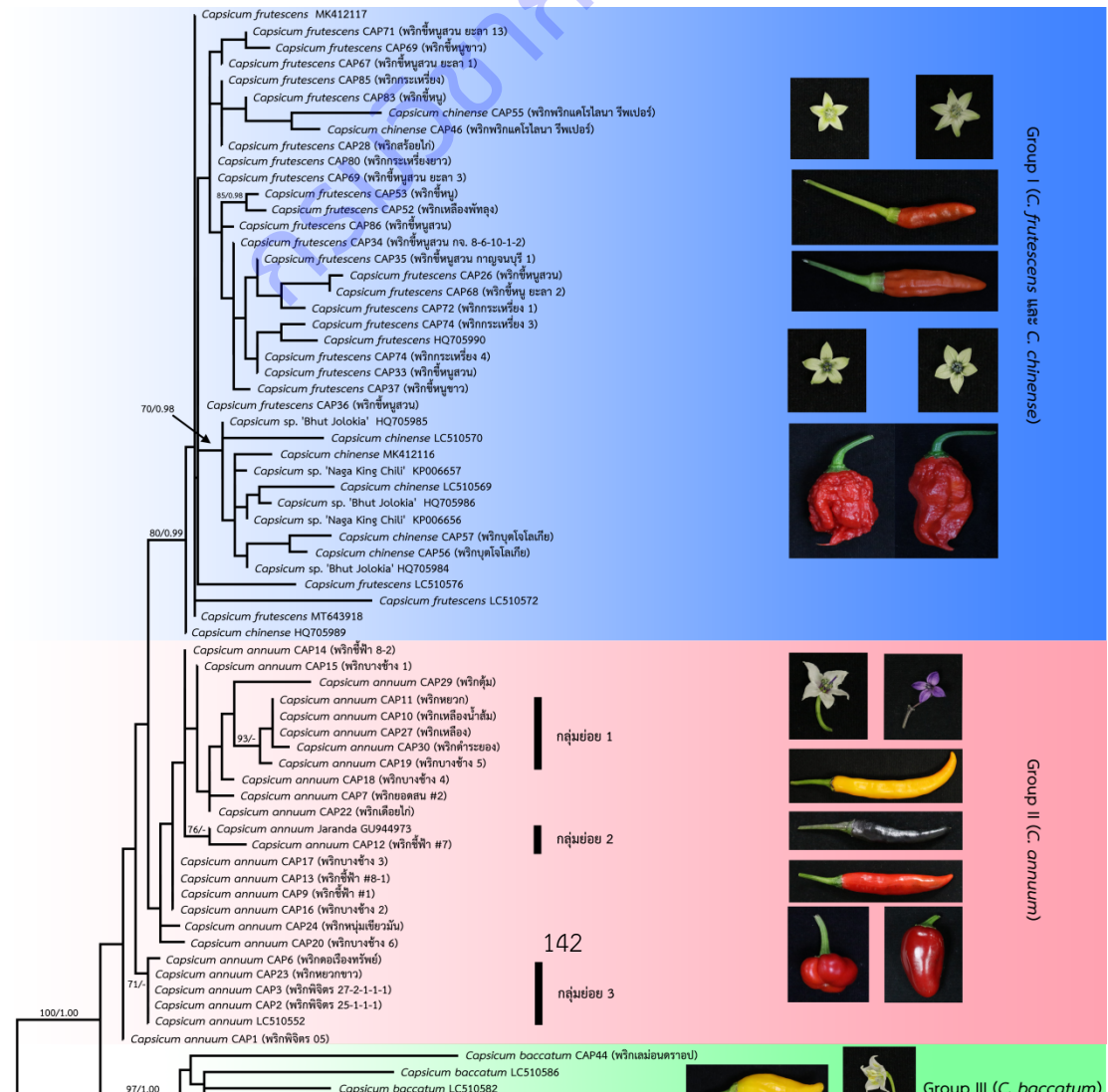
ยีนตำแหน่ง *rbcl* นั้นพบว่าสามารถแบ่งแยกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่ม I ประกอบไปด้วย *C. annum* *C. baccatum* และ *C. pubescens* มีค่า bootstrap สนับสนุนถึง 70% และกลุ่มที่ II ประกอบไปด้วย *C. chinense* และ *C. frutescens* สมาชิกในแต่ละกลุ่มมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่หลากหลายและผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนี้แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถใช้ตำแหน่ง *rbcl* ในการจัดจำแนกชนิดระหว่าง *C. annum* *C. baccatum* และ *C. pubescens* ได้ อีกทั้งยังไม่สามารถใช้จำแนกชนิดระหว่าง *C. chinense* และ *C. frutescens* ได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามดูเหมือนว่าจะสามารถใช้ในการจำแนก *C. annum* *C. baccatum* และ *C. pubescens* ออกจากกลุ่มชนิด *C. chinense* และ *C. frutescens* เท่านั้น (ภาพที่ 1.5.9)



ภาพที่ 1.5.9 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพริกในประเทศไทยที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *trnH-psbA*

ยีนตำแหน่ง *ITS* สามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่ม I ประกอบไปด้วยพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* มีค่า bootstrap และค่าความเชื่อมั่นสนับสนุน 80% และ 0.99 ตามลำดับ และยังสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่มย่อยที่มีค่ามีค่า bootstrap และค่าความเชื่อมั่นสนับสนุนสูง คือ กลุ่มย่อย 1 พริก *C. frutescens* CAP52 (พริกเหลืองพัทลุง) และ *C. frutescens* CAP53 (พริกชี้หนู) และกลุ่มย่อย 2 พริก *C. chinense* CAP56 (พริกบุตโจโลเกีย) และ CAP57 (พริกบุตโจโลเกีย) ซึ่งกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกลีบดอกสีเขียวเหลืองหรือเขียวครีม เป็นลักษณะร่วมเป็นลักษณะที่แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ กลุ่มที่ II ประกอบด้วยพริกชนิด *C. annuum* ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสีดอกที่เป็นสีขาว ขาวอมม่วง และสีม่วง โดยในกลุ่มนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้อีก 3 กลุ่มย่อย มีค่า bootstrap สนับสนุนมากกว่า 70% ขึ้นไป ได้แก่ กลุ่มย่อย 1 เป็นกลุ่มที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสีผลที่หลากหลาย ได้แก่ ผลอ่อนสีเขียวผลแก่สีแดง *C. annuum* CAP11 (พริกชี้ฟ้า) ผลอ่อนสีเขียวผลแก่สีเหลือง *C. annuum* CAP10 (พริกเหลืองน้ำส้ม) และ *C. annuum* CAP27 (พริกเหลือง) และผลอ่อนสีม่วงดำผลแก่สีแดง *C. annuum* CAP30 (พริกดำระยอง) กลุ่มย่อย 2 คือ *C. annuum* CAP12 (พริกชี้ฟ้า #7) และ *C. annuum* GU944973 (Jaranda)

และกลุ่มย่อย 3 ประกอบด้วยพริก *C. annuum* CAP6 (พริกตอเรือธงทรัพย์) *C. annuum* CAP2 (พริกพิจิตร 25-1-1-1) *C. annuum* CAP3 (พริกพิจิตร 27-2-1-1-1) *C. annuum* CAP23 (พริกหยวกขาว) และ *C. annuum* LC510552(Akashi) นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงในกลุ่มพริกบางช่วง และพริกชี้ฟ้า ซึ่งไม่ได้เกาะกลุ่มกันแต่กลับกระจายตัวอยู่ภายในกลุ่ม II และกลุ่มที่ III เป็นกลุ่มของพริก *C. baccatum* ประกอบด้วยพริก *C. baccatum* CAP44 (พริกเลมอนดรอป) และพริก *C. baccatum* ชนิดอื่นๆ ที่ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank มาร่วมวิเคราะห์ มีค่า bootstrap และค่าความเชื่อมั่นสนับสนุน 97% และ 1.00 ตามลำดับ และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกันมีกลีบดอกสีขาวและมีแฉกสี่เหลี่ยมฐานกลีบดอก (ตารางที่ 1.5.3 และภาพที่ 1.5.10) จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าตำแหน่ง *ITS* เป็นตำแหน่งที่ดีที่สุดสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับพริก โดยสามารถใช้จัดจำแนกพริก *C. annuum* และ *C. baccatum* ออกจากพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* ในระดับชนิดได้ แต่ไม่สามารถจัดจำแนกระดับสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ซึ่งผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่ากลุ่ม *C. annuum* ในประเทศไทยอาจมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าที่คาดการณ์ไว้ก่อนหน้านี้ ดังจะเห็นได้จากในกรณีพริกบางช่วงและพริกชี้ฟ้า (ภาพที่ 1.5.10) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ายังไม่มียีน *ITS* *rbcL* และ *tmH-psbA* ที่สามารถใช้จำแนกชนิดพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* ออกจากกันได้ ถึงแม้ว่าอัตราความสำเร็จในเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง *ITS* จะค่อนข้างต่ำกว่าตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดอื่นๆ แต่ผลการศึกษาชี้ให้เห็นยีนตำแหน่ง *ITS* สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับพริกที่ดี จึงควรมีการศึกษาต่อยอดเพื่อพัฒนาดีเอ็นเอบาร์ในตำแหน่ง *ITS* ให้มีความจำเพาะกับพริกมากขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและอัตราความสำเร็จในการใช้ระบุชนิดและสายพันธุ์ได้



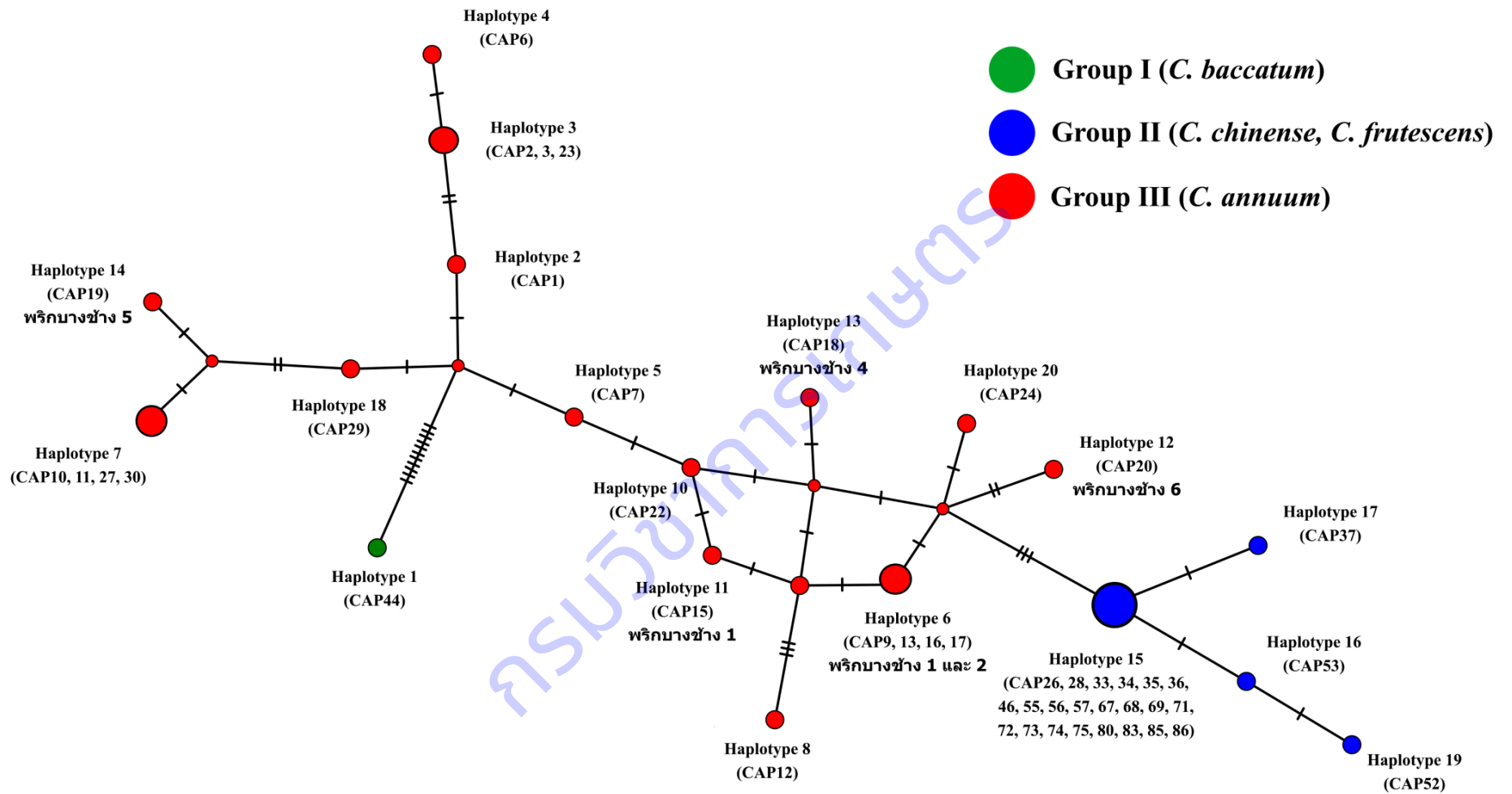
ภาพที่ 1.5.10 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพริกในประเทศไทยที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *ITS*

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าที่ตำแหน่ง *ITS* มีความแปรผันทางพันธุกรรมที่สูงกว่ายีนตำแหน่งอื่นๆ จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนของพริกจำนวน 49 ตัวอย่างมาวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรม (haplotype diversity) ของพริกในประเทศไทยพบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 20 haplotypes (h) มีจำนวนความแปรผันของยีน 26 ตำแหน่ง (26 variation sites) และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.7908 (Hd) ซึ่งความหลากหลายของแต่ละ haplotype แสดงในตารางที่ 1.5.7 โดยทั้ง 20 haplotypes ประกอบไปด้วย 3 กลุ่มประชากรที่มีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการก่อนหน้านี้ด้วยยีนตำแหน่ง *ITS* (ภาพที่ 1.5.10) ได้แก่ กลุ่ม I เป็นกลุ่มของ *C. baccatum* จำนวน 1 haplotype (haplotype 1) กลุ่ม II เป็นกลุ่มของ *C. chinense* และ *C. frutescens* จำนวน 4 haplotypes (haplotype 15-17 และ 19) และกลุ่ม III เป็นกลุ่มของ *C. annuum* จำนวน 15 haplotypes (haplotype 2-14 18 และ 20) (ภาพที่ 1.5.11) โดยพบว่าพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำเพียง 4 haplotypes ซึ่งส่วนใหญ่กระจุกตัวอยู่ใน haplotype 15 ในขณะที่ในกลุ่มของพริก *C. annuum* ในประเทศไทยกลับมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงถึง 15 haplotypes ซึ่งบาง haplotype มีความสอดคล้องในระดับสายพันธุ์ด้วย เช่น กลุ่มพริกพิจิตร (haplotype 2 และ 3) พริกคอเรืองทรัพย์ (haplotype 4) พริกยอดสน (haplotype 5 และ 13) พริกเดือนไก่ (haplotype 10) พริกตุ้ม (haplotype 18) และพริกหนุ่มเชียงใหม่ (haplotype 20) และยังพบว่ากลุ่มพริกบางช้าง (haplotype 6 9 11 12 และ 14) มีความแปรผันทางพันธุกรรมที่มีความหลากหลายสูงถึง 5 haplotypes โดยความแปรผันนั้นไม่ขึ้นกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาอีกด้วย (ภาพที่ 1.5.11)

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง *ITS* สามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดพริกในสกุล *Capsicum* ได้ดีกว่าตำแหน่ง *rbcL* และ *trnH-psbA* เนื่องจากตำแหน่ง *ITS* เป็นตำแหน่งยีนที่อยู่บนนิวเคลียส (nuDNA) จึงมีความแปรผันของดีเอ็นเอสูงกว่ายีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ (cpDNA) (Rosario et al., 2019) ซึ่งยังสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าตำแหน่งยีนบริเวณ คลอโรพลาสต์แยกความแตกต่างระดับชนิดในสกุลพริก (*Capsicum*) ได้ ขณะที่พริก *C. annuum* และ *C. pubescens* สามารถใช้ตำแหน่ง *ITS* ในการจัดจำแนกชนิด (Jarret, 2008; Rosario et al., 2019). และพริกในประเทศไทยมีทั้งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สูงในกลุ่มพริก *C. annuum* และกลุ่มพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* ที่มีความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สูงแต่กลับมีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลจากสิ่งแวดล้อมเป็นตัวกำหนดหรือเกิดจากการผสมแบบคัดเลือกลักษณะให้ได้ตามความต้องการของเกษตรกรจึงทำให้ลักษณะที่ปรากฏไม่ได้สะท้อนถึงความแปรผันทางพันธุกรรมที่สอดคล้องกับลักษณะที่แสดงออกได้อย่างแท้จริง (Sun et al., 2014; Colonna et al., 2019)

ตารางที่ 1.5.7 แสดงบริเวณที่มีความแปรผันของแต่ละ haplotype ของพริกในประเทศไทยที่วิเคราะห์จากยีนตำแหน่ง/T5โดยใช้โปรแกรม DnaSP v. 6.12.03

Haplotype	Variation sites																									
	127	130	131	139	158	169	172	185	188	192	194	206	208	228	245	268	280	308	318	320	322	324	326	336	354	362
1	C	A	T	G	G	G	C	T	T	T	A	C	T	C	T	G	C	C	T	T	T	T	C	T	C	C
2	G	.	.	A	.	C	.	.	C	C	.	.	C	T	C	C	.	.	T	C	T	.
3	G	.	.	A	.	C	.	.	C	C	.	T	C	G	.	.	T	C	C	.	.	T	C	T	.	
4	G	.	.	A	.	C	.	.	C	C	.	T	C	G	.	.	T	C	C	.	.	T	G	T	.	
5	G	.	.	A	.	C	.	.	C	C	.	.	C	.	.	A	.	.	C	C	.	.	T	C	T	.
6	G	.	.	A	.	C	.	C	C	C	.	T	C	.	.	A	.	T	C	C	.	C	T	C	T	.
7	G	.	.	A	.	C	.	C	C	C	G	.	C	C	C	C	.	T	C	T	G
8	G	C	.	A	.	C	.	.	C	C	.	T	C	.	C	A	.	.	C	C	.	C	T	C	T	.
9	G	.	.	A	.	C	.	C	C	C	.	T	C	.	.	A	.	.	C	C	.	C	T	C	T	.
10	G	.	.	A	.	C	.	C	C	C	.	.	C	.	.	A	.	.	C	C	.	.	T	C	T	.
11	G	.	.	A	.	C	.	C	C	C	.	.	C	.	.	A	.	.	C	C	.	C	T	C	T	.
12	G	.	.	A	.	C	.	C	C	C	.	T	C	.	.	A	A	T	C	.	.	.	T	C	T	.
13	G	.	.	A	.	C	.	C	C	C	.	T	C	C	C	.	.	T	C	T	.
14	G	.	.	A	.	C	.	C	C	C	G	.	C	C	.	.	.	T	C	T	G
15	G	.	.	A	A	C	.	.	C	.	.	T	C	.	.	A	.	T	C	C	.	.	T	C	T	.
16	G	.	.	A	A	C	T	.	C	.	.	T	C	.	.	A	.	T	C	C	.	.	T	C	T	.
17	G	C	.	A	A	C	.	.	C	.	.	T	C	.	.	A	.	T	C	C	.	.	T	C	T	.
18	G	.	.	A	.	C	.	.	C	C	G	.	C	C	C	.	.	T	C	T	.
19	T	.	.	A	A	C	T	.	C	.	.	T	C	.	.	A	.	T	C	C	.	.	T	C	T	.
20	G	.	A	A	.	C	.	C	C	C	.	T	C	.	.	A	.	T	C	C	.	.	T	C	T	.



6. การจัดทำพรรณไม้แห้งอ้างอิงและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุในธนาคารเชื้อพันธุพืช

จากนั้นได้จัดทำพรรณไม้แห้งอ้างอิงโดยได้เก็บรักษาไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ (BANGKOK HERBARIUM: BK) สำนักคุ้มครองพันธุพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 84 ชิ้นตัวอย่างแห้ง โดยตัวอย่างของลักษณะของพรรณไม้แห้งอ้างอิง แสดงดังภาพที่ 1.5.12 และในส่วนของเมล็ดเชื้อพันธุพริกได้ทำการคัดเลือกเมล็ดเชื้อพันธุที่มีชีวิตนำไปเก็บรักษาไว้ที่ธนาคารเชื้อพันธุพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 84 ตัวอย่างเชื้อพันธุ ซึ่งรายละเอียดเชื้อพันธุพริกสอดคล้องกับพรรณไม้อ้างอิงและดีเอ็นเออ้างอิงดังแสดงในตารางที่ 1.5.2



สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ตำแหน่ง ITS เป็นตำแหน่งยีนที่สามารถจัดจำแนกความแตกต่างระดับชนิดและระดับสายพันธุ์ของพริกในประเทศไทยได้เฉพาะในกลุ่มพริก *C. annuum* และสามารถแบ่งแยกความแตกต่างในระดับชนิดระหว่าง *C. annuum*, *C. baccatum* และ *C. pubescens* ได้ แต่ไม่สามารถระบุชนิดระหว่างพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* และดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีน *rbcL* ไม่สามารถใช้ในการระบุชนิดของพริกระหว่าง *C. annuum*, *C. baccatum* และ *C. pubescens* และระหว่าง *C. chinense* และ *C. frutescens* ออกจากกันได้ และ *trnH-psbA* สามารถใช้ระบุชนิดได้เพียง *C. baccatum* เท่านั้น และ

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยส่วนโดยส่วนใหญ่ไม่สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยา ยกเว้นสีของกลีบดอกที่สอดคล้องกับการจัดจำแนกชนิดตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกกลุ่ม *C. annuum* มีค่อนข้างสูงโดยสามารถแบ่งได้ถึง 20 haplotypes โดยกลุ่มพริกบางข้างมีความแปรผันทางพันธุกรรมที่มีความหลากหลายสูงถึง 5 haplotypes โดยความแปรผันนั้นไม่ขึ้นกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

กิจกรรมที่ 2

ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชไร่

Diversity and DNA Barcode of Acronomic Crops

การทดลองที่ 2.1

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง

DNA Barcodes and Genetics Diversity of Cassavas

ชื่อผู้วิจัย

ธีรวุฒิ วงศ์วรรตน์ สุวลักษณ์ อมะวัลย์ และ ประพิศ วงเทียม

Theerawut Wongwarat, Suwaluk Amawan and Prapit Wongtiem

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอบาร์โค้ด มันสำปะหลัง ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Key words :DNA barcodes,Cassava,Genetic diversity

บทคัดย่อ

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดคือข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ ของดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ชี้เฉพาะสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งปัจจุบันนำเอาดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์การประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมต้องผ่านเกณฑ์การคัดเลือก 3 ประการ ได้แก่ ความเป็นสากล คุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ และประสิทธิภาพในการแยกพืชแต่ละชนิดออกจากกันงานวิจัยนี้ได้ทำการประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนิวเคลียร์ไรโบโซมอลและคลอโรพลาสต์ 10 ยีนจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง 17 พันธุ์ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์สากล 29 คู่ไพรเมอร์ แล้วตรวจสอบคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี BlastNพบว่า ไพรเมอร์สากล 4 ไพรเมอร์ของยีน *rbcl, trnH-psbA, matK* และ *ITS2* สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายได้ทั้ง 17 พันธุ์ มีขนาดของขึ้นดีเอ็นเอ 615, 426, 794 และ 317 คู่เบส ตามลำดับแต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันกับมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) บนฐานข้อมูลสากล GenBank ที่ระดับความเหมือนสูง 99.05-100% ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 4 จึงผ่านเกณฑ์การประเมินความเป็นสากล และคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ งานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 120 พันธุ์/สายพันธุ์/หมายเลขพันธุ์ จากแปลงการรักษารักษาเชื้อพันธุกรรมพันธุ์ไทย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง มาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl, trnH-psbA, matK* และ *ITS2* พบว่าไพรเมอร์สากล *rbcl, trnH-psbA, matK* และ *ITS2* สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะมีผลสำเร็จสูง 100 100 94 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันกับมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) บนฐานข้อมูลสากล GenBank ที่ระดับความเหมือน 97.15-100% เมื่อพิจารณาความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 4 ยีน พบว่า มี *matK* และ *ITS2* ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรม แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* มีเพียง 86-13 เท่านั้นที่แตกต่างจากพันธุ์อื่น ๆ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* มีความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์จำนวน 40 ตำแหน่งและจัดดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้ 26 รูปแบบจึงได้นำเอาเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *ITS2* ใช้เป็นข้อมูลสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า สามารถแบ่งกลุ่ม 6 กลุ่มสามารถแยกบางพันธุ์/หมายเลขพันธุ์ออกจากกลุ่มได้และสามารถแยกชนิดมันสำปะหลังออกจากพืชนอกกลุ่มทดลอง คือ สกูด ยางพาราได้อย่างชัดเจน การเก็บตัวอย่างจำนวน 50 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกมันสำปะหลังอำเภอ น้ำพองและอำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่นพบว่าตัวอย่างที่เก็บมาจำนวน 40 ตัวอย่างและ 10 ตัวอย่างมีลักษณะประจำพันธุ์เด่นที่ปรากฏตรงกับพันธุ์ระยอง 72 และ เกษตรศาสตร์ 50 ตามลำดับ นำสารสกัดดีเอ็นเอของทุกตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *ITS2* และหาลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากทุกตัวอย่างกับฐานข้อมูลสากล GenBank พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของระยอง 72 และ เกษตรศาสตร์ 50 ที่เก็บไว้ในฐานข้อมูลสากล GenBank ดังนั้น ยีน *ITS2* จึงผ่านเกณฑ์ประเมินประสิทธิภาพในการแยกพืชแต่ละชนิดออกจากกันแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* เป็นบริเวณหนึ่งที่สามารถเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของมันสำปะหลังได้ซึ่งสามารถนำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกพันธุ์มันสำปะหลังได้ แต่ควรใช้ร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดอื่น ๆ เพื่อเพิ่มความผันแปรและเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

Abstracts

DNA barcode is a standardized short region of DNA sequences that is specific to a species. DNA barcoding are useful tools in species identification and reconstruction of phylogenetic relationships of species for breeding program. Assessing standardizes DNA sequence were established to suitable DNA barcode, which would theory basis for screening of DNA barcode in plant, universally recoverable DNA sequence, sequence quality and level of species discrimination. In this study, the twenty-nine universal primers from ten regions of nuclear ribosomal and chloroplast DNA of seventeen cassavas were used for PCR amplification, BlastN was used to determine the quality of nucleotide sequences. The results showed that only four primer pairs of *rbcl*, *trnH-psbAmatK* and *ITS2* have been successfully yielded all PCR products of 17 cassava cultivars with the sequence length of 615, 426, 794 and 317 bp, respectively. All nucleotide sequences showed the similarity value to *Manihot esculenta* deposited on GenBank database at 99.05-100%. Therefore, the nucleotide sequences of all four genes were used to provide theoretical basis for universality with better amplification and success quality of sequences. One hundred twenty cassava cultivars/lines/ accession number were collected from Thai germplasm collection in Rayong Field Crops Research Center and were nucleotide sequences of *rbcl*, *trnH-psbAmatK* and *ITS2* were determined. The results showed that the universal primers of *rbcl*, *trnH-psbA*, *matK* and *ITS2* were able to achieve high success-specific target DNA fragments by 100, 100, 94 and 91 percent, respectively. All nucleotide sequences showed the similarity value to *Manihot esculenta* deposited on GenBank database at 97.15-100% identity. The *rbcl* and *trnH-psbA* sequences showed no nucleotide variation whereas *matK* and *ITS2* sequences presented variation position. The nucleotide sequence of the *matK* gene, only Rayong 86-13 separated from the other cultivars. The *ITS2* sequences found the variation among cassava cultivars contain at 40 nucleotide positions and different patterns of nucleotide sequence were found 26 haplotypes. Therefore, the phylogenetic tree analysis by Neighbor-joining method from the nucleotide sequence of the *ITS2* gene was constructed. The results showed that cassavas can be classified into six groups and distinguished some cassava cultivars/accession numbers and rubber as an outgroup. Fifty cassava samples form several crops Fifty cassava samples from several locations in a field, Nam Phong and Ban phai district, Khon Kaen province were collected. Forty and ten samples have some important characteristics accurate Rayong 72 and Kasetsart 50, respectively. All DNA were amplified with primer of *ITS2* and sequencing. The *ITS2* nucleotide sequences were determined alignment search tool of GenBank. The results found that nucleotide sequences were highly similar (100 percent) to deposit nucleotide sequences of Rayong 72 and kasetsart 50 in to GenBank database. Therefore, the *ITS2* gene revealed the criteria of efficiency discrimination ability. Results suggested that *ITS2* sequences facilitates assessment one of DNA barcode as an effective tool for genetic

diversity and cassava cultivar identification. However, a combination with other DNA barcode could increase variable and information sites for a better to plane breeding program in the future.

บทนำ (Introduction)

มันสำปะหลัง เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตทั้งอาหารมนุษย์ อาหารสัตว์ สิ่งอุปโภค เครื่องมือทางการแพทย์ และเป็นพืชพลังงานทดแทน ซึ่งมีตลาดอุตสาหกรรมรองรับผลผลิตทางการเกษตร ภาวะการผลิตมันสำปะหลัง ปี 2564 คาดว่ามีพื้นที่เก็บเกี่ยว 9.09 ล้านไร่ ผลผลิต 29.883 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 3.29 ตัน เมื่อเทียบกับปี 2563 พบว่า พื้นที่เก็บเกี่ยว ผลผลิตและผลผลิตต่อไร่ เพิ่มขึ้นร้อยละ 1.91 ร้อยละ 3.05 และร้อยละ 1.23 ตามลำดับ (ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมันสำปะหลัง ให้ได้ผลผลิตต่อไร่สูง เกษตรกรจำเป็นต้องมีระบบการจัดการที่ดี ทั้งการเตรียมดินปลูก การจัดการปุ๋ยและน้ำอย่างเหมาะสม ตรงตามความต้องการของพืช การดูแล ป้องกัน กำจัดวัชพืช โรคและแมลงศัตรูพืช รวมทั้งการเลือกใช้พันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ดีและตรงตามพันธุ์ มันสำปะหลังพันธุ์ดีนั้นต้องผ่านขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์มากมาย การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญต่อความสำเร็จและประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังโดยใช้วิธีการสังเกตและบันทึกข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ 50 ลักษณะ แบ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์หลังจากการเพาะปลูก หลังเพาะปลูก 6 เดือน หลังเพาะปลูก 9 เดือน และช่วงการเก็บเกี่ยว (Fukuda et al., 1998) ขั้นตอนการจำแนกและระบุพันธุ์ของมันสำปะหลังตามลักษณะดังกล่าว ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง อาจพบความไม่สม่ำเสมอของตัวอย่างเนื่องจากสภาพแวดล้อม และใช้ระยะเวลาในการพิสูจน์นานและอาจส่งผลทำให้เกิดการใช้พันธุ์มันสำปะหลังที่ไม่ตรงตามพันธุ์ จึงทำให้ผลผลิตต่ำ สร้างความเสียหายให้เกษตรกร ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) มาใช้เพื่อการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มพืช โดยอาศัยหลักการของความจำเพาะเจาะจงของดีเอ็นเอ เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม รวมทั้งเป็นเครื่องมือช่วยจำแนกหรือการตรวจสอบพันธุ์พืชด้วย

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcodes) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดหนึ่งที่น่าสนใจมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์และเป็นเครื่องมือช่วยการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตดีเอ็นเอบาร์โค้ดคือข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ ของดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานของพืชนั้นอยู่ในขั้นตอนของการทดลองหาบริเวณที่เหมาะสมรวมทั้งยังไม่มีข้อมูลทางพันธุกรรมระดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์มันสำปะหลังของกรมวิชาการเกษตรด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาใช้ศึกษานั้นเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในบริเวณคลอโรพลาสต์ (Chloroplast DNA; cpDNA) เช่น ยีน *rbcl* *matK* *rpoC1* *rpoB* เป็นต้น และนิวเคลียร์ไรโบโซมอล (nuclear ribosomal DNA; nrDNA) เช่นบริเวณระหว่างยีน intergenic spacer *trnH-psbA* (Hajibabaei et al., 2007; Ford et al., 2009) ซึ่งเชื่อถือน่าจะมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการเพียงพอที่จะทำให้เกิดความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดใกล้เคียงกันออกจากกันได้ การใช้ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์บริเวณ intergenic spacers 5'-*trnS-trnG*, 3'-*trns-trnG* และ *trnT-trnL* พบว่าบริเวณดังกล่าวมีความผันแปรสูงและสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับสปี

ซีส์ของ *Pilosocereus aurisetus* group (Cactaceae) ได้มากกว่าการวิเคราะห์ด้วยการใช้อนุกรมวิธาน (Bonatelli et al., 2013) ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรบางชนิดเช่นขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) เรวู้ (*Amomum uliginosum* K.D.Koenig) โดยการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed space ระยะของ 1 (ITS1) ที่อยู่ระหว่างไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 18S และ 5.8S (Jiang et al., 2006; Qiao et al., 2009) อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของของดีเอ็นเอพืชควรใช้ตำแหน่งดีเอ็นเอมากกว่า 1 ตำแหน่งร่วมกันเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำเพิ่มขึ้นในการจำแนกพืชระดับชนิดสามารถทำได้ด้วยการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชนิดดีเอ็นเอ *trnH-psbA* ร่วมกับ ITS2 ในการสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Pang et al., 2012) การจำแนกพืช *Hippophae* species (Shaji) ด้วยการอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำได้ยาก แต่ก็สามารถจำแนกได้ทั้งระดับชนิดและชนิดย่อยได้ด้วยการประยุกต์ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดดีเอ็นเอบริเวณ *trnH-psbA* ร่วมกับ ITS2 (Liu et al., 2015)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานและเพื่อใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง เพื่อประโยชน์สำหรับงานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์

1. มันสำปะหลังและตัวอย่างนอกกลุ่มที่ศึกษา (outgroup)
 - 1.1 พันธุ์มันสำปะหลังที่ได้รับการรับรองพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร ได้แก่ พันธุ์ระยอง 1 ระยอง 2 ระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 7 ระยอง 9 ระยอง 11 ระยอง 86-13 ระยอง 60 ระยอง 72 และระยอง 90 พันธุ์ระยอง 86-13
 - 1.2 พันธุ์มันสำปะหลังที่เป็นพันธุ์จากความร่วมมือกันระหว่างกรมวิชาการเกษตรและสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ได้แก่ พันธุ์พิรุณ 1 และ พิรุณ 2
 - 1.3 พันธุ์มันสำปะหลังที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จากแหล่งอื่น ๆ ได้แก่ พันธุ์ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 และเกษตรศาสตร์ 50
 - 1.4 พันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ พันธุ์ห่านาที่
 - 1.5 พันธุ์/สายพันธุ์/หมายเลขพันธุ์ ที่ปลูกในแปลงการรักษาเชื้อพันธุกรรมแปลงพันธุ์ไทย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
 - 1.6 มันสำปะหลังในแหล่งปลูกที่ต่างๆ ในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น
 - 1.7 ตัวอย่างนอกกลุ่มที่ศึกษา (outgroup) ใช้ยางพารา (*Hevea brasiliensis* (Kunth) Muell. Arg.)
2. ชุดน้ำยาและสารเคมีที่ใช้สำหรับงานด้านเครื่องหมายโมเลกุล
3. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR
4. เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า แบบแวนนอน
5. กล้องบันทึกภาพ

วิธีการ

1. การประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด

1.1 ตัวอย่างมันสำปะหลัง

พันธุ์มันสำปะหลังที่ได้รับการรับรองพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร 11 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ระยอง 1 ระยอง 2 ระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 7 ระยอง 9 ระยอง 11 ระยอง 86-13 ระยอง 60 ระยอง 72 ระยอง 90 พันธุ์มันสำปะหลังที่เป็นพันธุ์จากความร่วมมือกันระหว่างกรมวิชาการเกษตรและสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พิรุณ 1 และ พิรุณ 2 พันธุ์มันสำปะหลังที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จากแหล่งอื่นๆ 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 และ เกษตรศาสตร์ 50 พันธุ์พื้นเมือง 1 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ห่านาที และตัวอย่างนอกกลุ่มที่ศึกษา (Outgroup) ใช้ยางพารา

1.2 การเก็บข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์และจัดทำพรรณไม้แห้ง

บันทึกลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ตามคู่มือการบันทึกข้อมูลของกรมส่งเสริมการเกษตร (2559) และจัดทำการเก็บรักษาหลักฐานอ้างอิงงานวิจัยของมันสำปะหลังในรูปตัวอย่างพรรณไม้แห้งไว้ในพิพิธภัณฑสถานพืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร (Bangkok Herbarium, BK)

1.3 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำใบมันสำปะหลังมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในโถงที่มีไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผงแล้วใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA extraction GF-1, vivantis) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงนำสารสกัดดีเอ็นเอมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 ng/ul นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR บริเวณ 10 ยีน ได้แก่ *rpoC1*, *rbcl*, *matK*, *ITS*, *ITS2*, *trnH-psbA*, *trnL-F*, *psbK-psbI*, *atpF-atpH* และ *rpoB* ใช้ไพรเมอร์สากล 29 คู่ (ตารางที่ 2.1.1) ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis หลังจากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Illumina Hiseq (illumine) ด้วยเทคนิค BT-Sequencing (Barcode taq sequencing base on next generation sequencing) ตามกรรมวิธีของบริษัท Celemics ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

ตารางที่ 2.1.1 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สากลจำนวน 29 คู่ไพรเมอร์ ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR บริเวณ 10 ยีน ได้แก่ *rpoC1*, *rbcl*, *matK*, *ITS*, *ITS2*, *trnH-psbA*, *trnL-F*, *psbK-psbI*, *atpF-atpH* และ *rpoB*

ตำแหน่งยีน	ชุดไพรเมอร์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	อ้างอิง
<i>rpoC1</i>	rpoC1-A	rpoC1 2F	GGCAAAGAGGGAAGATTTC	Malik and Babbar, 2015
		rpoC1 4R	CCATAAGCATATCTTGAGTTG	
		rpoC1 3R	TGAGAAAACATAAGTAAACCGGC	
		Fwd	GGAAAAGAGGGAAGATTCCG	Wang et al., 2010
		Rev	CAATTAGCATATCTTGAGTTGG	
<i>rbcl</i>	rbcl-A	rbclA for	ATGTCACCACAAAACAGAGACTAAA GC	Levin et al., 2003
		rbclA rev	GTAATCAAGTCCACCCRCG	Kress and Ericson, 2009
		rbcl_aR	CTTCTGCTACAAATAAGAATCGAT CTC	
		rbclLajf634R	GAAACGGTCTCTCCAACGCAT	Fazekas et al., 2008
	rbcl-B	rbcl 1F	ATGTCACCACAAAACAGAAAC	Bafeel et al., 2011

		RbcL 724R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	
	rbcL-C	Fwd	GTAAAATCAAGTCCACCACG	Wang et al., 2010
		Rev	ATGTCACCACAAAACAGAGACTAAAGC	
<i>matK</i>	matK-A	3F KIM A	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	Fazekas et al., 2012
		1R KIM	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	
	matK-B	matK-2.1F	CCTATCCATCTGGAAATCTTAG	Bafeel et al., 2011
		matK-5K	GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG	
	matK-C	matK-390F	CGATCTATTCATTCAATATTC	Cuenoud et al., 2002
		matK-1326R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	
	matK-D	NY552F	CTGGATYCAAGAAGAACGGAGA	Fazekas et al., 2012
		NY1150R	GGTCTTTGAGAAGAACGGAGA	
	matK-E	matKPKF4	CCCTATCTATTCAYCCNGA	
		matKPKR1	CGTATCGTGCTTTTTRTYTT	
	matK-F	matK-xf	TAATTTACGATCAATTCATTC	Ford et al. 2009
		matK-MALP	ACAAGAAAGTCGAAGTAT	
	matK-G	matK-Mu1	GTCCGTTGATGRDTTTTACTTG	Wiryakarun et al. 2013
		matK-Mu2	TTAATGAATCCCGAATCCTG	
	matK-H	F	ATGTCACCACAAAACAGAACTAAA GCAAGT	Parfitt and Badenes,1997
		R	ACTACAGATCTCATACTACCCC	
matK-I	Fwd	CGTACTGTACTTTTATGTTTACGAG	Wang et al., 2010	
	Rev	ATCCGGTCCATCTAGAAATATTGG TTC		
<i>ITS</i>	ITS-A	ITS 4F	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Malik and Babbar, 2015
		ITS 5R	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
		5a fwd	CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG	
		4 rev	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
	ITS-B	AB101	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTG TTCG	Sun et al., 1994
AB102		TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCG TTAC		
<i>ITS2</i>	ITS2-A	ITS-S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	Chen et al., 2010
		ITS3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
	ITS2-B	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White et al., 1990
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>TmH-psbA</i>	<i>TmH-psbA</i> - A	psbA3_F (fwd)	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang et al. 1997
		trnHf_05 (rev)	CGCGCATGGTGGATTACAATCC'	Tate and Simpson, 2003

		trnH2 (fwd)	CGCGCATGGTGGATTCAATCC	
		psbA (rev)	CGAAGCTCCATCTACAAATGG	Hamilton, 1999
		trnH(GUG) (fwd)	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	
		psbAF (rev)	GTTATGCATGAACGTAAGCTC	Sang et al. 1997
<i>trnL-F</i>		C	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Cabelin, and Alejandro, 2016.
		F	ATTTGAACTGGTGACACGAG	
<i>psbK-psbI</i>		Fwd	TTAGCATTTGTTTGGCAAG	Wang et al., 2010
		Rev	AAAGTTTGAGAGTAAGCAT	Wang et al., 2010
<i>atpF-atpH</i>		Fwd	ACTCGCACACACTCCCTTTCC	Wang et al., 2010
		Rev	GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT	Wang et al., 2010
<i>rpoB</i>		Fwd	ATGCAGCGTCAAGCAGTTCC	Wang et al., 2010
		Rev	TCGGATGTGAAAAGAAGTATA	Wang et al., 2010

1.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกับโดยใช้โปรแกรม ClustalW2 ด้วยวิธี Multiple alignment ให้ถูกต้องตรงกันทุกตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบให้เห็นความผันแปรทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอ

2. ศึกษาหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด

เก็บส่วนของใบอ่อนของมันสำปะหลังทั้งหมด 120 พันธุ์/สายพันธุ์/หมายเลขพันธุ์ ที่ปลูกในแปลงการรักษารักษาเชื้อพันธุกรรมแปลงพันธุ์ไทย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง นำมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำสารสกัดดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่คัดเลือกได้ ตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วย Agarose gel electrophoresis เมื่อได้ผลผลิตที่มีขนาดของชิ้นที่ถูกต้อง นำมาแยกบริสุทธิ์ และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3. การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

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

4. การทดสอบระบุพันธุ์มันสำปะหลัง

การเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังในแหล่งปลูกที่ต่างๆ จำนวน 50 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณมาตรฐานเก็บบันทึกข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ แล้วนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานบนฐานข้อมูลสากล GenBank เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ แบ่งเป็นหลังการเพาะปลูกที่อายุ 4 เดือน 5 ลักษณะได้แก่ 1) สียอดอ่อน 2) สีของใบอ่อน 3) ขนที่ยอดอ่อน 4) สีก้านใบ 5) รูปร่างของแฉกที่อยู่กลางใบก่อนเก็บเกี่ยวที่อายุ 11 เดือน 4 ลักษณะได้แก่ 6) สีของลำต้น 7) การมีขี้ของหัว 8) สีผิวเปลือกชั้นนอกของหัว 9) สีเนื้อของหัว ซึ่งดำเนินการปฏิบัติตามคู่มือการบันทึกข้อมูลของกรมส่งเสริมการเกษตร (2559) จัดทำการเก็บรักษาหลักฐานอ้างอิงงานวิจัยของมันสำปะหลังที่ได้รับการรับรองพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร 17 พันธุ์ ในรูปตัวอย่างพรรณไม้แห้งไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร (Bangkok Herbarium, BK)

2. บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแต่ละยีน และจัดส่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากมันสำปะหลังที่ได้รับการรับรองพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร 17 พันธุ์ เก็บบันทึกไว้บนระบบฐานข้อมูลสากล GenBank

เวลาดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2561 - กันยายน 2563 รวมระยะเวลา 3 ปี
สถานที่ดำเนินงานศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Results and Discussion)

1. ผลการประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด

1.1 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง

การบันทึกลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังเพื่อตรวจสอบให้มั่นใจว่าตัวอย่างที่เก็บมาใช้ในการวิจัยมีความถูกต้องตรงตามลักษณะประจำพันธุ์ซึ่งจากการบันทึกข้อมูล พบว่า 1) สียอดอ่อน สามารถแบ่งออกได้เป็น 7 สี ดังนี้ สีเขียวอ่อน สีเขียว สีม่วงอมเขียว สีม่วงอมน้ำตาล สีม่วง สีเขียวอมม่วง สีนํ้าตาลอมเขียว 2) สีของใบอ่อน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 สี ดังนี้ สีเขียวอ่อน สีเขียวอมม่วง สีม่วง 3) ขนที่ยอดอ่อน สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ ดังนี้ มีขน และไม่มีขน 4) สีก้านใบ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 สี ดังนี้ สีเขียวอ่อน สีเขียวอมชมพู สีเขียวอมแดง สีแดงเข้ม 5) รูปร่างของแฉกที่อยู่กลางใบ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 รูปแบบ ดังนี้ ใบหอกปลายมน ใบแหลมแบบใบหอก ใบหอก และใบหอกกลับ 6) สีของลำต้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 สี ดังนี้ สีเขียวเงิน สีเขียวอมน้ำตาล สีนํ้าตาลอมเหลือง สีนํ้าตาลอมส้ม สีนํ้าตาลอ่อน 7) การมีขี้ของหัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ ดังนี้ มีขี้ของหัว และไม่มีขี้ของหัว 8) สีผิวเปลือกชั้นนอกของหัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 สี ดังนี้ สีนํ้าตาลอ่อน สีขาวครีม สีนํ้าตาล สีนํ้าตาลเข้ม 9) สีเนื้อของหัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 สี ดังนี้ สีขาว สีขาวครีม และสีเหลืองอ่อน ข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์ถูกต้องตรงตามลักษณะประจำพันธุ์ (ตารางที่ 2.1.2) ตัวอย่างเหล่านี้ได้ถูกดำเนินการเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้งเพื่อใช้เป็นพันธุ์ไม้อ้างอิงงานวิจัยไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร ซึ่งมีหมายเลขอ้างอิง (voucher specimen) ดังตารางที่ 2.1.3

1.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะบริเวณยีน 10 บริเวณ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์สากล พบว่า มีไพรเมอร์เพียง 4 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ rbcLFwd/Rev บริเวณเป้าหมาย *rbcL*, ไพรเมอร์ psbA3_F/trnHf_05 บริเวณเป้าหมาย *trnH-psbA*, ไพรเมอร์ matK_3F_KIM_A/1R_KIM บริเวณเป้าหมาย *matK* และไพรเมอร์ ITS3/4 บริเวณเป้าหมาย *ITS2* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลังได้ครบทั้ง 17 พันธุ์ โดยมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 615, 426 794 และ 317 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้ง 4 ยีน ในฐานข้อมูลสากล GenBank พบว่ามีความเหมือนกันกับ *Manihot esculenta* Crantz ที่ 100%, 99.77%, 99.87-100% และ 99.05-100% ตามลำดับยีน ซึ่งข้อมูลนี้ยืนยันได้ว่าลำดับนิ

วคลีโอดีที่ไต่จากมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์มีความถูกต้อง และแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
บริเวณทั้ง 4 ยีน นี้ทำได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2.1.2 ความถูกต้องของน้ำมันสำปะหลัง 17 พันธุ์ จากลักษณะประจำพันธุ์

ชื่อตัวอย่าง	ลักษณะประจำพันธุ์									ความถูกต้อง ของพันธุ์
	สียอดอ่อน	สีใบอ่อน	ขนยอดอ่อน	สีก้านใบ	รูปร่างของแฉกที่อยู่ กลาง	สีของลำต้น	การมีข้าว ของหัว	สีผิวเปลือก ชั้นนอกของหัว	สีเนื้อของหัว	
ระยอง1	ม่วง	ม่วง	มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอกปลายมน	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว	ถูกต้อง
ระยอง2	เขียวอมม่วง	เขียวอมม่วง	มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	น้ำตาลอ่อน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	เหลืองอ่อน	ถูกต้อง
ระยอง3	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	มีขน	เขียวอมชมพู	ใบหอกปลายมน	น้ำตาลอ่อน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว	ถูกต้อง
ระยอง5	ม่วงอมน้ำตาล	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	เขียวอมน้ำตาล	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว	ถูกต้อง
ระยอง7	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	เขียวอมชมพู	ใบหอก	น้ำตาลอ่อน	ไม่มี	ขาวนวล	ขาว	ถูกต้อง
ระยอง9	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	เขียวอมชมพู	ใบหอก	น้ำตาลอมเหลือง	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว	ถูกต้อง
ระยอง11	น้ำตาลอมเขียว	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาล	ขาว	ถูกต้อง
ระยอง86-13	ม่วงอมน้ำตาล	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอกกลับ	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว	ถูกต้อง
ระยอง60	ม่วงอมเขียว	เขียวอมม่วง	มีขน	เขียวอมแดง	ใบแหลมแบบใบหอก	น้ำตาลอ่อน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาวครีม	ถูกต้อง
ระยอง72	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	เขียวเงิน	มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว	ถูกต้อง
ระยอง90	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	เขียวอ่อน	ใบหอก	น้ำตาลอ่อน	ไม่มี	น้ำตาลเข้ม	ขาว	ถูกต้อง
เกษตรศาสตร์50	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาล	ขาว	ถูกต้อง
ห้วยบง60	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว	ถูกต้อง
ห้วยบง80	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว	ถูกต้อง
ห้านาที	เขียว	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	น้ำตาลอมเขียว	ไม่มี	น้ำตาลเข้ม	ขาว	ถูกต้อง
พิรุณ1	ม่วงอมเขียว	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาลเข้ม	ขาว	ถูกต้อง
พิรุณ2	เขียว	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	น้ำตาลอ่อน	ไม่มี	น้ำตาลเข้ม	ขาว	ถูกต้อง

ตารางที่ 2.1.3 หมายเลขอ้างอิงพรรณไม้แห้ง และหมายเลขเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *ITS2* ของมันสำปะหลัง 17 พันธุ์

พันธุ์มันสำปะหลัง	หมายเลขอ้างอิง	หมายเลขเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน	
		<i>matK</i>	<i>ITS2</i>
ระยอง 1	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-001	MK834326	MK809337
ระยอง 2	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-002	MK834327	MK809338
ระยอง 3	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-003	MK834328	MK809339
ระยอง 5	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-004	MK834329	MK809340
ระยอง 7	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-005	MK834330	MK809341
ระยอง 9	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-006	MK834331	MK809342
ระยอง 11	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-007	MK834332	MK809343
ระยอง 86-13	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-008	MK834333	MK809344
ระยอง 60	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-009	MK834334	MK809345
ระยอง 72	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-010	MK834335	MK809346
ระยอง 90	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-011	MK834336	MK809347
เกษตรศาสตร์ 50	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-012	MK834337	MK809348
ห้วยบง 60	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-013	MK834338	MK809349
ห้วยบง 80	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-014	MK834339	MK809350
พิรุณ 1	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-015	MK834340	MK809351
พิรุณ 2	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-016	MK834341	MK809352
ห้านาที	T. Wongwarat <i>et al.</i> no. 01-017	MK834342	MK809353

1.3 การวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณจำเพาะ

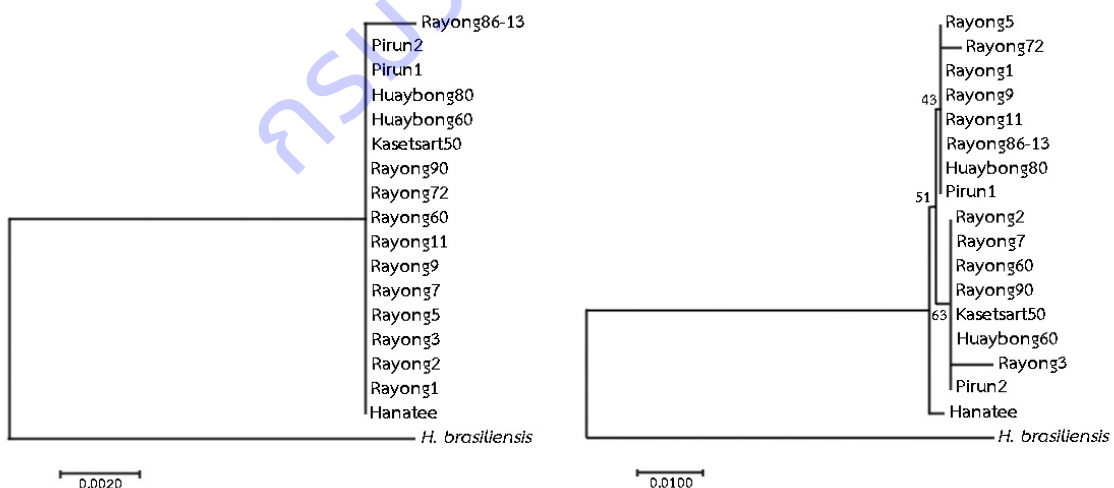
เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK* และ *ITS2* ในมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *trnH-psbA* ไม่มีตำแหน่งที่ผันแปรระหว่างพันธุ์ ในขณะที่ยีน *matK* และ *ITS2* มีตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผันแปรระหว่างพันธุ์ดังตารางที่ 2.1.4 ยีน *matK* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผันแปรกันระหว่างพันธุ์ในรูปแบบพิวรินทรานสิชัน 1 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ A561G) ทำให้เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของพันธุ์ ระยอง 86-13 เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* มีตำแหน่งที่ผันแปรระหว่างพันธุ์อยู่ 5 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ผันแปรแบบไพริมิดินทรานสิชัน 2 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ T97C และ T290C), ทรานสเวอร์ชัน 1 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ A120C) และพิวรินทรานสิชัน 2 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ A148G และ A249G) ซึ่งตำแหน่งที่ 97 แสดงเอกลักษณ์จำเพาะของพันธุ์ ระยอง 72 ตำแหน่งที่ 120 แสดงเอกลักษณ์จำเพาะของพันธุ์ Hanatee ตำแหน่งที่ 148 และ 249 แสดงเอกลักษณ์จำเพาะของพันธุ์ ระยอง 3 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *ITS2* ถูกจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูลสากล GenBank และได้รับหมายเลขเฉพาะ (accession number) ดังตารางที่ 2.1.3

ตารางที่ 2.1.4 รูปแบบความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *ITS2*

ยีน	รูปแบบความผันแปรทางพันธุกรรม	พันธุ์มันสำปะหลัง
<i>matK</i>	purine transitions (A561G)	ระยอง 86-1 พันธุ์อื่นๆ

ITS	pyrimidine transitions (T97C)	ระยอง 72 พันธุ์อื่นๆ
	transversions (A120C)	ห่านาที่
		พันธุ์อื่นๆ
	purine transitions (A148G)	ระยอง 3
		พันธุ์อื่นๆ
	purine transitions (A249G)	ระยอง 3
		พันธุ์อื่นๆ
	pyrimidine transitions (T290C)	ระยอง 2, ระยอง 3, ระยอง 7, ระยอง 60, ระยอง 90, เกษตรศาสตร์ 50, ห้วยบง 60, พิรุณ 2
		พิรุณ 1, ระยอง 5, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 86-13, ระยอง 72, ห้วยบง 80, ห่านาที่

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *ITS2* ของมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์ และใช้ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยางพาราเป็นตัวอย่างนอกกลุ่มมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี neighbor-joining โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 ซ้ำ พบว่า แผนภูมิของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* แสดงให้เห็นว่ามันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 86-13 ถูกแยกออกมาจากมันสำปะหลังอื่น แต่ไม่สามารถพันธุกรรมสำปะหลังอีก 16 พันธุ์ได้ (ภาพที่ 2.1.1A) ส่วนแผนภูมิของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *ITS2* (ภาพที่ 2.1.1B) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มันสำปะหลังพันธุ์ห่านาที่ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองที่นิยมปลูกเพื่อรับประทานถูกแยกออกจากพันธุ์มันสำปะหลังอื่นๆ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ระยอง 1 ระยอง 5 ระยอง 9 ระยอง 86-13 ห้วยบง 80 พิรุณ 1 และ ระยอง 72 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ระยอง 2 ระยอง 7 ระยอง 60 ระยอง 90 เกษตรศาสตร์ 50 ห้วยบง 60 พิรุณ 2 เมื่อพิจารณาภายในกลุ่มจะเห็นได้ว่าพันธุ์ระยอง 3 และ ระยอง 72 ถูกแยกออกจากกลุ่มได้



อย่าง

2. ผลของหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังจากแปลงการรักษารักษาเชื้อพันธุกรรมแปลงพันธุ์ไทย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองจำนวน 120 พันธุ์ เก็บใบของแต่ละพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอ นำสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้ใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ universal primer ที่คัดเลือกแล้วจำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ rbcL Fwd/Rev ไพรเมอร์ psbA3_F/trnHf_05 ไพรเมอร์ matK_3F_KIM A/1R_KIM และไพรเมอร์ ITS3/4 โดยมีขนาดดีเอ็นเอ

615, 426 794 และ 317 คู่เบส ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนบริเวณ *rbcltrnH-psbAmatK* และ *ITS2* ตามลำดับ พบว่า การใช้ไพรเมอร์ *rbclFwd/Rev* ของบริเวณ *rbcl*,ไพรเมอร์ *psbA3_F/trnHf_05* ของบริเวณ *trnH-psbA*สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะมีผลสำเร็จสูง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้ไพรเมอร์ *matK_3F_KIM_A/1R_KIM* ของบริเวณ *matK*และไพรเมอร์ *ITS3/4* ของบริเวณ *ITS2* มีผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ 94 และ 91เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขึ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ หลังจากถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วถูกส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนที่ได้มาเรียงเทียบด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *rbclTrnH-psbA*และ *matK* ไม่มีความผันแปรระหว่างพันธุ์ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *ITS2* มีความผันแปรระหว่างพันธุ์40 ตำแหน่งและได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด 26 รูปแบบ ดังนั้นจึงได้นำเอาเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *ITS2*มาใช้เป็นข้อมูลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า สามารถแบ่งกลุ่ม 6 กลุ่ม ดังภาพที่ 2.1.2 ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ CMR 31-37-105 และ CM 523-7

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ CM 6125-117

กลุ่มที่ 3 แยกออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 3.1 ได้แก่ CMR 342-55 CMR 29-19-129 CMR 25-32-429Q

กลุ่มที่ 3.2 ได้แก่ JAVA2

กลุ่มที่ 3.3 ได้แก่ ระยอง 11 CMR 28-05-13 565

กลุ่มที่ 4 แยกออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 4.1 ได้แก่ CMR 38-66-1

กลุ่มที่ 4.2 ได้แก่ V1Xr21-11 SV25-21-11 CMR 31-06-103 CMR 30-115-5

กลุ่มที่ 4.3 ได้แก่ CMR 34-79-48

กลุ่มที่ 5 แยกออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 5.1 ได้แก่ ระยอง 15 ระยอง 5 V2C MENTEGA CMR 25-33-134Q

กลุ่มที่ 5.2 ได้แก่ CMR 36-55-166 CMR 35-26-369 ระยอง 72 CMR 33-38-48 CMR 33-35-69 CMR 34-35-54 CMR 23-117-4

กลุ่มที่ 5.3 ได้แก่ CMR 30-05-12 CMR 23-149-118 CMR 25-82-88 CMR 26-38-7 CMR 28-67-76 CM 407-30 V112596 V14 29-77-5 CM125-22 MCOL1684 CMR 25-105-128Q JKxR13 CMR29-67-21 MKU2-162 ระยอง 86-13 ระยอง 1 CR17-82 CMC125-22 CMR 35-23-76 CMR 35-21-96 Rx5M21-21Q NANZHI CMR 34-35-36 HANATEE พิรุณ 1 CMR 24-14-367 หัวยง 80 ระยอง 9 Rx5M21-28Q SR18-227 SPY MBRA12

กลุ่มที่ 5.4 ได้แก่ OP608

กลุ่มที่ 6 แยกออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 6.1 ได้แก่ ระยอง 3

กลุ่มที่ 6.2 ได้แก่ CM4049UJ

กลุ่มที่ 6.3 ได้แก่ ระยอง 2 38-106-22 พิรุณ 2 ระยอง 60 CM 581-2 CMR 34-44-40 CMR 25-104-42 เกษตรศาสตร์ 50 OMR 23-05-3 CMR 25-105-47 MKUC 28-11-67 HP 5 CMC76xR NEP GLODENYELLOW OMR 38-75-52 CMR 23-07-10 หัวยง 60 ระยอง 7 ระยอง 90 CMR 23-84-8 OP705 HP1 KASET MCOL1684 V3Xr20-15 ADIRA4 CMR 25-55-28 CMR 23-149-59 SC5 OMR 24-07-12 V25

เป้าหมายมีผลสำเร็จสูง 100 เปอร์เซ็นต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ unknown 01-40 และ unknown 41-50 มีความเหมือนกันกับหมายเลขเฉพาะ (GenBank accession number)MK809346 และ MK809348 ในฐานข้อมูลสากล GenBank ดังตารางที่ 2.1.5 ซึ่งเป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50 ตามลำดับ

งานวิจัยนี้ได้ยึดหลักเกณฑ์การพิจารณาที่สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ต้องมีคุณลักษณะที่สำคัญ 3 ประการ (ณัฐกร และคณะ, CBOL Plant Working Group, 2009) ได้แก่ 1) ความเป็นสากล (universality) คือ โพรเมอร์ที่ใช้เป็นสากล ต้องสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเดียวกันในพืชอื่นได้ด้วยเทคนิค PCR งานวิจัยนี้ใช้โพรเมอร์สากลทั้งหมด 29 คู่ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง 17 พันธุ์ มีเพียงคู่โพรเมอร์ของยีน *rbcl*, *trnH-psbA*, *matK* และ *ITS2* ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ครบทุกตัวอย่าง จึงถือได้ว่า 4 ยีนดังกล่าวผ่านเกณฑ์ข้อแรก 2) คุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence quality) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลัง 4 ยีน มีความเหมือนกันกับยีน *rbcl*, *trnH-psbA*, *matK* และ *ITS2* ของมันสำปะหลังที่ความเหมือนสูงถึง 99.05-100% ซึ่งยืนยันได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความถูกต้อง จึงผ่านเกณฑ์ข้อ 2 และ 3) ประสิทธิภาพในการแยกพืชแต่ละชนิดออกจากกัน (species discrimination) มีรายงานวิจัยยืนยันว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกันของยีน *matK* และ *rbcl* สามารถแยกกล้วยไม้ในระดับสกุลสิงโตกลอกตาได้ นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnH-psbA* มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการศึกษาพืชสกุล *Cymbidium* และ *Piper* (Siriptyasing et al., 2012; Sudmoon et al., 2012) มีรายงานว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *trnH-psbA* เป็นส่วนที่มีความแปรผันของดีเอ็นเอภายในสปีชีส์สูงที่สุดในพลาสมิด (Yang et al., 2012) อย่างไรก็ตามมันสำปะหลังที่นำไปในงานวิจัยนี้เป็นพืชชนิดเดียวกัน คือ *M. esculenta* ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันสูงทำให้ยากต่อการจำแนกระดับพันธุ์ แต่งานวิจัยนี้พบว่าผลการวิเคราะห์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* แสดงแนวโน้มในการแยกมันสำปะหลังได้ออกเป็น 6 กลุ่ม และสามารถแยกชนิดมันสำปะหลังออกจากพืชนอกกลุ่มทดลอง คือ ยางพาราได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *ITS* และ *cpDNA* เป็นเครื่องมือในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันได้ง่ายและสะดวกมากขึ้น (Mayer and Soltis, 1999) และเป็นทางเลือกสำหรับนักวิจัยในการใช้แยกพันธุ์มันสำปะหลัง ซึ่งเคยมีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Trn-Ple* และ *Trn-F* ไม่สามารถแยกความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ของมันสำปะหลังจำนวน 18 พันธุ์ ออกจากกันได้ (ยุรนนท์ และชุตตา, 2560) ดังนั้นยีน *ITS2* ที่คัดเลือกมาใช้ในงานวิจัยนี้จึงผ่านเกณฑ์ข้อ 3 อย่างไรก็ตามการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณเดียวเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังยังคงไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ได้มีรายงานเสนอให้มีการใช้ร่วมกันกับบริเวณอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแบ่งกลุ่มให้มีความถูกต้องและแม่นยำสูงขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ตารางที่ 2.1.5 ลักษณะประจำพันธุ์ที่อายุ 4-5 เดือนของตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงปลูกของเกษตรกรและหมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากล GenBank ที่ตรงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง

ชื่อตัวอย่าง	ลักษณะประจำพันธุ์				รูปร่างของแฉกที่อยู่กลาง	หมายเลขเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์
	สีเขียวอ่อน	สีใบอ่อน	ขนยอดอ่อน	สีก้านใบ		
unknown 1	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	MK809346

unknown 36	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	MK809346
unknown 37	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	MK809346
unknown 38	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	MK809346
unknown 39	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	MK809346
unknown 40	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	MK809346
unknown 41	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	MK809348
unknown 42	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	MK809348
unknown 43	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	MK809348
unknown 44	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	MK809348
unknown 45	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	MK809348
unknown 46	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	MK809348
unknown 47	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	MK809348
unknown 48	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	MK809348
unknown 49	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	MK809348
unknown 50	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	MK809348

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณยีน *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK* และ *ITS2* สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะมีผลสำเร็จสูง 100% และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าบริเวณของดีเอ็นเอดังกล่าวนี้ทำได้ง่ายมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูง เมื่อพิจารณาความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 4 ยีน พบว่า ยีน *matK* และ *ITS2* ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรม 1 และ 26 ตำแหน่ง ตามลำดับ เมื่อข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าสามารถแบ่งมันสำปะหลังออกเป็น 6 กลุ่ม และสามารถแยกยางพารา *Hevea brasiliensis* (KJ665775) ที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่มทดลองได้ การเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* จัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยการนำมาใช้ระบุพันธุ์มันสำปะหลังพบว่าข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ที่ปรากฏและลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างที่เก็บมา (unknown) มีข้อมูลตรงกันกับข้อมูลมาตรฐานอ้างอิงบนฐานข้อมูลสากล GenBank 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *ITS2* จึงมีประสิทธิภาพสามารถใช้เป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดตัวหนึ่งของมันสำปะหลังได้ซึ่งเป็นทางเลือกสำหรับนักวิจัยในการใช้ในการแยกพันธุ์มันสำปะหลังและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมแต่ควรศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดอื่นๆ มาใช้ร่วมด้วย เพื่อเพิ่มความผันแปรและเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของมันเป็นสำปะหลัง เพื่อให้ให้นักปรับปรุงพันธุ์ นักอนุกรมวิธาน นักวิชาการ นักวิชาการเกษตร นักศึกษา และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับงานทางการเกษตรด้านมันสำปะหลัง นำไปใช้ในการศึกษา จำแนก และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม รวมทั้งการระบุชนิดให้ถูกต้องชัดเจน

2. ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่มาจากตัวอย่างที่มีลักษณะประจำพันธุ์ที่ต้องการ สามารถใช้ระบุพันธุ์ที่มีความสำคัญได้ ได้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพื่อให้รักอนุกรมวิธาน นักปรับปรุงพันธุ์ นักศึกษา นักวิชาการเกษตร และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทางการเกษตร ได้นำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์

การทดลองที่ 2.2

การศึกษาและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดในถั่วเหลือง

Study of DNA Barcoding on Soybean

จุฑามาส พักทองพรรณ อ้อยทิน ผลพานิช อรุโณทัย ซาววา

ปาจารย์ อินทะชูป ศุภลักษณ์ สัตยสมิทธิ

Juthamas Fakhongphan Auytin Polpanit Aroonothai Sawwa

Pajaree Inthachub Supalak Sattayasamitsathit

คำสำคัญ : ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ถั่วเหลือง ยีน *ITS*, *rbcl*, *rpocL*

Key-words: DNA barcode, Soybean, *ITS* gene, *rbcl* gene, *rpocL* gene

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*, *rbcl* และ *rpocL* กับถั่วเหลืองจำนวน 40 สายพันธุ์/พันธุ์ ที่ปลูกรวบรวม ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาในการจำแนกและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองในประเทศไทยและจัดเก็บเชื้อพันธุกรรมของถั่วเหลือง เพื่ออนุรักษ์และเก็บรักษาในธนาคารเชื้อพันธุกรรมในสภาพ เมล็ดพันธุ์ โดยจำแนกความแตกต่างของถั่วเหลืองด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยเก็บตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ และตัวอย่างพรรณไม้แห้งของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ ณ ธนาคารเชื้อพันธุกรรมพืช และพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร การทดลองนี้ดำเนินการศึกษาระหว่าง กันยายน 2560 – ตุลาคม 2562 พบว่าเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Clustal Omega และ MEGA-X พบว่ายีน *rbcl* และ *rpocL* สามารถจำแนกถั่วเหลืองสายพันธุ์ ‘ขอนแก่น (Khon Kaen)’ ซึ่งเป็นพันธุ์ท้องถิ่นของ จ.สระบุรี ที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ออกจากถั่วเหลืองสายพันธุ์อื่นๆ ได้ ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองผลผลิตสูงเมื่อปลูกในฤดูแล้ง ขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS* ไม่สามารถแยกสายพันธุ์ถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์ ออกจากกันอย่างสมบูรณ์ แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการจำแนกถั่วเหลือง ดังนั้นเพื่อเพิ่มการจำแนกสายพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นควรเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะอื่น หรือควบคู่กับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเออื่น

Abstract

This study aims to identify and assess the genetic relationship of 40 soybean lines/cultivars using nucleotide sequences of *ITS*, *rbcl* and *rpocL* genes. All soybean

lines/cultivars are planted at Chiang Mai Field Crops Research Center, Chiang Mai province. The objectives of this experiments are to use DNA barcode to identify and grouping genetic relation of soybean in Thailand and storage the soybean genetic and voucher specimen conserving at Gene bank and Sirinthon museum, Department of Agriculture. The study is completed during September 2017- October 2019. According to analyzing data of all genes by using Clustal Omega and MEGA-X, 'Khon Kaen' variety can be identified from other soybeans when use *rbcL* genes. 'Khon Kaen' soybean variety is a landrace variety which collected from Saraburi province, such variety is well adapted and showed high yield at Upper Northeast region of Thailand, especially during dry season. However, ITS gene could not be used to identify all of soybeans. Therefore, it is suggested that the regions other than ITS gene may be included in DNA sequence based identification to increase variable and informative sites for soybeans distinguish.

บทนำ (Introduction)

ถั่วเหลือง (*Glycine max*) จัดอยู่ในตระกูล Leguminosae สกุน Glycine สกุนย่อย Soja มีการเพาะปลูกทั่วไป (Hymowitz, 1970) เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ มีคุณค่าทางอาหารสูง นอกจากนี้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมการผลิต (Masuda and Goldsmith, 2009) เช่น นมถั่วเหลือง เต้าหู้ อาหารสัตว์จากกากถั่วเหลือง และฟิล์มถนอมอาหารที่ย่อยสลายได้ สำหรับประเทศไทย มีการเพาะปลูกถั่วเหลืองมานานกว่าศตวรรษ โดยเฉพาะในบริเวณภาคเหนือตอนบน นิยมปลูกหลังการเก็บเกี่ยวข้าวในฤดูแล้ง และได้มีการขยายพื้นที่ปลูกไปยังบริเวณภาคเหนือตอนล่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ตามลำดับ โดยพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองประมาณ 70% อยู่ในพื้นที่ภาคเหนือ

การใช้ลักษณะสัญญาณในการจำแนกพืชนั้น หากพืชมีความเหมือนและคล้ายคลึงกัน ทำให้ยากต่อการจำแนก ดังนั้นข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมหรือจีโนมไทป์ จึงมีส่วนสำคัญในการช่วยจำแนกพืชให้ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น 'ดีเอ็นเอบาร์โค้ด' เป็นหนึ่งในเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตหรือแต่ละบุคคล โดยประยุกต์จากแนวคิดเรื่องการติดฉลากบาร์โค้ดในสินค้า ซึ่งเป็นนวัตกรรมการจำแนกลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิต มีความถูกต้องและแม่นยำ ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต รวมถึงเพิ่มประสิทธิภาพการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ รวมถึงการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติของพืชได้ (พรณรงค์ และอรุณรัตน์, 2544; Hebert *et al.*, 2003) ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นการนำลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนที่เป็นส่วนอนุรักษ์ในแต่ละชนิดของพืชมาใช้ในการจำแนก เช่น ยีน *rbcL* (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase) เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์รูบิสโก (rubisco) ทำหน้าที่ตรึงคาร์บอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) ยีน *rpoC1* (RNA polymerase beta subunit C1) กำหนดการสร้างเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) โดยยีนทั้งสองมีตำแหน่งเฉพาะที่มีความเหมาะสมสำหรับการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกสิ่งมีชีวิต และยีน *ITS* (internal transcribed spacer region) จากส่วนของนิวเคลียสนั้น นิยมนำมาใช้ในการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดในเชื้อรา (Schochet *al.*, 2012) เป็นต้น การวิจัยจึงได้ศึกษาและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนยีน 3 ยีน คือ *ITS*, *rbcL* และ *rpoC1* ในถั่วเหลือง จำนวน 40 พันธุ์ และเก็บตัวอย่างแห้งของถั่วเหลืองทุกพันธุ์ไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร เพื่อศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมของถั่วเหลือง จัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด และเพื่อกาจำแนกสายพันธุ์/พันธุ์ และการอนุรักษ์พันธุกรรมถั่วเหลือง

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

ศึกษาการสร้างข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลือง จำนวน 40 สายพันธุ์/พันธุ์ ผลิตถั่วเหลือง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืช พิษณุโลก และกองวิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืช ดำเนินการทดลอง ตุลาคม 2560 - กันยายน 2562

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ถั่วเหลือง จำนวน 40 สายพันธุ์/พันธุ์ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มถั่วเหลืองพันธุ์การค้า 23 พันธุ์ กลุ่มสายพันธุ์ดีเด่น 11 สายพันธุ์/พันธุ์ และกลุ่มถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์การค้า 6 สายพันธุ์/พันธุ์
2. ปุ๋ยเคมีและสารเคมีที่ใช้ในการดูแลแปลงปลูกถั่วเหลือง
3. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพืช เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และทำพรรณไม้แห้งอ้างอิง
4. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล เช่น เครื่องซัง โกร่งบดตัวอย่าง หลอดทดลอง ชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators เป็นต้น

วิธีการ

1. สืบค้นและบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา เก็บตัวอย่างใบ ต้น และดอกของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ (ตารางที่ 2.2.1) จากแปลงปลูกถั่วเหลือง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ โดยถ่ายภาพประกอบตัวอย่างที่มีโครงสร้างใบ ดอก และเก็บตัวอย่างผลสมบูรณ์และต้น เพื่อนำมาทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งและกำหนดตัวอย่างหมายเลข voucher specimen เพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐานอ้างอิงตามวิธีมาตรฐานของมาตรฐานของกลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์ สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร
2. การสกัดดีเอ็นเอของถั่วเหลือง นำใบถั่วเหลืองที่ต้องการทดสอบมาล้างด้วยน้ำ เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ชับน้ำให้แห้ง ตัดใบถั่วเหลือง 5 กรัม ให้เป็นชิ้นเล็กๆ บดในโถรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มม. สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสำเร็จรูป MiniPrep DNA Extraction ของบริษัท Real Genomics
3. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ ด้วยการวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงตึงผิว (nanodrop) ใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 2 μ l/ตัวอย่าง/ครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR และเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2.2.1 รายชื่อสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองที่ทำการศึกษา

Group	Name of variety	Group	Name of variety	
Commercial variety	อุสาหะ (10SB60)	Commercial variety	ราชมงคล 1 (Rajamagala 1)	
	สจ.1 (SJ1)		เชียงใหม่ 6 (Chiang Mai 6)	
	สจ.2 (SJ2)		ลพบุรี 84-1 (Lop Buri 84-1)	
	สจ.3 (SJ3)	Superior variety	CM4703-10	
	สจ.4 (SJ4)		CM0701-27	
	สจ.5 (SJ5)		CM9513-3	
	นครสวรรค์ 1 (Nakhonsawan 1)		CM9512-3	
	สุโขทัย 1 (Sukhothai 1)		CM0701-24	
	เชียงใหม่ 60 (Chiang Mai 60)		CM0701-26	
	เชียงใหม่ 1 (Chiang Mai 1)		CM0706-14	
	มข.35 (KKU.35)		Tainung 4	
	สุโขทัย 2 (Sukhothai 2)		William	
	เชียงใหม่ 2 (Chiang Mai 2)		IAC13	
	จักรพันธ์ 1 (Jakapan 1)		KUSL2004	
	สุโขทัย 3 (Sukhothai 3)		Vegetable soybean variety	2808
	เชียงใหม่ 3 (Chiang Mai 3)			เชียงใหม่ 84-2 (Chiang Mai 84-2)
	เชียงใหม่ 4 (Chiang Mai 4)			Chama me
ขอนแก่น (Khon Kaen)	NO.75			
เชียงใหม่ 5 (Chiang Mai 5)	AGS292			
ศรีสำโรง 1 (Srisamrong 1)	Kaori			

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้างต้นมาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับสากล (universal primer) ของยีน ITS, rbcL และ rpoC1 (ตารางที่ 2.2.2) ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป One PCRTM (GeneDireX, Taiwan) โดยเติมดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ทดสอบ 0.5 μ M ในน้ำยา Master Mix ที่มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย Tag DNA polymerase, PCR Buffer, dNTP, gel loading dyes โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 54 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที จำนวน 1 รอบ

ตารางที่ 2.2.2 ไพรเมอร์และลำดับเบสของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการศึกษา

Locus	Primer name	Primer sequence	Reference
ITS	ITS2-S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	Chen et al. (2010)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
rpoC1	rpoC1_F	GGCAAAGAAGGAAGATTTTCG	Parveen et al. (2011)
	rpoCL1_R	TGAGAAAACATAAGTAAACGAGC	Parveen et al. (2011)
rbcL	rbcL - F	ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC	Parveen et al. (2011)
	rbcL - R	CTTCGGCACAAAATAAGAAACGATCTC	Parveen et al. (2011)

5. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ตรวจสอบผล PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วย SYBR safe บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD) Syngene

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากตัวอย่างถั่วเหลืองทั้งหมด 40 สายพันธุ์/พันธุ์ เพิ่มปริมาณยีนจำนวน 3 ยีน ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอแถบยีนที่ต้องการเพียง 1 แถบ และไม่มีแถบของดีเอ็นเออื่น เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วตรวจสอบความถูกต้อง โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GeneBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information)

7. การวิเคราะห์ผล เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA-X โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood และกำหนดค่า bootstrap 1,000 ซ้ำ

ผลการวิจัย (Results)

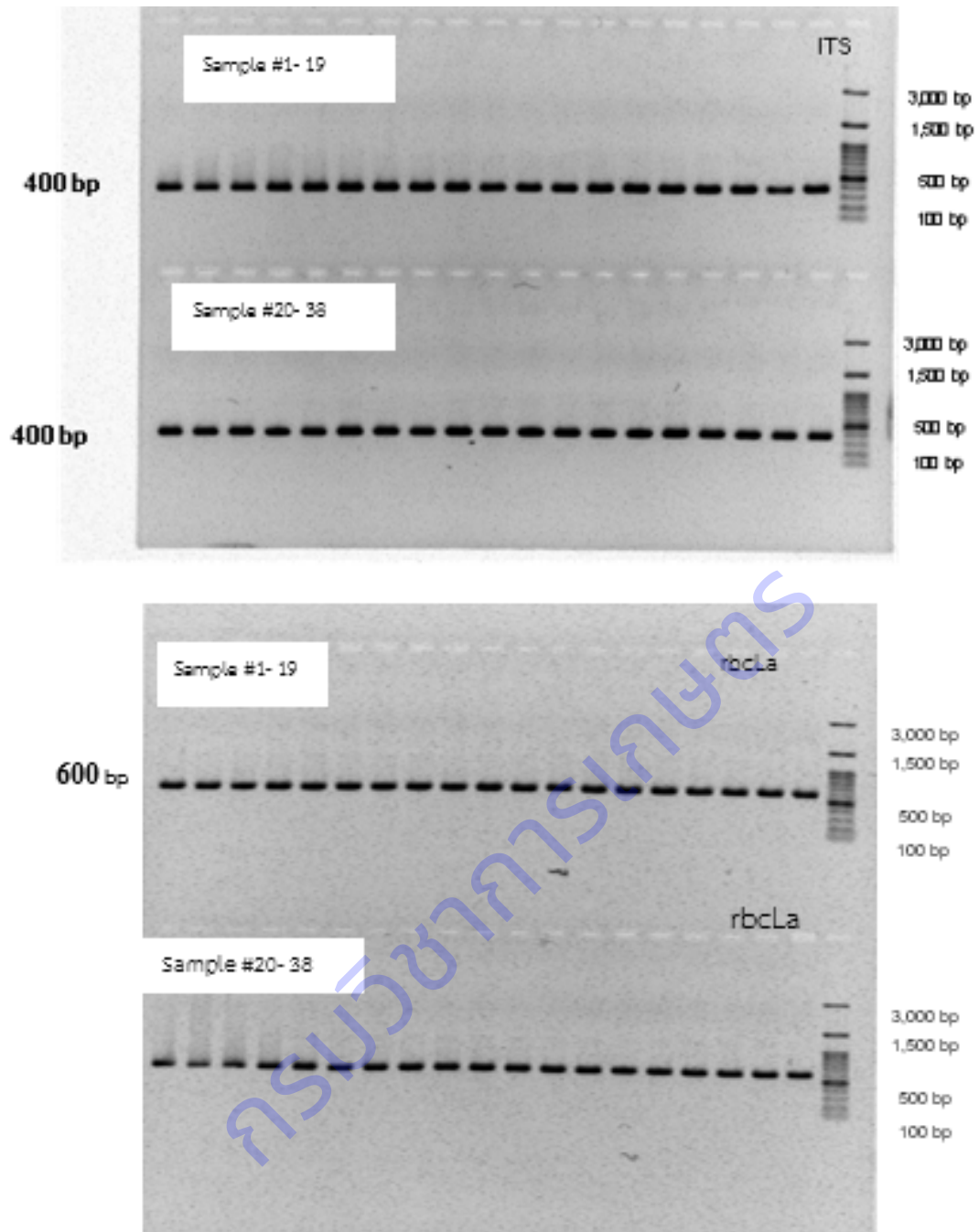
1. บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ (ตารางที่ 2.2.1 และตารางผนวกที่ 1) เก็บตัวอย่างใบ ต้น ดอกของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ จากแปลงปลูกถั่วเหลือง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ โดยเก็บเป็นตัวอย่างแห้งตามหลักมาตรฐานของกลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑสถานฯ สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช ดังตัวอย่างภาพ (ภาพที่ 2.2.1) โดยเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้งหมดจำนวน 40 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้อนุรักษ์ไว้ที่ธนาคารเชื้อพันธุ์กรรมพืช กรมวิชาการเกษตร และในทุกๆ ปีเมล็ดที่เสื่อมสภาพความงอกจะถูกนำกลับมาฟื้นฟูเพื่อผลิตเชื้อพันธุ์กรรมรุ่นใหม่เพื่อนำไปอนุรักษ่อีกครั้ง (ดำเนินการโดย ศวร.เชียงใหม่)



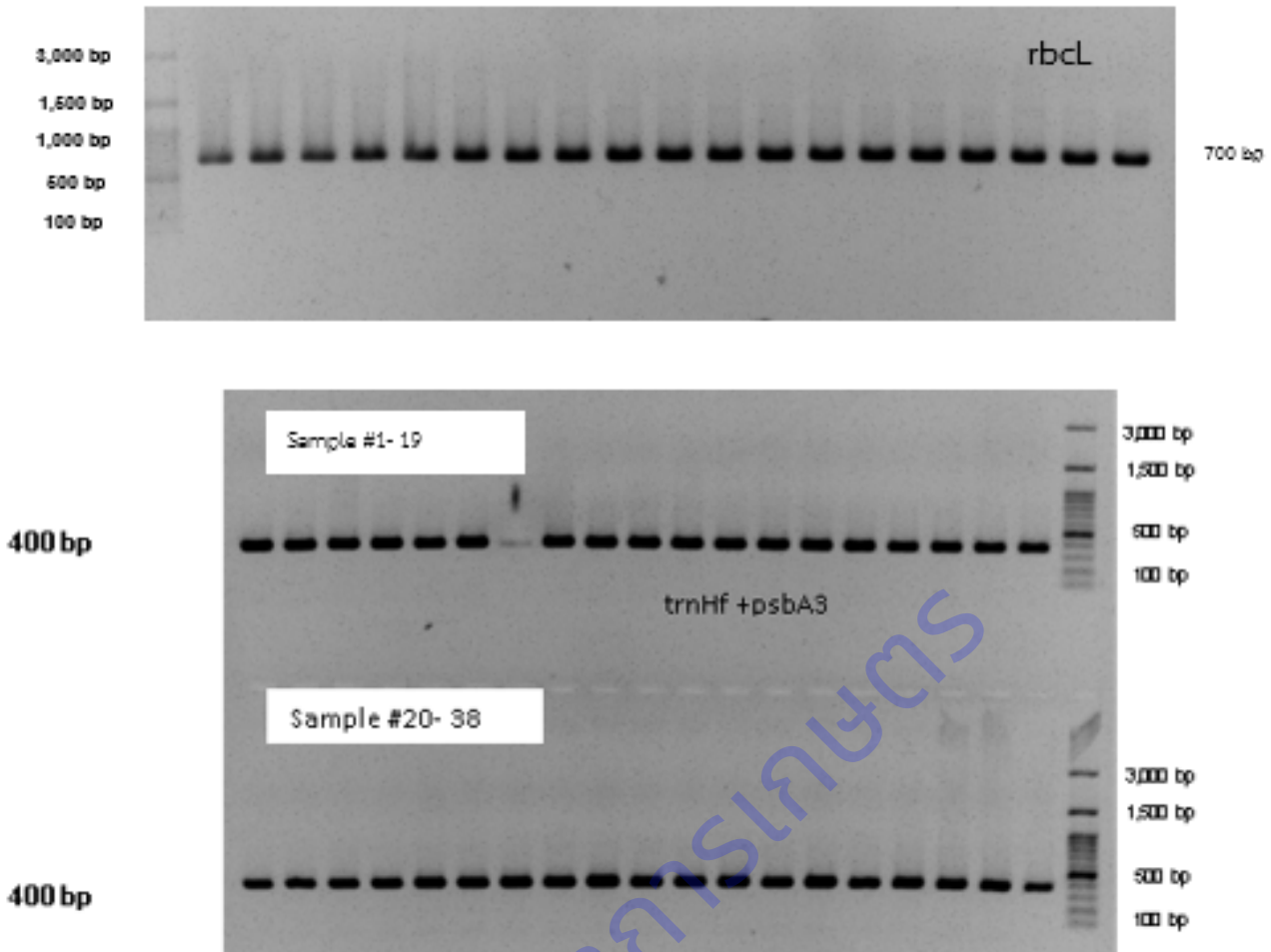
ภาพที่ 2.2.1 ตัวอย่างพรรณไม้ที่เก็บรักษา จำนวน 40 สายพันธุ์/พันธุ์ โดยเก็บรักษา ณ พิพิธภัณฑสถานฯ กรุงเทพฯ

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์สากลของยีน 3 ตำแหน่ง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน ITS, rbcL และ rpoc1 ได้ขนาดประมาณ 400, 1,300 และ 500 คู่เบสตามลำดับ (ภาพที่ 2.2.2)



ภาพที่ 2.2.2 ตัวอย่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน ITS, rbcLa ของถั่วเหลืองสายพันธุ์/พันธุ์ต่าง ๆ ตามรายชื่อในตารางที่ 2.2.1



ภาพที่ 2.2.3 ตัวอย่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ *rbcl* และ *trnHf +psbA3* ของถั่วเหลืองสายพันธุ์/พันธุ์ต่าง ๆ ตามรายชื่อในตารางที่ 2.2.1

3. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิต PCR ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS, *rbclA*, *rbcl*, *rbclL*, *trnHf +psbA3* และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของถั่วเหลืองที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีน ในถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์

4. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลือง

หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองโดยใช้โปรแกรม MEGA-X การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของถั่วเหลือง และใช้ *Glycine Clandestina* เป็น out-group .ในยีน ITS, *rbcl*, , *rpoCL*, *trnHf +psbA3*

ยีน ITS อยู่บนนิวเคลียร์จีโนม (nuclear genome) นั้นเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ในถั่วเหลือง ทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ พบว่ามีขนาดประมาณ 400 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ด้วยโปรแกรม MEGA-X พบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ เท่ากับ 0.00-0.20 และเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (ภาพที่ 2.2.4) พบว่าไม่สามารถจำแนกถั่วเหลืองแต่ละชนิดออก

จากกันได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก กล่าวคือมีรูปแบบการกลายแบบทรานสเวอร์ชัน (transversion) จาก pyrimidine (T) เป็น purine (A) บนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 75 เพียงตำแหน่งเดียว

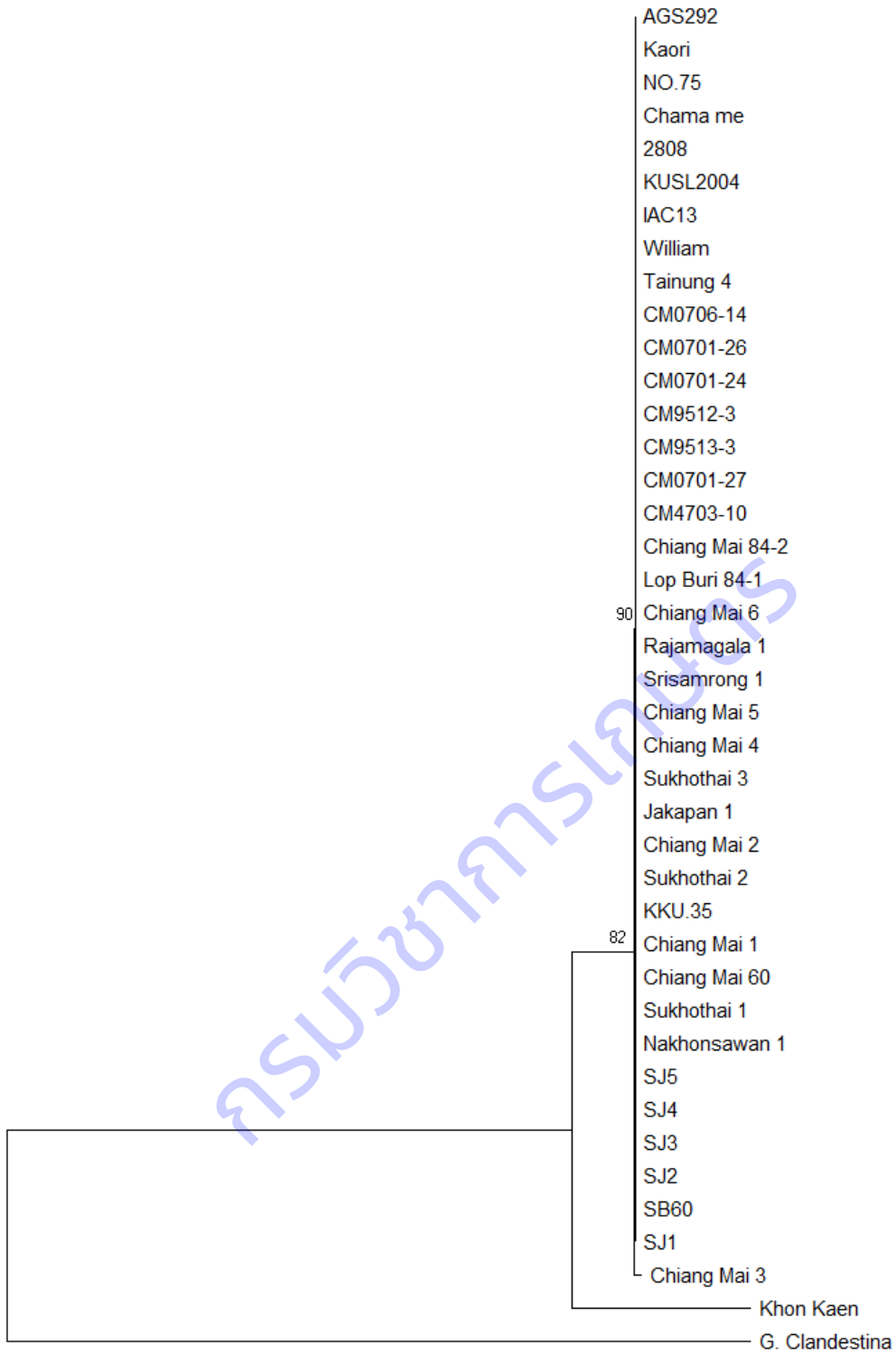
ยีน *rbcL* อยู่บนคลอโรพลาสต์จีโนม (Chloroplast genome) เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ Maximum Likelihood พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนั้น ไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ ออกจากกันทั้งหมด แยกได้เพียง 1 พันธุ์ คือ ‘ขอนแก่น (Khon Kaen)’ (ภาพที่ 2.2.5) โดยมีค่า log likelihood สูงสุดที่ -1321.38 ตามลำดับ และพบลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงในยีน *rbcL* จำนวน 99 ตำแหน่ง มีการกลาย 4 รูปแบบ คือ Indel (insertion/deletion), Purine transition, Pyrimidine transition และ Transversion (ตารางที่ 2.2.3)

ทั้งนี้ถั่วเหลืองพันธุ์ ‘ขอนแก่น’ เป็นพันธุ์ที่ได้จากการรวบรวมจาก อ. พระพุทธบาท จ.สระบุรี เพื่อปรับปรุงถั่วเหลืองให้ได้ผลผลิตสูง โดยเน้นพื้นที่ปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เหมาะในการปลูกฤดูแล้งที่มีการให้น้ำชลประทาน ผลผลิตเฉลี่ย 312 กก./ไร่ และในฤดูแล้งผลผลิตเฉลี่ยสูงถึง 356 กก./ไร่ โดยได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรในปี 2547 (อ้อยทินและรัชณี, 2558)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ ‘ขอนแก่น’ สามารถแยกออกจากถั่วเหลือง 39 พันธุ์/สาย ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์จากการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดในงานปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองผลผลิตสูงในฤดูแล้งต่อไป



ภาพที่ 2.2.4 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS* ซึ่งวิเคราะห์ด้วยการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood



0.10

ที่สร้างจาก

ตารางที่ 2.2.3 รูปแบบของการเปลี่ยนแปลงและตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ที่พบใน ถั่วเหลืองสายพันธุ์/พันธุ์ต่างๆ

Alternation	Nucleotide position
Indel	31, 47, 52, 300, 410, 411, 525
Purine transition	15, 29, 49, 57, 72, 75, 90, 148, 217, 238, 301, 341, 383, 403, 411, 415, 423, 429, 484, 485, 497, 499, 531, 548
Pyrimidine transition	13, 37, 53, 290, 315, 330, 357, 360, 363, 367, 379, 391, 394, 483, 517
Transversion	8, 16, 38, 38, 39, 40, 46, 55, 64, 67, 71, 80, 87, 97, 103, 104, 111, 128, 160, 161, 190, 223, 250, 259, 259, 262, 264, 292, 298, 302, 320, 329, 333, 335, 349, 350, 388, 393, 398, 402, 404, 417, 422, 426, 448, 449, 454, 463, 489, 495, 508, 518, 542

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*

ยีน *rpoC1* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนคลอโรพลาสต์จีโนมเช่นเดียวกับ *rpL* สามารถทำการแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ ‘ขอนแก่น (Khon Kaen)’ ออกจากถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้เพียงพันธุ์เดียว (Figure 5) เช่นเดียวกับยีน *rpL* โดยมีค่า log likelihood สูงสุดที่ -1783.58 ตามลำดับ โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงในยีน *rpoC1* จำนวน 100 ตำแหน่ง มีการกลายรูปแบบ ดังแสดงตาม Table 4

ตารางที่ 2.2.4 รูปแบบของการเปลี่ยนแปลงและตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ที่พบใน ถั่วเหลืองสายพันธุ์/พันธุ์ต่างๆ

Alternation	Nucleotide position
Indel	4, 164, 232, 286, 304, 305, 313, 334
Purine transition	168, 172, 184, 185, 186, 212, 215, 216, 217, 239, 258, 288, 290, 314, 316, 337, 348, 352, 363, 364, 369
Pyrimidine transition	220, 230, 243, 251, 270, 272, 281, 296, 307, 308, 310, 321, 328, 329, 330, 332, 339, 340
Transversion	177, 183, 187, 193, 199, 206, 209, 211, 213, 221, 222, 223, 225, 227, 229, 235, 236, 237, 246, 247, 252, 254, 256, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 267, 268, 273, 273, 277, 278, 279, 282, 292, 294, 299, 300, 315, 323, 336, 345, 347, 350, 365, 372, 375, 376, 377, 386

นอกจากนี้ ยังมีการจัดเก็บเชื้อพันธุกรรมถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ ในรูปแบบของเมล็ดที่ธนาคารเชื้อพันธุกรรม และตัวอย่างพรรณไม้แห้ง ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ รายละเอียดดังตารางที่ 2.2.4

การวิเคราะห์เอกสาร

ภาพที่ 2.2.6 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rpoC1 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

อภิปรายผล (Discussion)

การสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีศักยภาพในการจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานในพืชแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามแม้ว่าพันธุกรรมพืชจะมีผลโดยตรงต่อลักษณะการแสดงออกของพืช (phenotype) สภาพแวดล้อมในการเพาะปลูกก็เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญมีผลต่อการแสดงออกด้วยเช่นกัน การจำแนกพันธุ์พืชด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงบริเวณใดบริเวณหนึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการจำแนกพันธุ์พืช เนื่องจากตำแหน่งนั้นมีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ต่ำ และลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่งนั้นมีขนาดเล็กมาก (genome size) เมื่อเทียบกับขนาดของจีโนมพืช มีผลทำให้ตำแหน่งดังกล่าวไม่สามารถแยกความแตกต่างของพืชในระดับพันธุ์ (Collins and Cruickshank, 2013)

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

1. การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA-X จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในนิวเคลียส ของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ จะเป็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์พบความแตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง ซึ่งมีผลทำให้ไม่สามารถแยกพันธุ์ถั่วเหลืองออกจากกันได้ เนื่องจากขนาดของลำดับเบสที่สั้น เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของจีโนมพืช ดังนั้นการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองนั้นยังไม่มีความเหมาะสม
2. ยีน rbcL และ rpoCL ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ สามารถทำการแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ขอนแก่น ซึ่งเป็นพันธุ์ท้องถิ่นของ จ.สระบุรี ออกจากถั่วเหลืองจำนวน 39 สายพันธุ์/พันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพัฒนาพันธุ์
3. ถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้จัดเก็บเชื้อพันธุกรรม ณ ธนาคารเชื้อพันธุกรรม และตัวอย่างแห้งของถั่วเหลือง ได้จัดเก็บ ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ ของกรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 3

ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชท้องถิ่น Diversity and DNA Barcode of Indigenous Plants

การทดลองที่ 3.1 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์คิลา (Aquifoliaceae) (Diversity and DNA Barcodes of Aquifoliaceae)

กาญจนา พฤษพันธ์อุบลลี แก้วดวงธีรฤทธิ วงศ์วรรตน์
Kanchana Pruesapan Anchalee Kaewdoug Theerawut Wongwarat

คำสำคัญ : การจำแนก, การระบุชื่อ, ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ลักษณะทางสัณฐาน

Key words : classification, DNA barcode, identification, morphological characteristic

บทคัดย่อ

การศึกษาทางอนุกรมวิธานของพืชวงศ์คิลา (Aquifoliaceae) ในประเทศไทยยังมีความคลุมเครือ ข้อมูลทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอในการระบุชื่อหรือจำแนกชนิดพืชออกเป็นกลุ่มเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลความหลากหลายของพืชวงศ์คิลาได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คิลาในประเทศไทย โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS ผลการศึกษาได้ฐานข้อมูลดีเอ็นเอในการระบุยืนยันความหลากหลายของชนิดพืชวงศ์คิลาในประเทศไทยทั้งสิ้น 54 ข้อมูล ประกอบด้วย GenBank accession หมายเลข MT114079–MT114117 ซึ่งเป็นข้อมูลดีเอ็นเอของพืชวงศ์คิลาที่มีการศึกษาเป็นครั้งแรกในประเทศไทยจำนวน 14 ชนิด ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชด้วยข้อมูลดีเอ็นเอช่วยยืนยันความถูกต้องในการระบุชื่อพืชและจำแนกพืชออกเป็นกลุ่มสอดคล้องกับการจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐาน 3 Subgenus (Subg) และ 5 Section (Sect.) คือ 1) Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ประกอบด้วย *Ilex odorata* และ *I. pubifructa*; 2) Subg. *Byronia* มี 3 Sect. คือ Sect. *Byronia* ประกอบด้วย *I. cymosa*, *I. wallichii*, *Ilex* sp. (1) และ *Ilex* sp. (2), Sect. *Lioprinus* ประกอบด้วย *I. umbellulata* และ *Ilex* sp. (3) และ Sect. *Paltoria* ประกอบด้วย *I. triflora*; และ 3) Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* ประกอบด้วย *I. micrococca* นอกจากนี้ พบการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอไม่สอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐาน ประกอบด้วย *I. denticulata* และ *I. embelioides* ที่ให้ผลการแยกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอใกล้ชิดกับชนิดพืชใน Subg. *Byronia* แต่การจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐานจัดพืชทั้งสองชนิดอยู่ภายใต้ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ส่วน *I. ficoidea* ที่ถูกจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐานกลุ่มเดียวกับพืชทั้งสองชนิดดังกล่าวมาข้างต้นกลับให้ผลการแยกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอใกล้ชิดกับพืชใน Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* และพบ *Ilex* sp. (4) จับกลุ่มใกล้ชิดกับชนิดพืชใน Subg. *Aquifolium* ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณนิวเคลียร์ แต่กลับแสดงความใกล้ชิดกับชนิดพืชทั้งใน Subg. *Aquifolium* และ Subg. *Prinos* ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณคลอโรพลาสต์ จึงควรศึกษาทบทวนข้อมูลดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชที่ยังไม่มีความชัดเจนในการจำแนกกลุ่มจากงานวิจัยนี้เพิ่มเติมอีกครั้ง เพื่อให้ข้อมูลความหลากหลายของชนิดพืชวงศ์คิลา มีความสมบูรณ์มากขึ้น

Abstracts

Taxonomic study on Aquifoliaceae in Thailand is still unclear. Morphological information alone is not sufficient for identification or classification of the family diversity. This study aimed to use DNA barcode technique to clarify the species diversity and phylogenetic relationships of Aquifoliaceae in Thailand. The DNA barcodes of *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* and ITS were examined to investigate the placement of Thai species. The study resulted of 54 GenBank accession numbers of MT114079–MT114117 representing 14 species of Aquifoliaceae. The phylogenetic analysis based on DNA data has shown the congruence of species identification and classification based on morphology. Ten *Ilex* species are divided into 3 Subgenera (Subg.) and 5 Sections (Sect): 1) Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* comprises *I. odorata* and *I. pubifructa*; 2) Subg. *Byronia* Sect. *Byronia* comprises *I. cymosa*, *I. wallichii*, *Ilex* sp. (1) and *Ilex* sp. (2), Sect. *Lioprinus* comprises *I. umbellulata* and *Ilex* sp. (3), Sect. *Paltoria* comprises only *I. triflora*; 3) Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* comprises only *I. micrococca*. However, the DNA classification misplaced *I. denticulata* and *I. embelioides* with the member of Subg. *Byronia* and *I. ficoidea* with the member of Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* whereas morphological classification placed them under Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium*. The DNA classification also suggested indistinct placement for *Ilex* sp. (4). The species placed with members of Subg. *Aquifolium* based on nuclear data but placed with both members of Subg. *Aquifolium* and Subg. *Prinos* based on chloroplast data. The indefinable information from the present study should be further revised for a complete research on diversity of Aquifoliaceae in Thailand.

บทนำ (Introduction)

พืชวงศ์ศिला (Aquifoliaceae) จัดเป็นกลุ่มพืชที่มีศักยภาพสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งทางการแพทย์อาหาร สมุนไพร ไม้ประดับ หรือเชื้อเพลิง (Sosef *et al.*, 1998; Chen & Feng, 1999; Gu *et al.*, 2001; Rodd & Bryant, 2007; Gu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2013) มีการกระจายพันธุ์อยู่ในวงจำกัด และมีสมาชิกทั่วโลกมากกว่า 500 ชนิด (Galle, 1997) ในขณะที่ในประเทศไทยกลับมีรายงานพบเพียง 5 ชนิด (Craib, 1931) และไม่ได้มีการบรรยายลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชนิดพืชเหล่านั้น การศึกษาวิจัยความหลากหลายและอนุกรมวิธานของชนิดพืชในวงศ์ศिलाได้เริ่มขึ้นอย่างจริงจังโดย Pruesapan *et al.* (2014) พบจำนวนชนิดของพืชวงศ์ศิลามากถึง 15 ชนิด หลังจากนั้นได้ตีพิมพ์เผยแพร่ *Ilex pubifructa* Pruesapan, S. Andrews & D.A. Simpson เป็นพืชชนิดใหม่ของโลก (Pruesapan *et al.*, 2017) อย่างไรก็ตาม การระบุชนิดพืชสกุล *Ilex* L ในประเทศไทยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความคลุมเครือ เนื่องจากพืชสกุล *Ilex* เป็นพืชแยกเพศอยู่ต่างต้น อีกทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความผันแปรสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษาไม่มีส่วนสืบพันธุ์ที่ครบสมบูรณ์ทั้งดอกเพศผู้ ดอกเพศเมีย พร้อมทั้งผลและเมล็ดแล้ว ทำให้ยากต่อการระบุชื่อพืชของนักอนุกรมวิธาน ลักษณะทั่วไปของพืชในวงศ์นี้มีความใกล้เคียงกันมาก และมักพบความผิดพลาดในการระบุชื่อปรากฏอยู่บนชิ้นตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชต่างๆ เพื่อใช้ศึกษาและเทียบเคียงพรรณไม้เสมอจากการจำแนกและระบุชื่อพืชโดยใช้เฉพาะข้อมูลสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ภายหลังจึงมีการนำเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) มาช่วยในการยืนยันชนิดและแสดงความใกล้ชิดของพืชวงศ์ศिलाอย่างแพร่หลาย โดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอทั้งบริเวณของคลอโรพลาสต์และนิวเคลียร์ร่วมกัน เช่น *rbcl*, *matK*, *trnL-F*, *psbA-trnH*,

ITS, ETS, *gapC* และ *nepGS* (Hao *et al.*, 2013; Setoguchi & Watanabe, 2000; Shi *et al.*, 2016; Yang *et al.* 2018) อีกทั้งยังใช้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดเหล่านี้ในการพิสูจน์ความสับสนในการระบุชื่อพืชที่มีลักษณะสัณฐานคล้ายคลึงกันมากสำเร็จ เช่น *I. formosana* และ *I. tetramera* (Yang *et al.*, 2018) รวมถึงการใช้ตรวจสอบลูกผสมที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ เช่นพบว่า *I. dabieshanensis* เป็นลูกผสมระหว่าง *I. cornuta* กับ *I. latifolia* (Shi *et al.*, 2016) เป็นต้น ซึ่งการได้ทราบต้นกำเนิดของชนิดพืชที่ผสมข้ามเหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานด้านอนุกรมวิธานพืช วิวัฒนาการ และการอนุรักษ์

งานวิจัยนี้ได้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์ศิลาในประเทศไทย และเก็บเป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอในการระบุยืนยันชนิดของพืช และ 2) ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลา (Aquifoliaceae) ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ และเปรียบเทียบความใกล้ชิดของชนิดพืชที่ถูกแบ่งด้วยข้อมูลทางสัณฐาน ซึ่งข้อมูลดีเอ็นเอของชนิดพืชวงศ์ศิลาที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำคัญในการจัดทำบัญชีรายชื่อของพรรณพืชที่ทำการศึกษาจำแนกแล้ว เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการวางแผนการอนุรักษ์ความหลากหลายของพืชและการนำไปใช้ประโยชน์เชิงเศรษฐกิจของประเทศ

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่ศึกษา

ตัวอย่างพืชวงศ์ศิลา (Aquifoliaceae) สกุล *Ilex* L. ที่ใช้วิเคราะห์เป็น Ingroup taxa ประกอบด้วย พืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ จำนวน 19 ตัวอย่าง (taxa) (ตารางที่ 3.1.1) และตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีการเก็บบันทึกไว้บนเว็บไซต์ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ประกอบด้วย ตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณคลอโรพลาสต์ จำนวน 14 taxa โดยคัดเลือกจากชนิดพืชที่มีจีโนมสมบูรณ์ และคัดเลือกศึกษาเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 3 บริเวณ *matK*, *rpl32-trnL* และ *trnL-trnF* และตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนิวเคลียร์ จำนวน 22 taxa (ตารางที่ 3.1.2) โดยพืชวงศ์ศิลาที่คัดเลือกมาเป็น Ingroup taxa เป็นตัวแทนชนิดพืชที่จัดจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดย Galle (1997) ส่วนตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์เป็น Outgroup taxa ของบริเวณคลอโรพลาสต์ ประกอบด้วย *Helwingia himalaica* (Helwingiaceae) และ *Gonocaryum lobbianum* (Cardiopteridaceae) ส่วน Outgroup taxa ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนิวเคลียร์ คือ *Helwingia chinensis* (Helwingiaceae) และ *Phyllonoma ruscifolia* (Phyllonomaceae) ซึ่งเป็นพืชที่มีความใกล้ชิดกับวงศ์ Aquifoliaceae และจัดอยู่ใน Order Aquifolales เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 3.1.2)

2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล

2.1 วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล เช่น Micropipette ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร; Pipet Tips ขนาด 0.5-10, 1-200 และ 1,000 ไมโครลิตร; หลอดไมโครเซนติฟิวส์ ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร, เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง, เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ, เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก, เครื่อง Incubator, เครื่องเขย่า, ชุดเตรียมเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส, เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis), เครื่องเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ Thermal cycler, เครื่องตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอและผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ Gel documentation System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), ชุดโกรังบด ฯลฯ

2.2. สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink Plant Total DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), ไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen), แอลกอฮอล์บริสุทธิ์

2.3. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ได้แก่ ไพรเมอร์บริเวณคลอโรพลาสต์ 3 คู่ คือ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และไพรเมอร์บริเวณนิวเคลียร์ คือ ITS

รายละเอียดของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ แสดงไว้ในตารางที่ 3.1.3, ชุดน้ำยาปฏิกิริยา Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) และน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Life Technologies, USA)

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอและผลผลิตดีเอ็นเอ ได้แก่ ผงอะกาโรส (Agarose powder) เป็นตัวกลางในการแยกสารด้วยประจุไฟฟ้า, 10x TBE Electrophoresis buffer, DNA Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอตัวอย่าง, ชุดสีฟลูออเรสเซนต์สำหรับย้อมดีเอ็นเอ

3. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห่งอ้างอิงงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ในการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห่งอ้างอิงงานวิจัย เช่น กรรไกรตัดกิ่ง กระจกหน้าหนังสือพิมพ์ แผงอัดพรรณไม้และเชือกมัด กระจกชุกฟูก ฟองน้ำ ถังพลาสติก ป้ายชื่อ สมุดบันทึก ดินสอดำ 2B ตู้อบแห้งพรรณไม้ อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส กระจกติดผนังพรรณไม้แห้ง เข็ม-ด้ายเย็บพรรณไม้ กระจกฉลากรายละเอียดพรรณไม้ Hand-lens/กล้อง stereo microscope

3.2. สารเคมีในการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห่งอ้างอิง ได้แก่ น้ำยารักษาสภาพพรรณไม้ ประกอบด้วย แอลกอฮอล์ 70%, สารเมอร์คิวรีคลอไรด์ (Mercuric Chloride), ฟีนอล (Phenol)

วิธีการ

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชและการเก็บรักษา

1.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอ

เก็บรวบรวมชิ้นส่วนของใบพืชวงศ์สิลาเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอจาก 2 แหล่ง คือ 1) เก็บรวบรวมตัวอย่างพืชในภาคสนามจากพื้นที่หลายจังหวัดในประเทศไทย ได้ตัวอย่างพืช 13 taxa (ตารางที่ 3.1.1) ชิ้นส่วนใบของแต่ละตัวอย่างเก็บแยกไว้ในถุงพลาสติกแบบเปิดปิดได้และใส่ซิลิกาเจล (Silica gel) ไว้เพื่อช่วยดูดซับความชื้นและรักษาสภาพตัวอย่างและ 2) ตัดชิ้นใบจากตัวอย่างพรรณไม้แห้งที่เก็บรักษาเป็นพรรณไม้อ้างอิงไว้ในหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (The Forest Herbarium, BKF) โดยให้มีขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร จำนวน 6 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.1.1)

1.2 การเก็บรักษาตัวอย่างเพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงงานวิจัย

นำพืชวงศ์สิลาที่เก็บรวบรวมได้จากภาคสนามทั้ง 13 ตัวอย่าง จัดทำเป็นตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (Herbarium specimen) ตามหลักการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห่งอ้างอิงงานวิจัย ตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บรวบรวมชิ้นตัวอย่างเหมือน ติดป้ายหมายเลขพันธุ์ บันทึกข้อมูลพืช อัตราและอบแห้ง อ่างน้ำยารักษาสภาพพรรณไม้ ติดผนังพรรณไม้ ติดฉลากรายละเอียดพืช จนถึงขั้นตอนลงทะเบียนเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืช ได้ดำเนินการตามกรรมวิธีตามหนังสือคู่มือ The Herbarium Handbook (Bridson & Forman, 1998) และลงทะเบียนเก็บรักษาไว้เป็นตัวอย่างพรรณไม้แห่งอ้างอิงงานวิจัยในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร (Bangkok Herbarium, BK)

2. การสกัดดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนใบของพืชวงศ์สิลามาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink Plant Total DNA Purification Kit ตามกรรมวิธีของบริษัท แล้วตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอของพืชวงศ์สิลาที่สกัดได้ด้วยวิธี Electrophoresis ใน Agarose gel 1.0% ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 15 นาที ในสารละลาย 0.5X TBE บันทึกภาพดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง Gel documentation System และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของพืชวงศ์สิลาทั้ง 19 ตัวอย่าง เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 ng แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะบริเวณ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS โดยใช้ชุดน้ำยาปฏิกิริยา Phire Plant Direct PCR Master Mix ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μ l เติมสารเคมีในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังแสดงในตารางที่ 3.1.4 และนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ โดยใช้สภาวะเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 3.1.5 จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Electrophoresis ใน Agarose gel 1.5% ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 15 นาที ในสารละลาย 0.5X TBE บันทึกภาพดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง Gel documentation System

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบริเวณ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบความปนเปื้อนด้วยโปรแกรม BlastN บนฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) แล้วตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit 7 (Hall, 1999) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์สิลาที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้ไปจัดเรียง (Alignment) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์สิลาซึ่งเป็น Ingroup taxa และ Outgroup taxa (ตารางที่ 3.1.2) ที่ดาวน์โหลดจากฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม ClustalW (Thomson *et al.*, 1994) ด้วยวิธี Multiple alignment และตรวจสอบความถูกต้องของการจัดเรียงด้วยตาเปล่าอีกครั้ง

5. การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งจำเพาะบริเวณ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS ในเมตริกซ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) ด้วยวิธี Maximum Parsimony (MP) โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates (Felsenstein, 1985), Tree-Bisection-Regrafting (TBR) ของแต่ละซ้ำประกอบด้วย 10 replicates random addition of sequences (Nei and Kumar, 2000) และไม่เกิน 10 trees/replicate ถูกเก็บไว้ ประเมินค่า Bootstrap Percentages (BPs) ที่ 85-100% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับสูง, 75-84% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับกลาง, 50-74% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับต่ำ และ <50% เป็นค่าที่ไม่สนับสนุนความเชื่อมั่น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณคลอโรพลาสต์และบริเวณนิวเคลียร์ไม่นำมาวิเคราะห์ร่วมในเมตริกซ์เดียวกันเพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เนื่องจากใช้ตัวแทนชนิดพืชจากกลุ่มที่มีการจำแนกไว้แตกต่างกัน เพื่อเป็นการเปรียบเทียบในยืนยันหรือสนับสนุนหรือชี้ให้เห็นความแตกต่างของความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของตัวอย่างพืชวงศ์สิลาที่ได้จากดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากทั้งสองบริเวณ โดยการอภิปรายความสัมพันธ์ได้พิจารณาเฉพาะจากกลุ่มที่มีตัวแทนพืชวงศ์สิลาที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ปรากฏอยู่เป็นหลัก แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์สิลาที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้เก็บบันทึกไว้ในระบบฐานข้อมูลของ NCBI ได้จำนวน 54 หมายเลข คือ GenBank accession numbers MT114079 – MT114117 (ตารางที่ 3.1.1)

เวลาและสถานที่: เดือนตุลาคม 2560 ถึง กันยายน 2562 ณ สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและอภิปราย (Results and discussion)

1) ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและฐานข้อมูลดีเอ็นเอในการระบุยีนชนิดพืชวงศ์คิลลา (Aquifoliaceae) ในประเทศไทย

1.1) ดีเอ็นเอบาร์โค้ดชนิดพืชวงศ์คิลลา

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของพืชวงศ์คิลลาด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้มีจำนวน 19 ตัวอย่าง พบว่า *matK* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 14 ตัวอย่าง *rpl32-trnL* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 15 ตัวอย่าง *trnL-trnF* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียง 10 ตัวอย่าง และ ITS สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 15 ตัวอย่างดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* และ ITS มีประสิทธิภาพสูงสุด คิดเป็น 78.9% (15 จาก 19 ตัวอย่าง) รองลงมาคือ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* คิดเป็น 73.7% (14 จาก 19 ตัวอย่าง) และดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF* มีประสิทธิภาพต่ำสุด คิดเป็น 52.6% (10 จาก 19 ตัวอย่าง) อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจสอบสภาพตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ พบว่าตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างที่ตัดขึ้นส่วนใบมาจากตัวอย่างพรรณไม้แห้งที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช ได้แก่ *I. denticulata*, *I. embelioides*, *I. ficoidea*, *I. odorata*, *I. umbellulata* (1) และ *Ilex* sp. (4) ซึ่งดีเอ็นเอของตัวอย่างเหล่านี้ อาจมีสภาพถูกทำลายหรือมีตัวยับยั้งการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากกระบวนการอบแห้งตัวอย่างและการรักษาสภาพตัวอย่างด้วยน้ำยารักษาสภาพพรรณไม้ และเมื่อพิจารณาความยาวของแถบดีเอ็นเอของดีเอ็นเอบาร์โค้ดทั้ง 4 บริเวณ พบว่ามีความยาวมาก ดังนั้นดีเอ็นเอที่มีสภาพถูกทำลายจึงไม่อาจทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการได้หรือได้ไม่สมบูรณ์ ส่วนตัวอย่างที่เก็บรักษาสภาพใบสดไว้ในสารดูดความชื้นซิลิกาเจล มีดีเอ็นเอที่ยังคงสภาพสมบูรณ์ แต่ก็ยังมีบางตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF* คือ *I. umbellulata* (2) และ *Ilex* sp. (1), ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะเริ่มต้นของปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่ไม่เหมาะสม

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะของดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวที่สุด และมีขนาดแตกต่างกันไปตั้งแต่ 928-945 คู่เบส ซึ่งพืชวงศ์คิลลาที่มีขนาดนิวคลีโอไทด์ยาวที่สุด คือ *I. triflora* มีขนาด 945 คู่เบส และพืชวงศ์คิลลาที่มีขนาดนิวคลีโอไทด์สั้นที่สุด คือ *I. umbellulata* (2), *I. wallichii* (1) และ *I. wallichii* (2) มีขนาด 929 คู่เบส ยกเว้น *I. embelioides* ที่สามารถตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียงบางส่วน มีขนาด 602 คู่เบส เนื่องจากสภาพดีเอ็นเอที่เสียสภาพ และ *Ilex* sp. (1) ที่ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียง 770 คู่เบส เนื่องจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ผลโครมาโตแกรมช่วงปลายที่ไม่สามารถอ่านผลกราฟได้; ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดยาวรองลงมาจากดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* โดยมีขนาดตั้งแต่ 929-936 คู่เบส โดย *I. micrococca* (1) และ *I. micrococca* (2) มีขนาดยาวที่สุดคือ 936 คู่เบส และ *I. pubifruca* มีขนาดสั้นที่สุดคือ 929 คู่เบส ส่วนตัวอย่างอื่นๆ ที่เหลือมีขนาดนิวคลีโอไทด์เท่ากันคือ 930 คู่เบส; ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวเป็นลำดับที่สามคือ ที่มีขนาด 855 คู่เบส; และดีเอ็นเอบาร์โค้ด ITS ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดตั้งแต่ 714-737 คู่เบส โดย *Ilex* sp. (1) มีขนาดยาวที่สุดคือ 737 คู่เบส และ *I. pubifruca* มีขนาดสั้นที่สุดคือ 714 คู่เบส

เมื่อวิเคราะห์ตัวแทนพืชวงศ์คิลลาของแต่ละบริเวณดีเอ็นเอที่นำมาใช้รวมเป็น Ingroups taxa ทั้งหมด พบตัวแทนของ *matK* จำนวน 23 taxa, *rpl32-trnL* จำนวน 24 taxa, *trnL-trnF* จำนวน 20 taxa และ ITS จำนวน 28 taxa (ตารางที่ 3.1.6)

1.2 ฐานข้อมูลดีเอ็นเอในการระบุยีนชนิดพืชวงศ์คิลลา (Aquifoliaceae) ในประเทศไทย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์คิลลาในประเทศไทยที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้ จากตัวอย่างทั้งหมด 19 taxa ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณคลอโรพลาสต์ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และบริเวณนิวเคลียร์ ITS ได้เก็บบันทึกและลงทะเบียนเก็บรักษาไว้บนระบบออนไลน์ของ NCBI รวมทั้งสิ้น 54 หมายเลข GenBank accession ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* จำนวน 14 accession ได้แก่ GenBank

accession number MT114104–MT114117 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* จำนวน 15 accession ได้แก่ GenBank accession number MT114089–MT114103 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF* จำนวน 10 accession ได้แก่ GenBank accession number MT114079–MT114088 และ ลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอบาร์โค้ด ITS จำนวน 15 accession ได้แก่ GenBank accession number MT114118–MT114132 ซึ่งฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์ชิลลาที่ลงทะเบียนกับรักษาไว้ทั้งหมด จากงานวิจัยนี้ จัดเป็นชุดข้อมูลดีเอ็นเอของพืชวงศ์ชิลลาที่มีการศึกษาเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งถือเป็นส่วนหนึ่งของพืชวงศ์ชิลลาที่กระจายพันธุ์อยู่ในประเทศไทย (Pruesapan *et al.*, 2014, 2017) เมื่อเปรียบเทียบกับ ความหลากหลายของชนิดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีมากถึง 120 ชนิด (Andrews, 2002) นั้นแสดงว่า ความหลากหลายของชนิดพืชวงศ์นี้ในประเทศไทยยังตกสำรวจอยู่อีกมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ ประเทศในภูมิภาค Indo-China ที่มีรายงานมากถึง 37 ชนิด (Tardieu-Blot, 1948) แถบ Sabah และ Salawak มี 30 ชนิด (Andrews, 1998; 2002) แถบ Malay Peninsula 17 ชนิด (Ridley, 1922) เป็นต้น

ตารางที่ 3.1.1 ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงและดีเอ็นเออ้างอิงของพืชวงศ์ชิลลา (Aquifoliaceae) ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้

No.	Species	Specimen Voucher	GenBank Accession number			
			<i>matK</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>trnL-trnF</i>	nrITS
1	<i>Ilex cymosa</i> Blume (1)	Rueangruea SR 82 (BKF)	MT114104	MT114089	MT114079	MT114118
2	<i>Ilex cymosa</i> Blume (2)	Pruesapan KP2018-1 (BK)	MT114105	MT114090	MT114080	MT114119
3	<i>Ilex cymosa</i> Blume (3)	Pruesapan KP2018-27 (BK)	NA	NA	NA	MT114120
4	<i>Ilex denticulata</i> Wall. ex. Wight	Gardner & Tippayasri ST 1769 (BKF)	NA	NA	NA	MT114121
5	<i>Ilex embelioides</i> Hook.f.	Takahashi & Tamura T-63342 (BKF)	NA	MT114091	NA	NA
6	<i>Ilex ficoidea</i> Hemsl.	Fukuoka T-63801 (BKF)	NA	NA	NA	MT114123
7	<i>Ilex micrococca</i> Maxim. (1)	Meewasana <i>et al.</i> KP2018-24 (BK)	MT114107	MT114092	MT114081	MT114124
8	<i>Ilex micrococca</i> Maxim. (2)	Meewasana <i>et al.</i> KP2018-25 (BK)	MT114108	MT114093	MT114082	MT114125
9	<i>Ilex odorata</i> Buch-Ham. ex D. Don	Pooma 1532 (BKF)	NA	MT114094	NA	NA
10	<i>Ilex pubifructa</i> Pruesapan, S. Andrews & D.A. Simpson	Pruesapan KP2017-1 (BK)	MT114109	MT114095	MT114083	MT114126
11	<i>Ilex</i> sp. (1)	KaeoKoon <i>et al.</i> KP2018-30 (BK)	MT114115	MT114101	NA	MT114131
12	<i>Ilex</i> sp. (2)	KaeoKoon <i>et al.</i> KP2018-31 (BK)	MT114116	MT114102	MT114087	NA

No.	Species	Specimen Voucher	GenBank Accession number			
			<i>matK</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>trnL-trnF</i>	nrITS
13	<i>Ilex</i> sp. (3)	Khiriwong & Pruesapan KP2018-32 (BK)	MT114117	MT114103	MT114088	MT114132
14	<i>Ilex</i> sp. (4)	Suddee <i>et al.</i> 4392 (BKF)	MT114106	NA	NA	MT114122
15	<i>Ilex triflora</i> Blume	Suddee 5316 (BKF)	MT114110	MT114096	MT114084	MT114127
16	<i>Ilex umbellulata</i> (Wall.) Loes. (1)	Pruesapan 2015-1 (BK)	MT114111	MT114097	NA	MT114128
17	<i>Ilex umbellulata</i> (Wall.) Loes. (2)	Kertsawang 4621 (BK)	MT114112	MT114098	NA	MT114129
18	<i>Ilex wallichii</i> Hook.f. (1)	Pruesapan KP2018-13 (BK)	MT114113	MT114099	MT114085	NA
19	<i>Ilex wallichii</i> Hook.f. (2)	Pruesapan KP2018-16 (BK)	MT114114	MT114100	MT114086	MT114130

ตารางที่ 3.1.2 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดาวโหลดจากฐานข้อมูล GenBank, NCBI ของยีนบริเวณคลอโรพลาสต์ (*matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*) และบริเวณนิวเคลียร์ (ITS) สำหรับวิเคราะห์ความใกล้ชิดของพืชวงศ์ตีนเป็ด

No.	Species	Chloroplast (<i>matK</i> , <i>rpl32-trnL</i> , <i>trnL-trnF</i>)	Nuclear(ITS)
		GenBank Accession number	GenBank Accession number
1	<i>Ilex asprella</i> (Hook. & Arn.) Champ. ex Benth.	MK834323	-
2	<i>Ilex corallina</i> Franch. var. <i>aberrans</i> Hand.-Mazz.	-	KF255675
3	<i>Ilex cornuta</i> Lindl. & Paxton	MK335536	-
4	<i>Ilex delavayi</i> Franch.	KX426470	-
5	<i>Ilex dumosa</i> Reissek	KP016927	-
6	<i>Ilex ficoidea</i> Hemsl.	-	KF255665
7	<i>Ilex ficoidea</i> Hemsl.	-	KY417935
8	<i>Ilex hirsuta</i> C.J. Tseng ex S.K. Chen & Y.X. Feng	-	KF255668
9	<i>Ilex integra</i> Thunb.	MK335537	KY417948

No.	Species	Chloroplast (<i>matK</i> , <i>rpl32-trnL</i> , <i>trnL-trnF</i>)	Nuclear(ITS)
		GenBank Accession number	GenBank Accession number
10	<i>Ilex latifolia</i> Thunb.	KX426465	-
11	<i>Ilex kaushue</i> S.Y. Hu	-	KY417941
12	<i>Ilex kwangtungensis</i> Merr.	-	KY417943
13	<i>Ilex latifolia</i> Thunb.	-	KY417933
14	<i>Ilex lihuaensis</i> T.R. Dudley	-	KF255674
15	<i>Ilex longicaudata</i> H.F. Comber	-	KY417934
16	<i>Ilex macrocarpa</i> Oliv.	-	KF255671
17	<i>Ilex micrococca</i> Maxim.	MN830251	AH007160
18	<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	KP016928	-
19	<i>Ilex polyneura</i> (Hand.-Mazz.) S.Y. Hu	KX426468	KY417937
20	<i>Ilex pubescens</i> Hook. & Arn.	KX426467	KF255672
21	<i>Ilex rotunda</i> Thunb.	-	KY417951
22	<i>Ilex suaveolens</i> (H. Lév.) Loes.	MN830249	-
23	<i>Ilex szechwanensis</i> Loes.	KX426466	-
24	<i>Ilex triflora</i> Blume	-	KY417932
25	<i>Ilex tsoii</i> Merr. & Chun	-	FJ394718
26	<i>Ilex venulosa</i> Hook. f.	-	KY417939
27	<i>Ilex viridis</i> Champ. ex Benth.	MN830250	KY417946
28	<i>Ilex wallichii</i> Hook.f.	-	FJ394720
29	<i>Ilex wilsonii</i> Loes.	KX426471	FJ394722
30	<i>Ilex zygophylla</i> Merr.	-	FJ394728

No.	Species	Chloroplast (<i>matK</i> , <i>rpl32-trnL</i> , <i>trnL-trnF</i>)	Nuclear(ITS)
		GenBank Accession number	GenBank Accession number
31	<i>Helwingia chinensis</i> Batalin	-	AF200594
32	<i>Helwingia himalaica</i> Hook. f. & Thomson ex C.B. Clarke	KX434807	-
33	<i>Gonocaryum lobbianum</i> (Miers) Kurz	MK390345	-
34	<i>Phyllonoma ruscifolia</i> Willd. ex Roem. & Schult.	-	AJ492650

ตารางที่ 3.1.3 ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

Barcode	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
<i>matK</i>	3F_KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGA	Ki-Joong Kim, unpublished
	1R_KIM	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	Ki-Joong Kim, unpublished
rpl32-trnL	rpl32-F	CAGTTCCAAAAAACGTACTTC	Shaw <i>et al.</i> , 2007
	trnL	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	Shaw <i>et al.</i> , 2007
<i>trnL-trnF</i>	c	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
	f	ATITGAACTGGTGACACGAG	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
ITS	ITS5	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990

ตารางที่ 3.1.4 องค์ประกอบของสารเคมีในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Component	50 µl rxn	Final concentration
2X Phire Plant Direct PCR Master Mix	25 µl	1X
10 µM Forward Primer	2.5 µl	0.5 µM
10 µM Reverse Primer	2.5 µl	0.5 µM
DNA dilution	1-1.25 µl	
H ₂ O	18.75 µl	

ตารางที่ 3.1.5 สภาวะเริ่มต้นของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Cycle Step	Temperature	Time	Cycle(s)
Initial Denaturation	98°C	5 minutes	1
Denaturation	98°C	10 seconds	35
Annealing	54°C	10 seconds	
Extension	72°C	20 seconds	
Final extension	72°C	1 minutes	1

Cycle Step	Temperature	Time	Cycle(s)
Hold	4°C	∞	

2) ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนเป็ดด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์ตีนเป็ดทั้ง 5 เมตริกซ์ คือ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*, ITS และ Combined Chloroplast (*matK+rpl32-trnL+trnL-trnF*) พบมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จัดเรียง 855, 1104, 1038, 791 และ 2997 คู่เบส ตามลำดับ แสดงคุณสมบัติของการจัดเรียงในแต่ละเมตริกซ์ พร้อมแสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลที่แยกวิเคราะห์ของบริเวณคลอโรพลาสต์และบริเวณนิวเคลียร์ และข้อมูลร่วมวิเคราะห์ของดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์แบบ Maximum Parsimony ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.1.6 ให้ผลความสัมพันธ์ของชนิดพืชวงศ์ตีนเป็ด 5 Cladogram (ภาพที่ 3.1.1 – 3.1.5) แสดงโครงสร้าง (Topology) การแยกกลุ่มของชนิดพืชวงศ์ตีนเป็ดสอดคล้องกันเป็นส่วนใหญ่ ผลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ Cladogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกันของดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ (ภาพที่ 3.1.4) และ Cladogram ข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียร์ (ภาพที่ 3.1.5) นำมาใช้ในการอภิปรายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชนิดพืชภายในวงศ์ตีนเป็ด และค่า BPs (%BS) นำมาใช้สนับสนุนความเชื่อมั่นของความสัมพันธ์ภายในกลุ่มพืช โดยการอภิปรายความสัมพันธ์ของชนิดพืชยึดถือตามการจำแนกกลุ่มของพืชวงศ์ตีนเป็ดตามหลักการจัดจำแนกของ Galle (1997) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.1.7

ตารางที่ 3.1.6 แสดงคุณสมบัติของข้อมูลการจัดเรียงนิวคลีโอไทด์และผลการวิเคราะห์แบบ Maximum Parsimony

Sequence characteristics	<i>matK</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>trnL-trnF</i>	Combined Chloroplast	ITS
No. of accessions (ingroups)	30 (28)	31 (29)	26 (24)	32 (30)	39 (37)
No. of species (ingroups)	25 (23)	26 (24)	22 (20)	27 (25)	31 (28)
Length of sequences (bp)	855	928-945	929-936	Not determined	714-737
Length of alignment (bp)	855	1104	1038	2997	791
No. of variable characters	113	275	132	520	398
No. of potential informative sites (%)	28 (3.3)	106 (9.6)	35 (3.4)	169 (5.6)	182 (23)
Length of trees	120	316	149	589	764
Consistency Index (CI), for parsimony informative sites	0.903	0.908	0.907	0.889	0.566
Consistency Index (CI), for all sites	0.975	0.962	0.973	0.961	0.713
Retention Index (RI)	0.947	0.919	0.934	0.940	0.755

2.1. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนเป็ดด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์

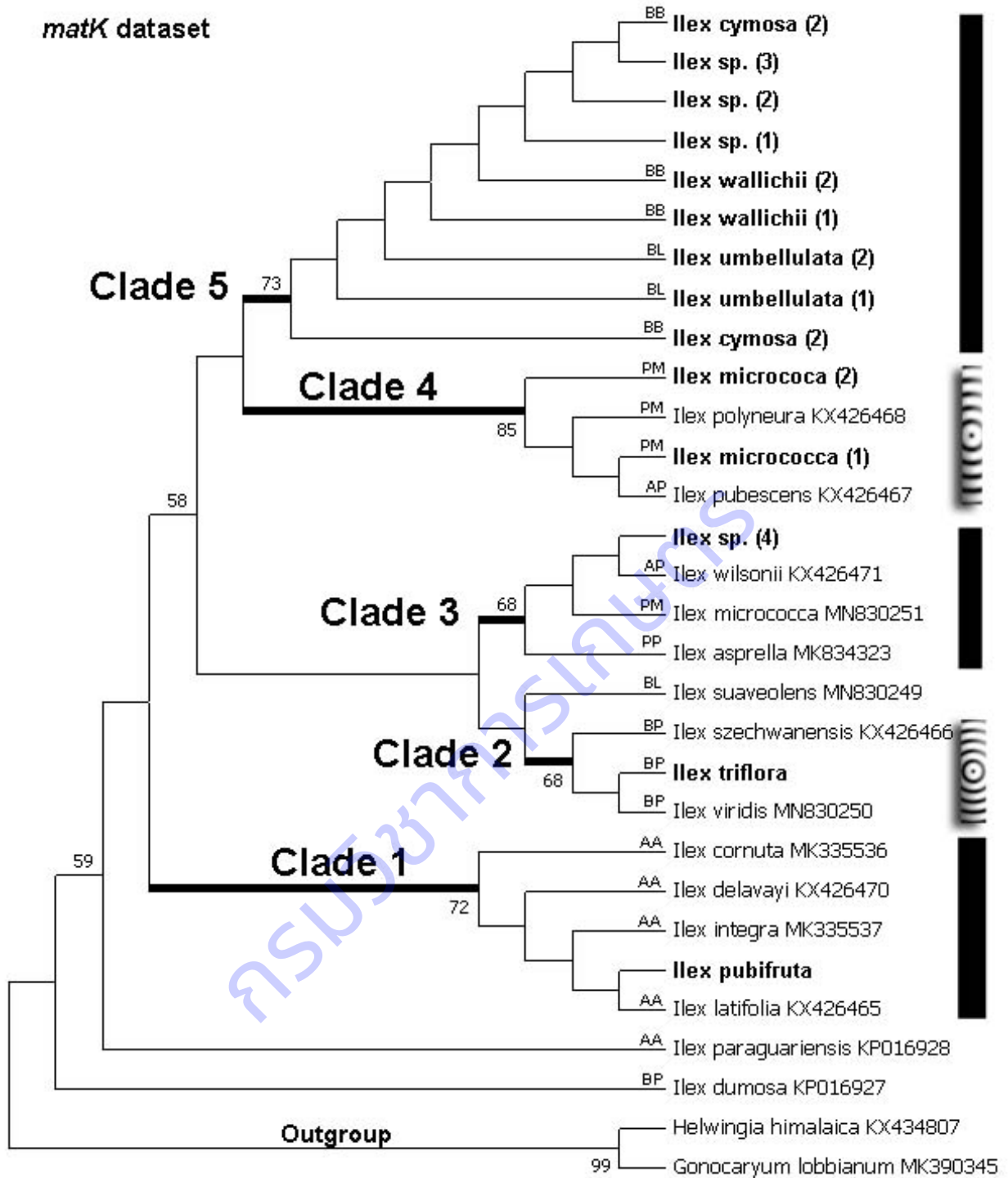
ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนเป็ดด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* (ภาพที่ 3.1.1), *rpl32-trnL* (ภาพที่ 3.1.2) และ *trnL-trnF* (ภาพที่ 3.1.3) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum Parsimony แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของชนิดพืชที่ศึกษามีความสอดคล้องกันเป็นส่วนใหญ่ โดยผลการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของ *rpl32-trnL* แสดงผลการแยกกลุ่มชนิดพืชได้ชัดเจนกว่า *matK* และ *trnL-trnF* ซึ่งสอดคล้องกับค่า

Parsimony informative (ตารางที่ 3.1. 6) ของ *rpl32-trnL* (9.6%) ที่มีจำนวนสูงกว่า *matK* (3.3%) และ *trnL-trnF* (3.4%) อย่างไรก็ตาม ผลการแยกกลุ่มชนิดพืชของ *matK* กลับให้ผลชัดเจนกว่า *trnL-trnF* แม้จะมีค่า Parsimony informative สูงกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจำนวนชนิดของพืชวงศ์ลีลา (Ingroups) ที่ใช้เป็นตัวแทนการวิเคราะห์ของ *matK* (23 species) มีมากกว่าตัวแทน Ingroups ของ *trnL-trnF* (20 species) ซึ่งผลการวิเคราะห์พบตัวอย่างพืชวงศ์ลีลาที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ปรากฏบน Cladogram ที่มีค่าความเชื่อมั่นสนับสนุนการแยกกลุ่มของ *matK* ปรากฏอยู่ใน 5 Clade (ภาพที่ 3.1.1) ส่วน *rpl32-trnL* ปรากฏอยู่ใน 4 Clade และ 2 Subclade (ภาพที่ 3.1.2) และ *trnL-trnF* ปรากฏอยู่ใน 2 Clade (ภาพที่ 3.1.3) โดยพบว่าการจับกลุ่มของชนิดพืชใน Cladogram ของ *matK*, *rpl32-trnL* และ *trnL-trnF* ไม่มีความขัดแย้งกัน จึงได้นำมาวิเคราะห์ร่วมกันเป็นข้อมูลรวมบริเวณคลอโรพลาสต์ (*matK+rpl32-trnL+trnL-trnF*) ให้ผล Cladogram ที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์แยกของแต่ละดีเอ็นเอบาร์โค้ด แต่การแยกกลุ่มมีความชัดเจนมากกว่า (ภาพที่ 3.1.4)

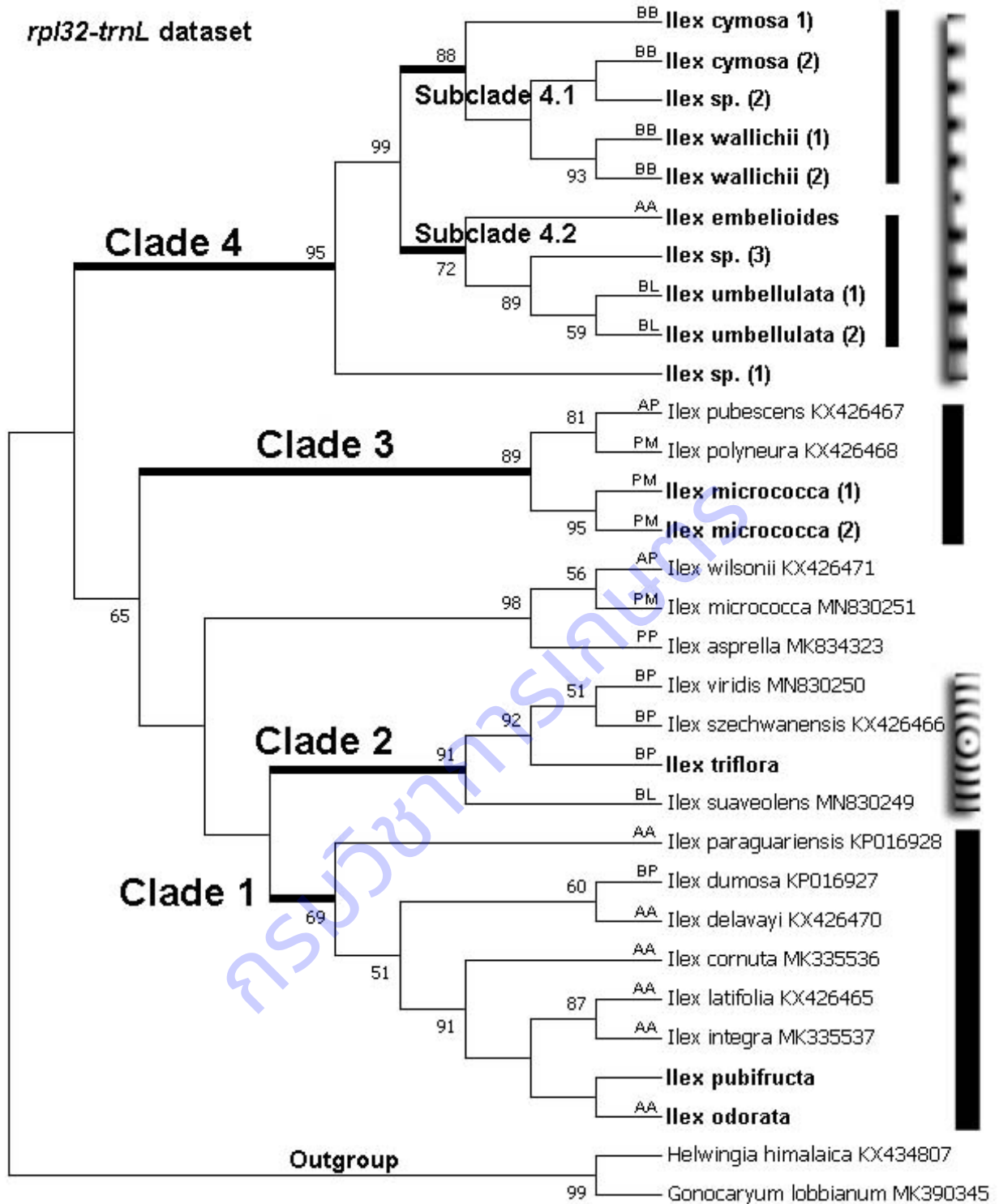
ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ลีลาด้วยข้อมูลร่วมกันของดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ 3 บริเวณ (*matK+rpl32-trnL+trnL-trnF*) พบการจับกลุ่มของตัวอย่างพืชแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มหลักๆ ดังนี้: Clade 1 จับกลุ่มกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นต่ำที่ 58% BS ประกอบด้วยสมาชิกใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ยกเว้น *I. dumosa* ที่ถูกจำแนกไว้ต่างกลุ่ม คือ Subg. *Byronia* Sect. *Paltoria* โดยพบว่า *I. odorata* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ ยืนยันการรวมกลุ่มตามที่ถูกจัดจำแนกไว้ และ *I. pubifruca* ที่ยังไม่ได้ถูกจำแนกกลุ่มก็แสดงความใกล้เคียงอย่างชัดเจนกับสมาชิกใน Sect. *Aquifolium* (*I. cornuta* MK335536, *I. integra* MK335537 และ *I. latifolia* KX426465) ด้วยค่าความเชื่อมั่นสูงถึง 95% BS; Clade 2 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 86% BS ประกอบด้วยสมาชิกใน Subg. *Prinos* Sect. *Prinoides* (*I. asprella* MK834323) และ Sect. *Micrococca* (*I. micrococca* MN830251), Subg. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* (*I. wilsonii* KX426471) และ *Ilex* sp. (4) ซึ่งเป็นชนิดพืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้และยังไม่ถูกจัดกลุ่ม; Clade 3 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงถึง 94% BS ประกอบด้วยชนิดพืชที่ถูกจำแนกไว้ใน Subg. *Byronia* ทั้งหมด โดย *I. triflora* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ ยืนยันการการเป็นสมาชิกภายใน Sect. *Paltoria* เช่นเดียวกับสมาชิกตัวอื่นๆ (*I. szechwanensis* KX426466 และ *I. viridis* MN830250) ด้วยความเชื่อมั่นสูงถึง 98% BS และยืนยันความสัมพันธ์กับสมาชิกใน Sect. *Lioprinus* (*I. suaveolens* MN830249) ด้วยความเชื่อมั่นที่สูงเช่นกันถึง 94% BS; Clade 4 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงถึง 99% BS ประกอบด้วย *Ilex micrococca* (1) และ *Ilex micrococca* (2) ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ และ *I. polyneura* KX426465 โดยยืนยันการจำแนกไว้ด้วยกันใน Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* และยังพบว่าสมาชิกใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* (*I. pubescens* KX426467) จับกลุ่มกับ *I. polyneura* KX426465 ด้วยความเชื่อมั่นปานกลางที่ 82% BS; Clade 5 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงถึง 95% BS ประกอบด้วยชนิดพืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ทั้งหมด ซึ่งมีสมาชิกที่มีการจำแนกกลุ่มแล้วส่วนใหญ่จัดอยู่ใน Subg. *Byronia* และแยกกลุ่มชัดเจนออกไปใน Subclade 5.1 ซึ่งประกอบด้วยสมาชิกใน Sect. *Byronia* คือ *I. cymosa* (1), *I. cymosa* (2), *I. wallichii* (1) และ *I. wallichii* (2) จับกลุ่มอยู่ร่วมกับ *Ilex* sp. (2) ซึ่งยังไม่ได้จำแนกกลุ่ม ด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 89% BS และใน Subclade 5.2 ประกอบด้วยสมาชิกใน Sect. *Lioprinus* คือ *I. umbellulata* (1) และ *I. umbellulata* (2) จับกลุ่มอยู่ร่วมกับ *Ilex* sp. (3) ซึ่งยังไม่ได้จำแนกกลุ่ม ด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 88% BS และสมาชิกของทั้ง 2 Section แสดงความใกล้ชิดกับ *Ilex* sp. (1) ซึ่งยังไม่ได้จำแนกด้วยเช่นกัน ด้วยความเชื่อมั่นสูงถึง 95% BS นอกจากนี้ พบการรวมกลุ่มที่ไม่สอดคล้องกับกลุ่มที่ถูกจำแนกไว้ของ *I. embelioides* ซึ่งตัวอย่างนี้แยกออกมาจากสมาชิกตัวอื่นใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* อย่างไรก็ตาม แม้จะจับกลุ่มอยู่ใน Clade นี้ แต่ไม่มีค่าความเชื่อมั่นที่จะสนับสนุนความใกล้ชิดกับพืชวงศ์ลีลาชนิดใดอย่างชัดเจน

2.2. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนเป็ดด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียร์

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนเป็ดด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด ITS ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum Parsimony แสดงไว้ใน ภาพที่ 3.1.5 พบการจับกลุ่มของตัวอย่างพืชแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มหลักๆ คือ Clade 1 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 100% BS ประกอบด้วยสมาชิกใน Subg. *Byronia* Sect. *Paltoria* (*I. viridis* KY417946, *I. triflora* KY417932) และพบว่า *I. triflora* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ยืนยันการจำแนกกลุ่มที่สอดคล้องกับข้อมูลทางสัณฐาน ยกเว้น *I. pubescens* KF255672 ที่ถูกจำแนกไว้ใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* จับกลุ่มอยู่ใน Clade นี้ด้วย; Clade 2 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 97% BS ประกอบด้วยสมาชิก 4 ชนิดที่ถูกจำแนกไว้ใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* โดย *I. pubifruca* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้และยังไม่ได้ถูกจำแนกจับกลุ่มอยู่ด้วย และแสดงความใกล้ชิดกับ *I. integra* KY417948 ด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 95% BS; Clade 3 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นปานกลางที่ 82% BS ประกอบด้วยสมาชิกที่ถูกจำแนกไว้ใน Subg. *Aquifolium* โดยมีตัวแทนใน Sect. *Aquifolium* (*I. corallina* var. *aberrans* KF255675), Sect. *Lauroilex* (*I. venulosa* KY417939) และ Sect. *Pseudoaquifolium* (*I. lihuaensis* KF255674, *I. longicaudata* KY417943 และ *I. wilsonii* FJ394722) และพบว่า *Ilex* sp. (4) ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้เป็นสมาชิกใน Clade 3 ด้วยโดยแสดงความใกล้ชิดกับ *I. corallina* var. *aberrans* KF255675 และ *I. lihuaensis* KF255674 ด้วยความเชื่อมั่นสูงถึง 93% BS; Clade 4 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 94% BS ประกอบด้วยสมาชิกตัวแทนที่ถูกจำแนกไว้ภายใต้ Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* (*I. micrococca* AH007160 และ *I. polyneura* KY417937) 2 ชนิด และพบว่า *I. micrococca* (1) และ *I. micrococca* (2) ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ยืนยันความถูกต้องในการจัดกลุ่มตามข้อมูลลักษณะทางสัณฐาน แต่ *I. ficoidea* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้จับกลุ่มอยู่ใน Clade 4 นี้ด้วย ทั้งๆ ที่ถูกจำแนกไว้ใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium*; Clade 5 จับกลุ่มกันด้วยค่าความเชื่อมั่นต่ำที่ 74% BS โดยมีสมาชิกส่วนใหญ่เป็นตัวแทนของ Subg. *Byronia* ยกเว้น *I. denticulata* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้และถูกจำแนกไว้ภายใต้ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ซึ่งภายใน Clade 5 นี้ ยังพบการแยกกลุ่มออกไปอีกเป็น Subclade 5.1 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ศึกษาใหม่ทั้งหมดในงานวิจัยนี้ด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 90% BS เป็นสมาชิกใน Sect. *Byronia* (ยกเว้น *I. denticulata* ตามที่กล่าวมาข้างต้น) โดย *I. cymosa* (1), *I. cymosa* (2) และ *I. cymosa* (3) ยืนยันความถูกต้องในการระบุชื่อด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 96% BS ส่วน *I. wallichii* (2) แสดงความใกล้ชิดกับ *Ilex* sp. (1) และ *I. denticulata* ด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 85% BS โดยพบ *Ilex* sp. (1) และ *I. denticulata* แสดงความใกล้ชิดกันด้วยความเชื่อมั่นต่ำที่ 67% BS ส่วนตัวแทนที่ถูกจัดไว้ในกลุ่ม 'Opposite-leaved species' (*I. zygophylla* FJ394728) จับกลุ่มอยู่ที่ฐานของ Subclade 5.1 โดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นส่วน Subclade 5.2 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 99% BS ประกอบด้วยสมาชิกใน Sect. *Lioprinus* คือ *I. umbellulata* (1) และ *I. umbellulata* (2) และยังพบว่า *Ilex* sp. (3) ที่ยังไม่ได้จัดกลุ่มมีความใกล้ชิดกับสมาชิกใน Subclade 5.2 นี้

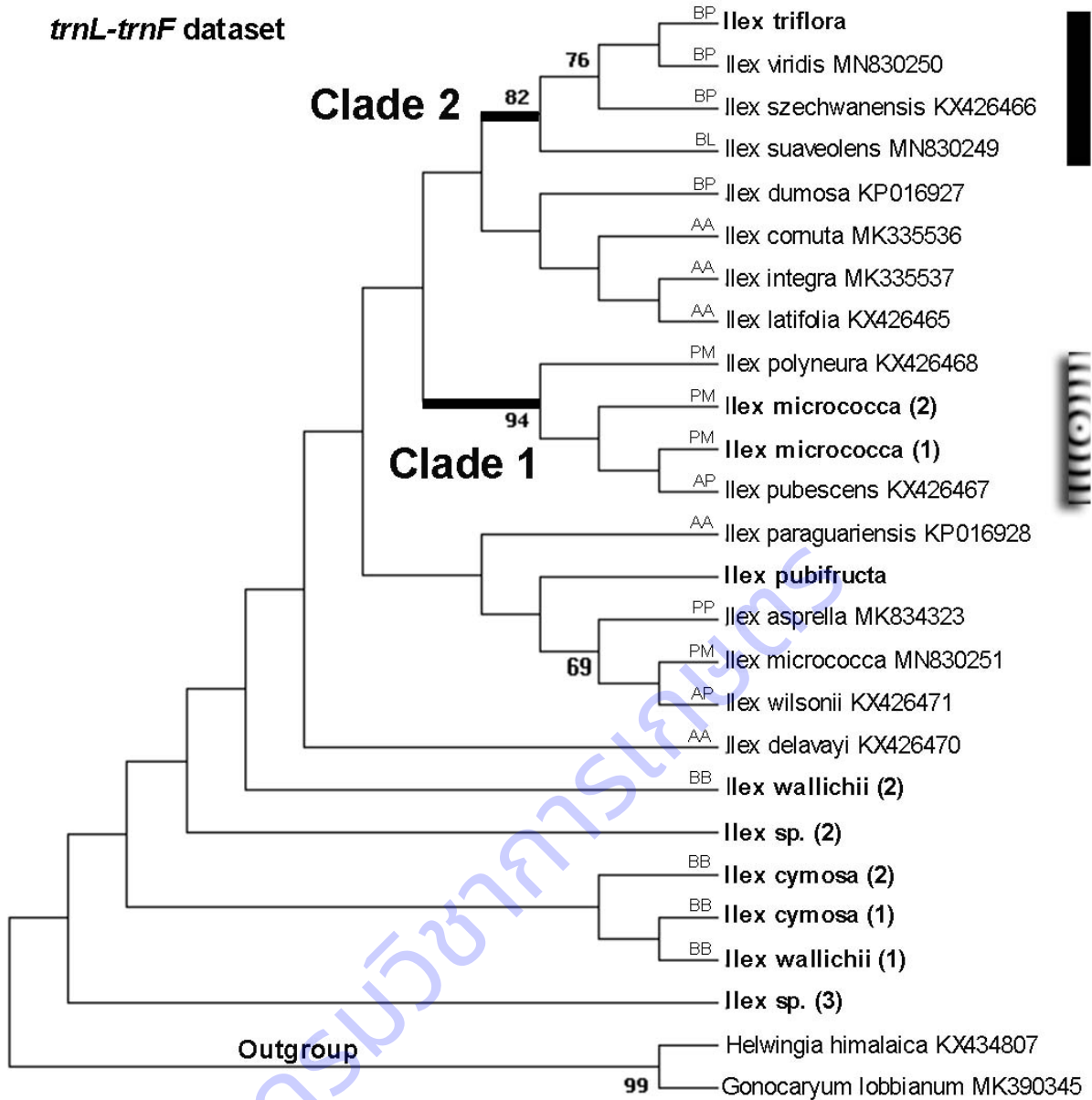


ภาพที่ 3.1.1 แผนภูมิกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศिलाที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* ด้วยวิธีจัดกลุ่มแบบ Maximum Parsimony พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS) อักษรบน Clade ของแต่ละ taxa แสดงกลุ่มพืชที่จัดจำแนกไว้ด้วยข้อมูลทางสัญญาณโดยเทียบเคียงชื่อได้จากตารางที่ 3.1.7

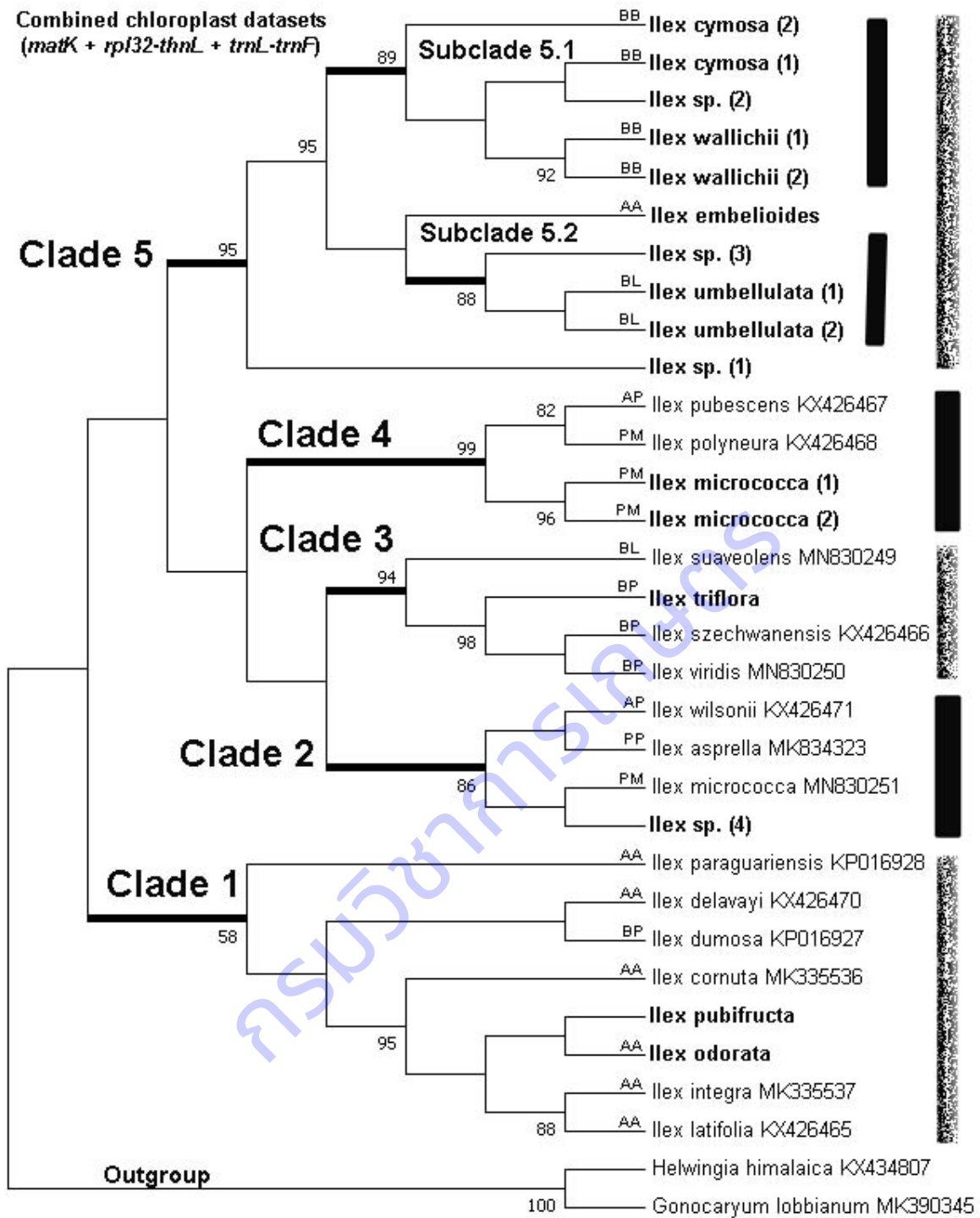


ภาพที่ 3.1.2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* ด้วยวิธีจัดกลุ่มแบบ Maximum Parsimony พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS) อักษรบน Clade ของแต่ละ taxa แสดงกลุ่มพืชที่จัดจำแนกไว้ด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดยเทียบเคียงชื่อได้จากตารางที่ 3.1.7

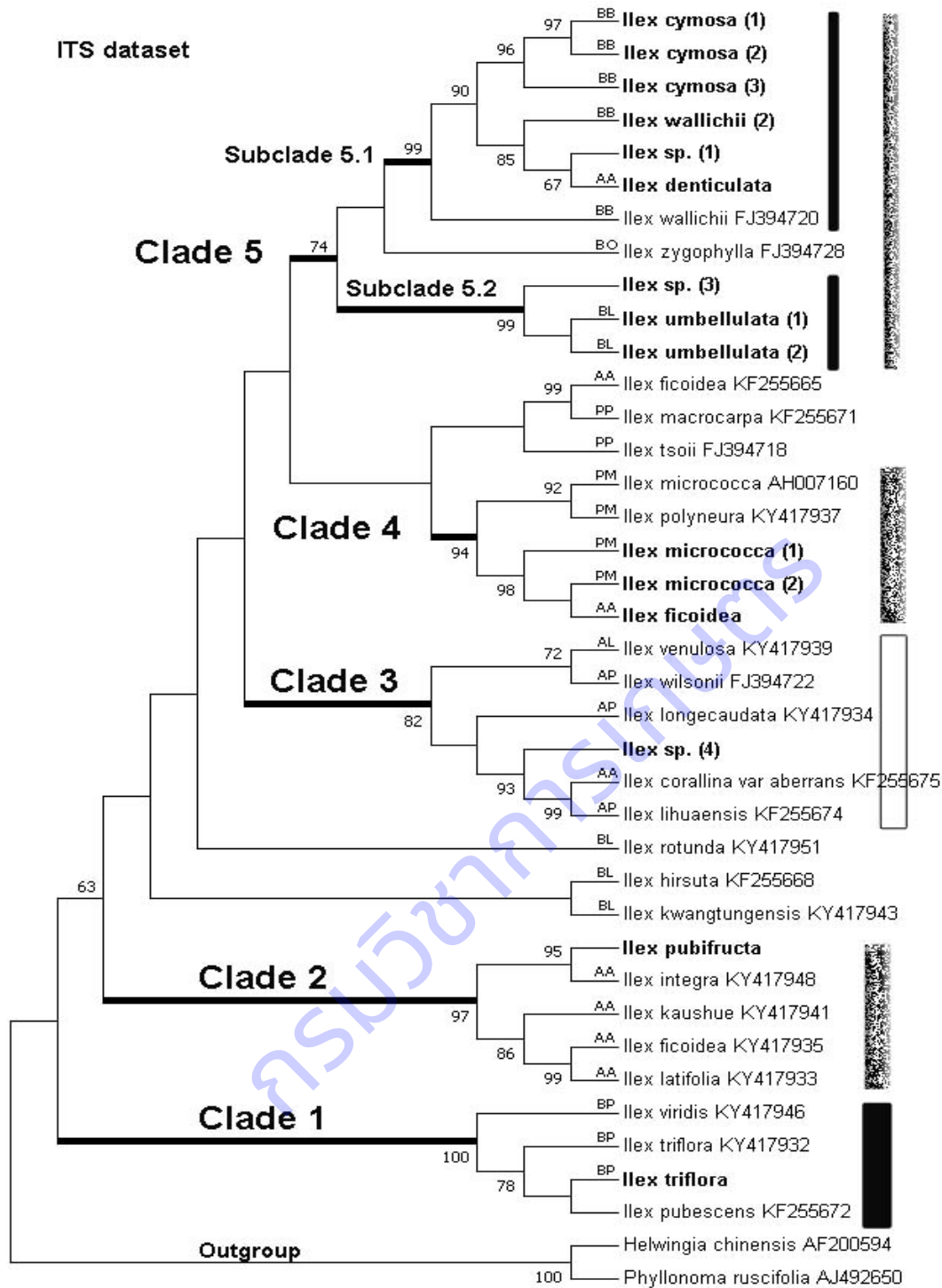
trnL-trnF dataset



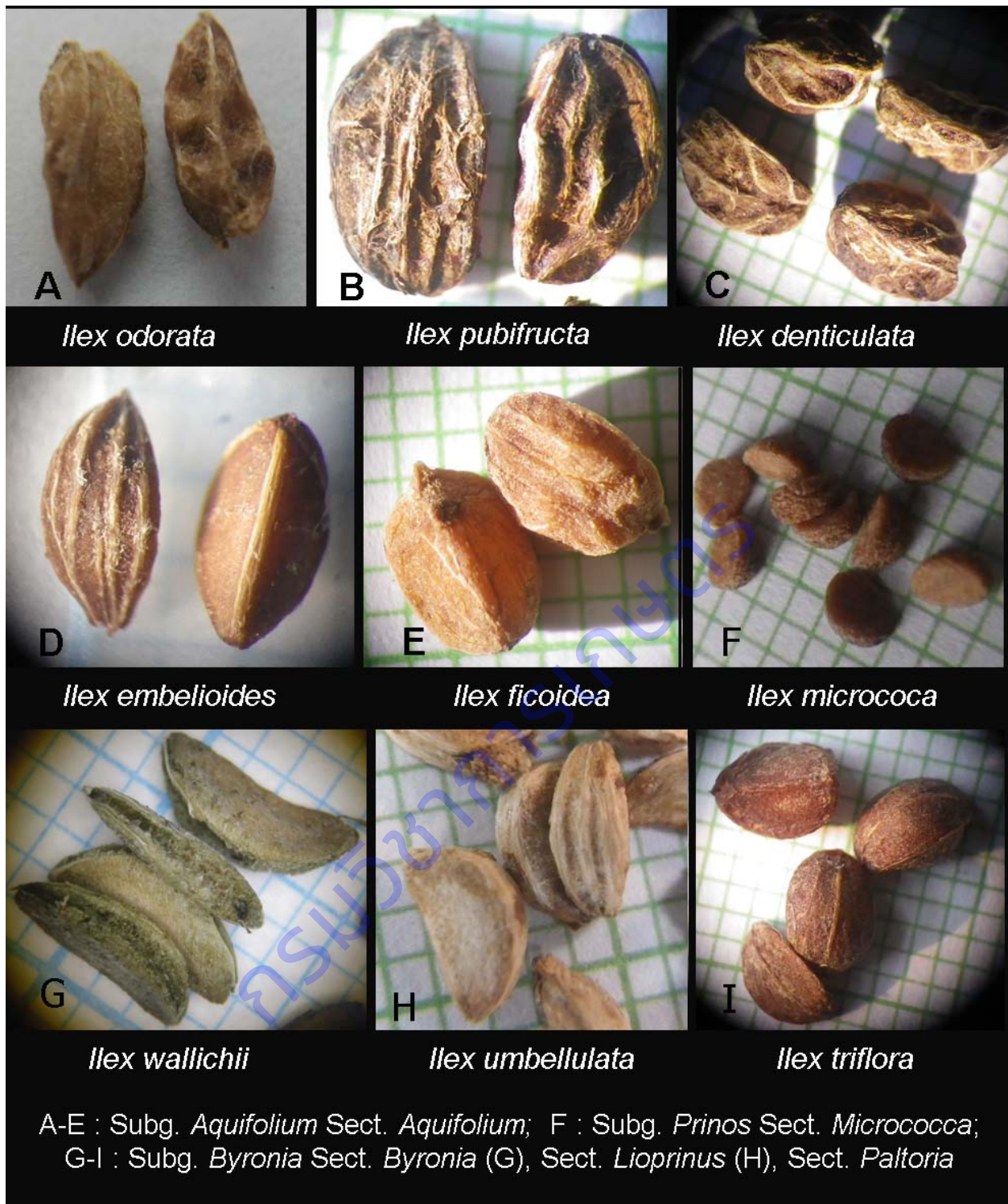
ภาพที่ 3.1.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์สนิลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF* ด้วยวิธีจัดกลุ่มแบบ Maximum Parsimony พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS) อักษรบน Clade ของแต่ละ taxa แสดงกลุ่มพืชที่จัดจำแนกไว้ด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดยเทียบเคียงชื่อได้จากตารางที่ 3.1.7



ภาพที่ 3.1.4 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คลิลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด ร่วมกันของบริเวณคลอโรพลาสต์ (*matK* + *rpl32-trnL* + *trnL-trnF*) ด้วยวิธีจัดกลุ่มแบบ Maximum Parsimony พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS) อักษรบน Clade ของแต่ละ taxa แสดงกลุ่มพืชที่จัด จำแนกได้ด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดยเทียบเคียงชื่อได้จากตารางที่ 3.1.7



ภาพที่ 3.1.5 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนเป็ดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณนิวเคลียร์ ITS ด้วยวิธีจัดกลุ่มแบบ Maximum Parsimony พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS) อักษรบน Clade ของแต่ละ taxa แสดงกลุ่มพืชที่จัดจำแนกไว้ด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดยเทียบเคียงชื่อได้จากตารางที่ 3.1.7



ภาพที่ 3.1.6 ภาพแสดงลักษณะของเมล็ดของพืชวงศ์คัสติลา (Aquifoliaceae) ตามการจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐาน

3) ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คัสติลาด้วยข้อมูลดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับความใกล้ชิดของชนิดพืชที่ถูกแบ่งด้วยข้อมูลทางสัณฐานของพืช

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชนิดพืชวงศ์คัสติลาที่ศึกษาด้วยข้อมูลดีเอ็นเอของบริเวณคลอโรพลาสต์และบริเวณนิวเคลียร์ดังที่กล่าวมาข้างต้น แสดงผลสอดคล้องกันเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการจัดจำแนกด้วยข้อมูลดีเอ็นเอจากงานวิจัยนี้กับการจัดจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดย Galle (1997) พบว่าให้ผลที่

สอดคล้องกันเป็นส่วนใหญ่เช่นกัน เมื่อพิจารณาการจัดจำแนกพืชวงศ์คลาด้วยข้อมูลทางสัณฐานพบว่า มีการแยกสกุลพืช *Ilex* ออกได้เป็น 3 Subgenera (Subg.) ประกอบด้วย Subg. *Prinos*, Subg. *Byronia* และ Subg. *Aquifolium* (ตารางที่ 3.1.7) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกตัวแทนชนิดพืชของบาง Section ที่จัดจำแนกไว้ภายใต้ 3 Subgenera ที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งคาดการณ์จากลักษณะทางสัณฐานไว้ว่ามีแนวโน้มจะมีความใกล้ชิดกับชนิดพืชในกลุ่มเหล่านั้น เพื่อเป็นการพิสูจน์ยืนยันหรือเป็นแนวทางในตรวจสอบการระบุชื่อพืชสำหรับตัวอย่างที่ยังเป็น Unknown species

ผลการวิเคราะห์พบการจัดจำแนกชนิดพืชวงศ์คลาภายใต้ Subg. *Aquifolium* โดยมีตัวแทนชนิดพืชที่ศึกษาของ 3 section คือ Sect. *Aquifolium*, Sect. *Lauroilex* และ Sect. *Pseudoaquifolium* ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างพืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ คือ *I. odorata* และ *I. pubifructa* ปรากฏรวมอยู่กับชนิดพืชที่จัดจำแนกไว้ใน Sect. *Aquifolium* (Clade 1 ภาพที่ 3.1.4 และ Clade 2 ภาพที่ 3.1.5) หากพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานของการจัดจำแนก (Galle, 1997) พบว่าพืชทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะเด่นร่วมกันกับชนิดอื่นๆ ในนี้ คือ พืชทั้งกลุ่มมีวงกลีบดอก 4 กลีบ และมีเมล็ดแข็ง (pyrene) 4 เมล็ด ซึ่งผิวเมล็ดมีลักษณะเหี่ยวย่น หรือเป็นริ้ว หรือเป็นหลุม หรือเป็นร่องเล็กๆ หรือเป็นช่องแคบ และผิวด้านหลังนูนออกมา (ภาพที่ 3.1.6A-B) นอกจากนี้ ยังพบ *Ilex* sp. (4) ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้จับกลุ่มอยู่กับชนิดพืชใน Subg. *Aquifolium* อีกด้วย (Clade 3 ภาพที่ 3.1.5) โดยปรากฏชนิดพืชทั้ง Sect. *Aquifolium* และ Sect. *Pseudoaquifolium* อยู่ร่วมกัน ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้สามารถใช้ทำนายตำแหน่งการจัดกลุ่มของ *Ilex* sp. (4) ได้ว่ามีความใกล้ชิดกับชนิดพืชใน Subg. *Aquifolium* ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานของพืชที่ศึกษาได้จากตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงหมายเลข Suddee et al. 4392 (BKF) (ตารางที่ 3.1.1) อย่างไรก็ดี จากรายงานของ Manen et al. (2010) ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชวงศ์คลาถึง 150 ชนิด ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด 5 บริเวณ พบการจัดจำแนกชนิดพืชเป็น Section ต่างๆ ภายใต้ Subg. *Aquifolium* นั้นยังเป็น Polyphyletic

ผลการวิเคราะห์พบการจัดจำแนกชนิดพืชวงศ์คลาที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้จับกลุ่มอยู่ภายใต้ Subg. *Byronia* จำนวน 7 taxa คือ *I. cymosa* 2 taxa, *I. umbellulata* 2 taxa, *I. wallichii* 2 taxa และ *I. triflora* โดยตัวอย่างทั้ง 7 taxa นี้ยืนยันการจัดจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอสอดคล้องกับข้อมูลลักษณะทางสัณฐาน และตัวอย่างอีก 3 taxa คือ *Ilex* sp. (1), *Ilex* sp. (2) และ *Ilex* sp. (3) แสดงความใกล้ชิดกับชนิดพืชในกลุ่มนี้ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาระบุชื่อพืชในอนาคต โดยตัวอย่างเหล่านี้มีลักษณะทางสัณฐานเด่นๆ ที่เหมือนกันกับชนิดพืชใน Subg. *Byronia* คือ ใบมีขอบหยัก วงกลีบดอกมี 4 กลีบ ผลมีเมล็ดแข็ง 4 เมล็ด ผิวเมล็ดเรียบหรือผิวด้านหลังเป็นริ้วแต่ไม่เป็นร่องตามยาว ซึ่ง *I. triflora* ยืนยันการรวมกลุ่มกับสมาชิกพืชใน Sect. *Paltoria* (Clade 3 ภาพที่ 3.1.4; Clade 1 ภาพที่ 3.1.5) ด้วยลักษณะร่วมที่กว่ามาข้างต้น (ภาพที่ 3.1.6I) ส่วน *I. cymosa* (1), *I. cymosa* (2), *I. wallichii* (1) และ *I. wallichii* (2) ยืนยันการรวมกลุ่มด้วยกันภายใต้ Sect. *Byronia* (Subclade 5.1, ภาพที่ 3.1.4 และภาพที่ 3.1.5) ด้วยลักษณะเด่นของใบมีขอบเรียบ วงกลีบดอก 4-6 กลีบ ผลมี 7-10 เมล็ด เมล็ดมีผิวเรียบ ผิวด้านหลังเป็นร่องกว้างตามยาว 1 ร่อง (ภาพที่ 3.1.6G) โดยภายใน Clade ของ Sect. *Byronia* นี้ ปรากฏ *Ilex* sp. (1) (Subclade 5.1 ภาพที่ 3.1.5) และ *Ilex* sp. (2) (Subclade 5.1 ภาพที่ 3.1.4) รวมกลุ่มอยู่ด้วย ซึ่งเมื่อพิจารณาจากตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงหมายเลข KaeoKoon et al. KP2018-30 (BK) และ KaeoKoon et al. KP2018-31 (BK) ของพืชทั้ง 2 taxa ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1.1) พบว่าเป็นชิ้นตัวอย่างที่ไม่มีส่วนสืบพันธุ์ (Sterile specimen) แต่มีลักษณะของส่วนกิ่งใบคล้ายคลึงกันกับสมาชิกชนิดอื่น จึงทำนายตำแหน่งของการจัดกลุ่มของ *Ilex* sp. (1) และ *Ilex* sp. (2) ว่าเป็นสมาชิกใน Subg. *Byronia* Sect. *Byronia* อย่างไรก็ดี พบการจัดกลุ่มของ *I. dentiulata* ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ และถูกจัดจำแนกไว้ด้วยข้อมูลทางสัณฐานภายใต้ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ปรากฏอยู่กับสมาชิกของ Sect. *Byronia* ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่สูง

(Subclade 5.1 ภาพที่ 3.1.5) แต่ลักษณะทางสัณฐานกลับแตกต่างจากสมาชิกของ Sect. *Byronia* อย่างสิ้นเชิง ในทางกลับกัน *I. dentiulata* (ภาพที่ 3.1.6C) มีลักษณะทางสัณฐานคล้าย *I. pubifruca* (ภาพที่ 3.1.6B) มาก ต่างกันที่พืชชนิดหลังมีขนสั้นปกคลุมส่วนต่างๆ ของพืช จึงจำเป็นต้องศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอของ *I. dentiulata* ซ้ำอีกครั้งเพื่อยืนยันตำแหน่งการจัดกลุ่มที่ถูกต้อง นอกจากนี้ ยังพบชนิดพืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้คือ *I. umbellulata* (1) และ *I. umbellulata* (2) ที่ยืนยันการระบุชื่อเป็นชนิดเดียวกันได้อย่างถูกต้องภายใต้ Sect. *Lioprinus* (Subclade 5.2 ภาพที่ 3.1.4 และภาพที่ 3.1.5) มีลักษณะเด่นของใบมีขอบเรียบ วงกลีบดอก 4-5 กลีบ ผลมี 7-9 เมล็ด ผิวเมล็ดเรียบ ผิวด้านหลังเป็นร่องตามยาว 2 ร่อง (ภาพที่ 3.1.6H) อย่างไรก็ตาม พบว่า ตัวแทนสมาชิกของ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* คือ *I. embelioides* ซึ่งเป็นชนิดพืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ปรากฏรวมอยู่กับชนิดพืชใน Subg. *Byronia* (Clade 5 ภาพที่ 3.1.4) ด้วย แต่หากพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานของพืช คือ ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงหมายเลข Takahashi & Tamura T-63342 (BKF) (ตารางที่ 3.1.1) พบว่า *I. embelioides* มีลักษณะทางสัณฐานคาบเกี่ยวระหว่าง Subg. *Aquifolium* กับ Subg. *Byronia* เช่น ใบมีขอบเรียบ วงกลีบดอก 4-5 กลีบ ผลมี 4 เมล็ด ผิวเมล็ดเรียบ ผิวด้านหลังเป็นสันตามยาว 3-4 สัน (ภาพที่ 3.1.6D) อย่างไรก็ตาม การแยกกลุ่มที่ไม่ชัดเจนครั้งนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้ของ *I. embelioides* ไม่มีความสมบูรณ์เพียงพอ เพราะสามารถเพิ่มดีเอ็นเอได้ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* เพียงบริเวณเดียวและดีเอ็นเอที่ได้มาก็เป็นเพียงบางส่วนของ sequence เท่านั้น ดังนั้น จึงยังไม่สามารถสรุปตำแหน่งการจัดกลุ่มของ *I. embelioides* ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ได้ชัดเจน

ผลการวิเคราะห์พบการจำแนกชนิดพืชวงศ์คลาที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้จับกลุ่มอยู่ภายใต้ Subg. *Prinos* จำนวน 2 taxa คือ *I. micrococca* (1) และ *I. micrococca* (2) จับกลุ่มอยู่ด้วยกันกับสมาชิกใน Sect. *Micrococca* (Clade 4 ภาพที่ 3.1.4 และภาพที่ 3.1.5) ยืนยันความถูกต้องตามการจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐานของพืช โดยสมาชิกในกลุ่มนี้มีลักษณะเด่นที่กิ่งอ่อนเป็นสีแดง มี lenticel หนาแน่น ขอบใบจักฟันเลื่อย ปลายใบยาว วงกลีบดอก 6-11 กลีบ เมล็ดแข็ง 6-8 เมล็ด ผิวด้านข้างเรียบ ส่วนผิวด้านหลังเรียบเป็นร่องเล็กตามยาว 1 ร่อง (ภาพที่ 3.1.6F) อย่างไรก็ตาม ภายใน Clade ของ Subg. *Prinos* พบการรวมกลุ่มของ *I. ficoidea* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้รวมอยู่ด้วยเช่นกัน (Clade 4 ภาพที่ 3.1.5) แต่พืชชนิดนี้ถูกจำแนกไว้ภายใต้ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* และมี *I. ficoidea* KF255665 ที่รวมกลุ่มกับชนิดพืชใน Sect. *Prinoides* จับกลุ่มเป็น sister clade กับ Clade 4 (ภาพที่ 3.1.5) นี้ด้วยโดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น แต่ *I. ficoidea* KY417935 กลับรวมกลุ่มอย่างชัดเจนกับสมาชิกใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* (Clade 2 ภาพที่ 3.1.5) ตามที่มีการจำแนกกลุ่มไว้ด้วยลักษณะทางสัณฐานของพืช เมื่อตรวจสอบรายงานของ Yi *et al.* (2017) พบว่าสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ที่ในงานวิจัยนี้ โดยพบ *I. ficoidea* KF255665 จับกลุ่มเป็น sister clade กับ *I. macrocarpa* KF255671 สมาชิกใน Sect. *Prinoides* ด้วยค่าความเชื่อมั่นสูง (99% BS ในงานวิจัยนี้; 100% BS ใน Yi *et al.*, 2017) และจับกลุ่มเป็น sister group กับสมาชิกอื่นใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ด้วยค่าความเชื่อมั่นที่สูงเช่นกัน แต่เมื่อตรวจสอบในรายงานของ Jiang *et al.* (2017) กลับพบว่า *I. ficoidea* KY417935 ไม่จับกลุ่มกับ *I. macrocarpa* AJ492689 แต่จับกลุ่มกับสมาชิกใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* อย่างถูกต้อง อีกทั้ง *I. macrocarpa* AJ492689 ก็จับกลุ่มถูกต้องกับสมาชิกใน Subg. *Prinos* Sect. *Prinoides* ดังนั้น กรณีนี้จึงสรุปได้ว่า *I. ficoidea* KF255665 ที่ศึกษาโดย Yi *et al.* (2017) อาจถูกระบุชื่อผิดพลาดแต่ไม่อาจสรุปได้ชัดเจนเนื่องจากไม่ได้เห็นตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงของตัวอย่างนั้น ส่วน *I. ficoidea* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ พบตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงหมายเลข Fukuoka T-63801 (BKF) (ตารางที่ 3.1.1) มีลักษณะทางสัณฐานตามลักษณะพืชใน Sect. *Aquifolium* อย่างชัดเจน (ภาพที่ 3.1.6E) ดังนั้น อาจสรุปสาเหตุของการจับผิดกลุ่มของ *I. ficoidea* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ได้ 2 ประการ คือ ประการแรก มีการปนเปื้อน

ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งในงานวิจัยนี้ไม่ได้มีการทำซ้ำตัวอย่าง จึงไม่สามารถยืนยันสถานะตัวอย่างได้ และประการที่ 2 คือการผสมข้ามในธรรมชาติ (Natural hybridization) ซึ่งกรณีเช่นนี้ได้ศึกษาพบมากขึ้นในพืชสกุล *Ilex* (Son *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2016) นอกจากนี้ ยังพบการรวมกลุ่มของ *I. pubescens* KX426467 ซึ่งเป็นสมาชิกใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* รวมตัวอยู่กับสมาชิกของ Sect. *Micrococca* (Clade 4 ภาพที่ 3.1.4) ด้วย เมื่อตรวจสอบรายงานของ Yao *et al.* (2016) ซึ่งพบตัวอย่างนี้จับอยู่กับ *I. polyneura* KX426468 ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นสูง (100% BS) กรณีนี้ อาจเกิดจากการระบุชื่อพืชผิดพลาด เพราะลักษณะทางสัณฐานของ *I. pubescens* ปรากฏเหมือนสมาชิกอื่นใน Subg. *Aquifolium* อย่างชัดเจน นอกจากนี้ พบการปรากฏของ *Ilex* sp. (4) จับกลุ่มร่วมกับสมาชิกของ Subg. *Prinos* ทั้งสอง Section และมีสมาชิกของ Subg. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* รวมกลุ่มอยู่ด้วย (Clade 2 ภาพที่ 3.1.4) ดังนั้น การแยกกลุ่มของ *Ilex* sp. (4) จึงยังไม่ชัดเจนว่าควรจำแนกไว้ใน Subgenus ใดได้ในงานวิจัยนี้

ตารางที่ 3.1.7 แสดงตัวแทนชนิดพืชวงศ์คลิธาที่จัดจำแนกของด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดย Galle (1997) เปรียบเทียบการจำแนกด้วยข้อมูลดีเอ็นเอในงานวิจัยนี้ โดยพิจารณาเฉพาะตัวอย่างที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้เป็นหลัก

Species	Morphological classification (Galle, 1997)	DNA classification (Present study)
<i>Ilex micrococca</i> , <i>Ilex polyneura</i>	Subg. <i>Prinos</i> Sect. <i>Micrococca</i> (PM)	-
<i>Ilex asprella</i> , <i>Ilex macrocarpa</i> , <i>Ilex tsoii</i>	Subg. <i>Prinos</i> Sect. <i>Prinoides</i> (PP)	-
<i>Ilex cymosa</i> , <i>Ilex wallichii</i>	Subg. <i>Byronia</i> Sect. <i>Byronia</i> (BB)	-
<i>Ilex hirsuta</i> , <i>Ilex kwangtungensis</i> , <i>Ilex rotunda</i> , <i>Ilex suaveolens</i> , <i>Ilex umbellulata</i>	Subg. <i>Byronia</i> Sect. <i>Lioprinus</i> (BL)	-
<i>Ilex dumosa</i> , <i>Ilex</i> <i>szechwanensis</i> , <i>Ilex triflora</i> , <i>Ilex viridis</i>	Subg. <i>Byronia</i> Sect. <i>Paltoria</i> (BP)	-
<i>Ilex zygophylla</i>	Subg. <i>Byronia</i> 'Opposite-leaved Species' (BO)	-
<i>Ilex corallina</i> . var. <i>aberrans</i> , <i>Ilex cornuta</i> , <i>Ilex delavayi</i> , <i>Ilex</i> <i>denticulate</i> , <i>Ilex embelioides</i> <i>Ilex ficoidea</i> , <i>Ilex integra</i> , <i>Ilex kaushue</i> , <i>Ilex latifolia</i> , <i>Ilex odorata</i> , <i>Ilex paraguariensis</i>	Subg. <i>Aquifolium</i> Sect. <i>Aquifolium</i> (AA)	1) <i>Ilex denticulata</i> and 2) <i>Ilex embelioides</i> placed with Subg. <i>Byronia</i> . 3) <i>Ilex ficoidea</i> placed with Subg. <i>Prinos</i> Sect. <i>Micrococca</i>
<i>Ilex venulosa</i>	Subg. <i>Aquifolium</i> Sect. <i>Lauroilex</i> (AL)	-
<i>Ilex lihuaensis</i> , <i>Ilex longecaudata</i> ,	Subg. <i>Aquifolium</i> Sect. <i>Pseudoaquifolium</i> (AP)	-

Species	Morphological classification (Galle, 1997)	DNA classification (Present study)
<i>Ilex pubescens, Ilex wilsonii</i>		
<i>Ilex pubifructa</i>	Unclassified	Subg. <i>Aquifolium</i> Sect. <i>Aquifolium</i>
<i>Ilex</i> sp. (1)	Unclassified	Subg. <i>Byronia</i>
<i>Ilex</i> sp. (2)	Unclassified	Subg. <i>Byronia</i> Sect. <i>Byronia</i>
<i>Ilex</i> sp. (3)	Unclassified	Subg. <i>Byronia</i> Sect. <i>Lioprinus</i>
<i>Ilex</i> sp. (4)	Unclassified	Subg. <i>Aquifolium</i> / Subg. <i>Prinos</i>

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การศึกษาความหลากหลายของพืชวงศ์คัสลา (Aquifoliaceae) ในประเทศไทยด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด บริเวณคลอโรพลาสต์ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และบริเวณนิวเคลียร์ ITS ได้ฐานข้อมูลดีเอ็นเอที่ลงทะเบียน เก็บรักษาไว้บนระบบออนไลน์ของ National Center for Biotechnology Information เพื่อใช้ในการระบุชนิดของพืชวงศ์คัสลาทั้งหมด 54 ข้อมูล ประกอบด้วย GenBank accession หมายเลข MT114079–MT114117 ซึ่งเป็นข้อมูลดีเอ็นเอของพืชวงศ์คัสลาที่มีการศึกษาเป็นครั้งแรกในประเทศไทย เป็นตัวแทนความหลากหลายของพรรณพืชวงศ์คัสลาจำนวน 14 ชนิด โดยศึกษาพบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชที่ระบุการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอสอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐานของพืชอย่างชัดเจน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก และ 5 กลุ่มย่อย ดังนี้ กลุ่มที่หนึ่ง คือ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ประกอบด้วย *Ilex odorata* และ *I. pubifructa* กลุ่มที่สอง คือ Subg. *Byronia* แยกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ Sect. *Byronia* ประกอบด้วย *I. cymosa*, *I. wallichii*, *Ilex* sp. (1) และ *Ilex* sp. (2); Sect. *Lioprinus* ประกอบด้วย *I. umbellulata* และ *Ilex* sp. (3) และ Sect. *Paltoria* ประกอบด้วย *I. triflora* และกลุ่มที่สามคือ Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* ประกอบด้วย *I. micrococca* นอกจากนี้พบการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอที่ให้ข้อมูลไม่สอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐาน ประกอบด้วย *I. denticulata* และ *I. embelioides* ที่ให้ผลการแยกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอใกล้เคียงกับชนิดพืชใน Subg. *Byronia* แต่การจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐานจัดพืชทั้งสองชนิดอยู่ภายใต้ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ส่วน *I. ficoidea* ที่ถูกจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐานกลุ่มเดียวกับพืชทั้งสองชนิดดังกล่าวมาข้างต้นกลับให้ผลการแยกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอใกล้เคียงกับพืชใน Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* และพบ *Ilex* sp. (4) จับกลุ่มใกล้เคียงกับชนิดพืชใน Subg. *Aquifolium* ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณนิวเคลียร์ แต่กลับแสดงความใกล้เคียงกับชนิดพืชทั้งใน Subg. *Aquifolium* และ Subg. *Prinos* ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณคลอโรพลาสต์

การศึกษาความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์คัสลาในงานวิจัยนี้ ช่วยยืนยันความถูกต้องในการระบุชื่อตัวอย่างพืชรวมถึงการจัดจำแนกพืชออกเป็นกลุ่มๆ ด้วยข้อมูลทางสัณฐาน อีกทั้งยังเป็นประโยชน์ในการจำแนกกลุ่มของพืชวงศ์คัสลาที่ยังเป็น Unknown species และเป็นแนวทางในการศึกษาทางอนุกรมวิธานและการระบุชื่อชนิดพืชที่จะดำเนินการวิจัยต่อไปในอนาคต รวมทั้งควรศึกษาทบทวนข้อมูลดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชที่ยังไม่มีความชัดเจนในการจำแนกกลุ่มจากงานวิจัยนี้เพิ่มเติมอีกครั้ง เพื่อให้ข้อมูลความหลากหลายของชนิดพืชวงศ์คัสลาที่มีความสมบูรณ์มากขึ้น และควรมีการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชวงศ์คัสลาที่กระจายพันธุ์อยู่ทั่วประเทศเพิ่มเติม เนื่องจากความหลากหลายของชนิดพืชวงศ์คัสลาในประเทศไทยยังคงสำรวจอยู่มาก

การทดลองที่ 3.2 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปัญญาจันทร์
(*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) พันธุ์พื้นเมืองและลูกผสม
(Diversity and DNA Barcodes of Native Species and Hybrids of *Gynostemma pentaphyllum*
(Thunb.) Makino)

ชื่อผู้วิจัย

กาญจนา พฤษพันธ์ ศศิธร วรพิติรังสี นางอัญชลี แก้วดวง นายธีรวุฒิ ชุตินันท์กุล
Kanchana Pruesapan Sasitorn Vorapitirangsi Anchalee Kaewdoun Theerawut
Chutinanthakun

คำสำคัญ : เจียวกู่หลาน แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ยีนคลอโรพลาสต์ สายพันธุ์ไทย

Key words : Jiaogulan, Phylogenetic tree, Chloroplast gene, Thai variety

บทคัดย่อ

ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาตามสภาพแวดล้อมของปัญญาจันทร์ ส่งผลให้เกิดความไม่คงที่ในการเรียกชื่อพืชตามหลักพฤกษอนุกรมวิธาน งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปัญญาจันทร์พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสมของไทย เพื่อตรวจสอบยืนยันชื่อปัญญาจันทร์ในประเทศไทย โดยการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามกรรมวิธีทางอนุกรมวิธานพืช และใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3* เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) ผลการศึกษา พบว่า ลักษณะสัณฐานร่วมและลักษณะสัณฐานที่แตกต่างของปัญญาจันทร์ที่ศึกษาจำนวน 20 พันธุ์ แสดงความเป็นชนิดเดียวกันกับพืชสกุลปัญญาจันทร์ (*Gynostemma* spp.) ถึง 5 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบการจัดแบ่งกลุ่มพันธุ์ปัญญาจันทร์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด แผนภูมิ ML แสดงการแยกกลุ่มพันธุ์ของปัญญาจันทร์ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มด้วยลักษณะสัณฐานของเมล็ด พืชสกุลปัญญาจันทร์ที่แสดงตำแหน่งร่วมกันบนแผนภูมิ ML และมีลักษณะทางสัณฐานเหมือนกับปัญญาจันทร์ 20 พันธุ์ คือ *G. burmanicum*, *G. laxum*, *G. longipes*, *G. pentaphyllum* และ *G. simplicifolium* ซึ่งสถานะในระดับชนิด (species) ของพืชเหล่านี้ได้รับการยอมรับในการศึกษาพรรณพฤกษชาติของประเทศจีน ในขณะที่ในเขตพรรณพฤกษชาติของไทยและประเทศในเขต Malesiana รวมถึงอินเดีย ยอมรับเพียง *G. pentaphyllum* ที่มีสถานะในระดับชนิด ส่วนอีก 4 ชนิดให้ถูกยุบรวมเป็นชื่อพ้องอยู่ภายใต้ชนิดดังกล่าว ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ สนับสนุนและยืนยันการยอมรับชื่อชนิด *G. pentaphyllum* เป็นชื่อที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของปัญญาจันทร์พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสมของไทย 19 พันธุ์ รวมทั้งพันธุ์จีนที่ใช้ศึกษาเปรียบเทียบอีก 1 พันธุ์ โดยข้อมูลดีเอ็นเอของปัญญาจันทร์ที่ศึกษาได้ถูกบันทึกไว้บนฐานข้อมูล GenBank, NCBI สำหรับใช้ประกอบการระบุยืนยันชื่อปัญญาจันทร์ในประเทศไทย

Abstracts

Morphological diversity of Panchakhan (Thai Jiaogulan) based on its different ecotypes affects the stability of taxonomy nomenclature. This research aimed to study morphology and DNA barcodes of the native and hybrid varieties of Panchakhan to verify their botanical names. Comparison of morphological characteristics according to plant taxonomic methods and DNA

barcoding techniques of *accD*, *petD*, *psbB*, and *ycf3* genes were examined to analyze the evolutionary relationship with the Maximum Likelihood (ML) method. The key to species results showed that the common and different morphological characters of 20 varieties of Panchakhan shared their similarity to 5 species of the genus *Gynostemma*. The results corresponded to the phylogenetic analysis using the DNA barcode data. The ML tree showed 3 groups of Panchakhan corresponding to the morphological grouping of seeds. The *Gynostemma* spp. that showed a common position on the ML tree and were morphologically identical to the 20 varieties of Panchakhan are *G. burmanicum*, *G. laxum*, *G. longipes*, *G. pentaphyllum* and *G. simplicifolium*. The status at the species level of these plants has been recognized in the botanical studies of China. Whereas in Thailand and Malesiana regions including India, only *G. pentaphyllum* has been recognized as a species, while the other four have been synonymized under *G. pentaphyllum*. The results of this study support and confirm the acceptance of *G. pentaphyllum* as the correct and update name for 20 native and hybrid varieties of Panchakhan, including one Chinese cultivar used in the comparative study. All DNA data were recorded on the GenBank, NCBI database for identifying Panchakan names in Thailand.

บทนำ (Introduction)

ปัญญาจันทร์ เป็นไม้เลื้อยเนื้ออ่อน มีอายุหลายปี มีคุณสมบัติโดดเด่นช่วยในการฟื้นฟูและต่อต้านริ้วรอยก่อนวัย (Mishra & Joshi, 2011) ปัจจุบันเป็นที่นิยมมากในการผลิตเป็นชาสมุนไพร ทำให้ความต้องการวัตถุดิบในท้องตลาดเพิ่มมากขึ้นจนเริ่มมีการปลูกกันแพร่หลายในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา กรมวิชาการเกษตร โดยศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน ได้ดำเนินการวิจัยสำรวจและรวบรวมปัญญาจันทร์พันธุ์พื้นเมือง และนำมาพัฒนาปรับปรุงพันธุ์จนได้พันธุ์ลูกผสมที่มีความสม่ำเสมอของพันธุ์ และมีคุณสมบัติโดดเด่นในการให้ผลผลิตและการให้สารสำคัญหลักสูง เช่น สารซาโปนิน (saponins) จนได้รับการพิจารณาจากกรมวิชาการเกษตรในปี พ.ศ. 2562 ให้เป็นพันธุ์พืชรับรอง จำนวน 2 พันธุ์ คือ ‘ปัญญาจันทร์พันธุ์เชียงราย 1’ (ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, 2562a) และ ‘ปัญญาจันทร์พันธุ์เชียงราย 2’ (ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, 2562b) โดยปัญญาจันทร์ทั้ง 2 พันธุ์ เป็นลูกผสมสลับพ่อพันธุ์แม่พันธุ์กันของพันธุ์จีนสิบสองปันนากับพันธุ์พื้นเมืองสันกำแพง แสดงให้เห็นว่า ปัญญาจันทร์พันธุ์พื้นเมืองของไทยมีศักยภาพที่จะใช้เป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ปัญญาจันทร์ในประเทศไทยให้มีความหลากหลายของสายพันธุ์มากขึ้น นักวิจัย (ศศิธร วรปิติรังสีและคณะ สังกัดศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร) ได้เก็บรวบรวมปัญญาจันทร์พันธุ์พื้นเมืองของไทยที่มีลักษณะโดดเด่นจากพื้นที่ต่างๆ ในจังหวัดเชียงรายจำนวน 7 พันธุ์ คือพันธุ์ดอยตุง 1, พันธุ์ดอยตุง 2, พันธุ์เชียงของ, พันธุ์วาวี 1, พันธุ์วาวี 2, พันธุ์เวียงแก่น 2 และพันธุ์เวียงแก่น 4 จากจังหวัดเชียงใหม่ 2 พันธุ์ คือ พันธุ์สันกำแพง และพันธุ์อ่างขาง และจากจังหวัดแพร่ จำนวน 1 พันธุ์ คือ พันธุ์แพร่ 1 โดยได้กำหนดชื่อปัญญาจันทร์ทั้ง 10 พันธุ์ตามแหล่งที่เก็บสำรวจพบเพื่อให้ง่ายต่อการจดจำ และพบว่าปัญญาจันทร์พันธุ์พื้นเมืองทั้ง 10 พันธุ์นี้ มีลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างกัน

ความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาของปัญญาจันทร์พันธุ์พื้นเมือง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาความหลากหลายและอนุกรมวิธานของพืชสกุลปัญญาจันทร์ (*Gynostemma* Blume) ในประเทศไทยและในเขตพรรณพฤกษชาติ Malesiana (De Wilde and Duyfjes, 2007, 2008, 2010) ที่ได้จำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ของปัญญาจันทร์คือ *G. pentaphyllum* (Thunb.) Makino ออกเป็น 7 forma ซึ่ง forma ต่างๆ ของพืชชนิดเดียวกันนี้มีรูปร่าง

ลักษณะแตกต่างกันไปหลายรูปแบบตามสภาพแวดล้อมที่พืชเหล่านี้อาศัยอยู่ (ecotype) ซึ่งเป็นผลจากการปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพท้องถิ่นนั้นๆ เช่นเดียวกับปัญจชันธุ์พันธุ์พื้นเมืองทั้ง 10 พันธุ์ที่มีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากเจริญเติบโตมาจากต่างพื้นที่กัน จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบระบุชื่อปัญจชันธุ์พันธุ์พื้นเมืองของไทยว่ามีลักษณะทางสัณฐานสอดคล้องกับ forma ใด อย่างไรก็ดี ในประเทศจีน ซึ่งเป็นศูนย์กลางของความหลากหลายของพืชสกุลปัญจชันธุ์ อีกทั้งเป็นพื้นที่ที่มีการผลิตและใช้ประโยชน์จากพืชปัญจชันธุ์มากในระดับต้นของโลก ได้จำแนกชื่อปัญจชันธุ์แตกต่างจากการจำแนกในเขตประเทศไทยและในเขตพรรณพฤกษชาติ Malesiana การเปลี่ยนแปลงชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชตามหลักอนุกรมวิธานที่ขัดแย้งกันระหว่างนักพฤกษอนุกรมวิธาน ได้สร้างความสับสนในการเรียกชื่อปัญจชันธุ์ให้ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน โดยจากรายงานการศึกษาพืชสกุลปัญจชันธุ์ในประเทศจีน (Chen et al., 2011; Wu and Chen, 1983) พบว่า ชื่อในระดับ forma ของ *G. pentaphyllum* (De Wilde and Duyfjes (2007) ถูกยกขึ้นมาในระดับชนิด (species) และสายพันธุ์ (variety) แต่ด้วยลักษณะทางสัณฐานที่ใกล้เคียงกันมาก ทำให้พบความคาบเกี่ยวกันของข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของชื่อพืชในสกุลปัญจชันธุ์ที่มีการรายงานการกระจายพันธุ์ในประเทศจีน ดังนั้น การจำแนกปัญจชันธุ์พันธุ์พื้นเมืองในประเทศไทยเหล่านี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจจะยังมีความคลุมเครือไม่ชัดเจน การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ด้วยวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ควบคู่กันไปจึงเป็นเครื่องมือช่วยยืนยันความถูกต้องของปัญจชันธุ์พันธุ์พื้นเมืองได้น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมต้องมีการใช้ตรวจสอบข้อมูลดีเอ็นเอในปัญจชันธุ์สำเร็จมาก่อน ซึ่งมีรายงานการใช้ chloroplast DNA universal region ในการแยกความแตกต่างในระดับชนิดและระดับสายพันธุ์ (cultivar) ของพืชได้ ในการจำแนกชนิดของสกุลปัญจชันธุ์ในเกาหลีใต้ได้ใช้ยีน acetyl-CoA carboxylase beta subunit (*accD*), cytochrome b6/F complex subunit IV (*petD*), photosystem II 47 kDa protein (*pabB*) และ photosystem I assembly protein (*ycf3*) (Abid et al., 2019) ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากยีนเหล่านี้จึงน่าจะเหมาะสมในการตรวจสอบความแตกต่างของปัญจชันธุ์พันธุ์พื้นเมืองของไทย รวมถึงพันธุ์ลูกผสมที่มีความสม่ำเสมอของพันธุ์แล้วได้ด้วยเช่นกัน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ของปัญจชันธุ์พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม และ 2) ศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปัญจชันธุ์พันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ลูกผสมที่มีคุณสมบัติสม่ำเสมอแล้ว และจัดทำเป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการระบุยืนยันชื่อปัญจชันธุ์ในประเทศไทย

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

การวิจัยนี้ เป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานและข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปัญจชันธุ์ โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชจาก ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชสวน ศึกษาลักษณะทางสัณฐาน ศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอ และเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของปัญจชันธุ์ ที่สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร โดยมีระยะเวลาดำเนินงานตั้งแต่เดือนตุลาคม 2562 ถึงเดือนกันยายน 2564

ตัวอย่างพืชปัญจชันธุ์ที่ใช้ศึกษา มีจำนวน 20 พันธุ์ ประกอบด้วย พันธุ์พื้นเมือง จำนวน 10 พันธุ์ คือ ดอยตุง 1, ดอยตุง 2, เชียงของ, แพร่ 1, วาวี 2, วาวี 4, เวียงแก่น 1, เวียงแก่น 2, สันกำแพง, และอ่างขาง; พันธุ์ลูกผสม จำนวน 9 สายพันธุ์ แยกเป็น 1) สายพันธุ์ลูกผสมที่มีลักษณะสม่ำเสมอ จำนวน 2 พันธุ์ คือ เชียงราย 1, และเชียงราย 2, และ 2) สายพันธุ์ลูกผสมที่ลักษณะยังไม่สม่ำเสมอ จำนวน 7 พันธุ์ คือ ลูกผสม 1-7, ลูกผสม 1-9, ลูกผสม 1-11, ลูกผสม 1-13, ลูกผสม 1-19, ลูกผสม 2-10 และลูกผสมจีน-พื้นเมือง ใช้ศึกษาเป็นตัวเปรียบเทียบความใกล้ชิดของพันธุ์ลูกผสมด้วยกัน และความใกล้ชิดกับพันธุ์พ่อแม่; และพันธุ์จีนสิบสองปันนา เป็นพันธุ์ที่

นำเข้ามาจากประเทศจีนเพื่อเป็นคู่ผสมพันธุ์ ใช้ศึกษาเป็นตัวเปรียบเทียบความใกล้ชิดกับพันธุ์ลูกผสมและพันธุ์พื้นเมืองของไทย

ปัจจุบันพันธุ์ลูกผสมทั้ง 9 สายพันธุ์ มีเพียงพันธุ์เชียงราย 2 ที่มีพันธุ์พื้นเมืองสันกำแพงเป็นพันธุ์แม่และพันธุ์สืบสองปีนนาเป็นพันธุ์พ่อ พันธุ์อื่นๆ มีพันธุ์จีนสืบสองปีนนาเป็นพันธุ์แม่และพันธุ์พื้นเมืองสันกำแพงเป็นพันธุ์พ่อ

วิธีการ

1. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ของปัจจุบันพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม

1.1 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของปัจจุบันพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม

1) ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของปัจจุบันพันธุ์ โดยตรวจสอบและบันทึกข้อมูลของตัวอย่างปัจจุบันพันธุ์ลักษณะละ 10 ตัวอย่าง หรือบางลักษณะใช้ตัวอย่างตัวแทนเท่าที่มีปรากฏ ดังนี้

- พิจารณาลักษณะของราก (root) ลำต้น (stem) และมือพัน (tendrils)

- พิจารณาจากลักษณะของใบ (leaf) ประกอบด้วยชนิดของใบ (leaf type) ลักษณะเนื้อสัมผัส (texture) สี (color) รูปทรง (shape) ขนาด (size) โคนใบ (leaf base) ปลายใบ (leaf apex) ขอบใบ (leaf margin) เส้นใบ (leaf veins) ลักษณะผิวใบ (leaf ornamentation) ก้านใบ (petiole)

- พิจารณาชนิดของช่อดอก (inflorescence) และสิ่งปกคลุม (ornamentation)

- พิจารณารูปแบบของดอกว่าเป็นแบบดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) หรือแยกเพศ (dioecious/monoecious) สี (color) กลีบเลี้ยง (sepals) กลีบดอก (petals) เกสรเพศผู้ (stamens) เกสรเพศเมีย (carpels) แบบของรังไข่ (ovary type)

- พิจารณาลักษณะชนิดของผล (fruit type) รูปทรง (fruit shape) ขนาด (fruit size) สิ่งปกคลุม (fruit ornamentation) และสี (fruit color)

- พิจารณาลักษณะของเมล็ด (seed type) รูปทรง (seed shape) ขนาด (seed size) ผิวสัมผัส (seed texture) สี (seed color) จำนวนเมล็ดต่อผล (seed numbers)

2) จัดแบ่งกลุ่มปัจจุบันพันธุ์ทั้ง 20 พันธุ์ ตามลักษณะความเหมือนและความแตกต่างของลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ศึกษาข้างต้น

1.2 การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของปัจจุบันพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม

พิจารณาลักษณะเฉพาะของปัจจุบันพันธุ์ทั้ง 20 พันธุ์ ที่ศึกษาในข้อ 1.1 ตรวจสอบเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุล *Gynostemma* Blume โดยใช้คู่มือการจัดจำแนกสกุล *Gynostemma* ของวงศ์แตง (Cucurbitaceae) ใน Flora of Thailand (De Wilde and Duyfjes, 2008), Flora Malesiana (De Wilde and Duyfjes, 2010) และ Flora of China (Chenet *al.*, 2011) โดยตรวจสอบยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของปัจจุบันพันธุ์ที่ศึกษาตามขั้นตอน ดังนี้

1) ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาที่เด่นด้วยรูปวิธานระบุชนิด (key to species)

2) เมื่อได้ผลตรวจสอบระบุชนิดจากรูปวิธานแล้ว ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาทั้งหมดที่พิจารณาได้เปรียบเทียบกับคำอธิบายพืช (plant description) ชนิดนั้นๆ ว่าสอดคล้องหรือมีความแตกต่างกัน เพื่อระบุยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชที่ศึกษา

2. ศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปัจจุบันพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสมที่มีคุณสมบัติสม่ำเสมอแล้ว

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนใบของปญจขันธ์ 20 พันธุ์ ที่เก็บรวบรวมและรักษาสภาพไว้ใน silica gel มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink Plant Total DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ตามกรรมวิธีของบริษัท แล้วตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอของปญจขันธ์ที่สกัดได้ด้วยวิธี Electrophoresis ใน Agarose gel 1% ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 15 นาที ในสารละลาย 0.5X TBE บันทึกภาพดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง Azure 200 (Azure Biosystems, Inc., USA) และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณคลอโรพลาสต์ด้วยไพรเมอร์ของตำแหน่งยีน *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3* ที่ออกแบบโดย Abid *et al.* (2019) โดยมีรายละเอียดลำดับเบสของคู่ไพรเมอร์ของแต่ละยีน ดังนี้

- <i>accD</i> ประกอบด้วยไพรเมอร์	<i>accDF</i> ลำดับเบสจาก 5'→3' คือ CCCATTGAATTCATTCGGAGGAGG
	<i>accDR</i> ลำดับเบสจาก 5'→3' คือ CGATGTAGGCATTGGGTTCCG
- <i>petD</i> ประกอบด้วยไพรเมอร์	<i>petDF</i> ลำดับเบสจาก 5'→3' คือ GGATCTAAAGAAGAACATAGGCTGGCT
	<i>petDR</i> ลำดับเบสจาก 5'→3' คือ TGCTACTGGACGACGAAATGG
- <i>psbB</i> ประกอบด้วยไพรเมอร์	<i>psbBF</i> ลำดับเบสจาก 5'→3' คือ GTTTATCAGAACTTGGTCTAAAATTCCA
	<i>psbBR</i> ลำดับเบสจาก 5'→3' คือ TCCAAGTTTTTGAATGCCCA
- <i>ycf3</i> ประกอบด้วยไพรเมอร์	<i>ycf3F</i> ลำดับเบสจาก 5'→3' คือ GCAAGTTCGATCCCGATAAAGAAAA
	<i>ycf3R</i> ลำดับเบสจาก 5'→3' คือ GCTTCTTCTTGAGGTGCAATTTAGAAAT

นำดีเอ็นเอของปญจขันธ์ทั้ง 20 ตัวอย่าง เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ในสารละลายของแต่ละปฏิกิริยา ใช้ชุดน้ำยาปฏิกิริยาพีชีอาร์ Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) ปริมาตร 25 μ l ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 100 ng ปริมาตร 1.5 μ l คู่ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 μ M ข้างละ 2.5 μ l และเติมน้ำให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μ l และเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่อง GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) ใช้สภาวะเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาในขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (initial denaturation) ที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอใน 3 ขั้นตอน จำนวน 25 รอบ ประกอบด้วยขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (denaturation) ที่ 95°C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่ 58°C เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (extension) ที่ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที ตามด้วยขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์รอบสุดท้าย (final extension) ที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Electrophoresis ใน Agarose gel 1.5% ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 15 นาที ในสารละลาย 0.5X TBE บันทึกภาพดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบริเวณ *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3* ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี BTSeq™ (Barcode-Tagged Seq) (Celeomics, Inc., Korea) ตามกรรมวิธีของบริษัท และตรวจสอบความปนเปื้อนด้วยโปรแกรม BlastN บนฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) แล้วจึงตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit 7 (Hall, 1999)

2.4 การจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกัน (alignment) ในแต่ละยีน

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนของพืชที่นำมาจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกัน (alignment) นำมาจาก 2 แหล่งข้อมูล คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนของพืช 20 พันธุ์ที่วิเคราะห์ได้ในข้อ 2.3 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนของพืชจากต่างประเทศที่มีการบันทึกเผยแพร่ข้อมูลไว้บนระบบ GenBank, NCBI จำนวน 10 ชนิด (species) จาก 11 taxa ประกอบด้วย *G. burmanicum* NC036141, *G. caulopterum* NC036135, *G. compressum* NC037179, *G. laxiflorum* NC036134, *G. longipes* NC036140, *G. microspermum* MZ286581, *G. pentagynum* NC036136, *G. pentaphyllum* KT695603, *G. pentaphyllum* NC029484, *G. pubescens* NC036142, *G. yixingense* NC053537 รวมทั้งสิ้น 31 taxa ใช้เป็นตัวอย่างในกลุ่มที่ศึกษา (ingroups) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 2 taxa ได้แก่ *Coccinia grandis* NC031834, *Trichosanthes kirilowii* NC041088 ใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่มที่ศึกษา (outgroups) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ดาวน์โหลดจากฐานข้อมูลของ NCBI ที่นำมาใช้ในการจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบนี้ได้ตัดเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3* จากจีโนมคลอโรพลาสต์ที่สมบูรณ์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาทั้งหมดมาจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบในโปรแกรม BioEdit 7 (Hall, 1999) ด้วยวิธี Multiple alignment ของโปรแกรม ClustalW (Thomson *et al.*, 1994) และตรวจสอบความถูกต้องของการจัดเรียงด้วยตาเปล่าอีกครั้ง

2.5 การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งจำเพาะบริเวณ *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3* ในเมตริกซ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) ในโปรแกรม MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละยีนแยกกัน เพื่อเปรียบเทียบให้เห็นความสัมพันธ์ของตัวอย่างในแต่ละชนิดด้วยข้อมูลดีเอ็นเอจากทั้ง 4 ยีน หากความสัมพันธ์ไม่ขัดแย้งกันจึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ยีนร่วมกัน โดย Model best fit ที่เลือกมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อสร้าง Maximum Likelihood tree ได้แสดงไว้ในตาราง 3.2.2 โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates (Felsenstein, 1985) ประเมินค่า Bootstrap Percentages (BPs) ที่ 85-100% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับสูง, 75-84% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับกลาง, 50-74% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับต่ำ และ <50% เป็นค่าที่ไม่สนับสนุนความเชื่อมั่น

3. จัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม เพื่อใช้ประกอบการระบุยืนยันชื่อพืชพันธุ์ในประเทศไทย

1) เก็บรวบรวมชิ้นตัวอย่างยีนของพืชที่ศึกษาทั้ง 20 พันธุ์ ในสภาพสมบูรณ์ ประกอบด้วยส่วนลำต้น ใบ มือพัน หรือส่วนสืบพันธุ์ (ดอก/ผล) จัดทำเป็นตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (herbarium specimen) สำหรับจัดทำเป็นตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย (herbarium voucher specimens) ตามกรรมวิธีการจัดทำพรรณไม้แห้งสากลตามคู่มือ The Herbarium Handbook (Bridson & Forman, 1998)

2) ส่งตัวอย่างพรรณไม้แห้งของยีนของพืชทั้ง 20 ตัวอย่าง ไปอบน้ำยารักษาสภาพตัวอย่าง ผนึกชิ้นตัวอย่าง และลงทะเบียนเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร (Bangkok Herbarium, BK) และบันทึกข้อมูลพรรณไม้ในระบบคอมพิวเตอร์ เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการตรวจสอบลักษณะทางพฤกษศาสตร์ชื่อวิทยาศาสตร์ และใช้อ้างอิงเชื่อมโยงกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชพันธุ์ที่ศึกษาทั้ง 20 พันธุ์

3) จัดทำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้ตามขั้นตอนที่แสดงไว้ GenBank Submission Handbook (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/tbl2asn2/>) โดยข้อมูลดีเอ็นเอของแต่ละ

ละยีนให้อ้างอิงถึงหมายเลขตัวอย่างพรรณไม้แห่งอ้างอิงและข้อมูลพรรณไม้ที่ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

4) จัดส่งข้อมูลดีเอ็นเอลงทะเบียนเก็บรักษาไว้บนระบบ GenBank, NCBI และรับหมายเลขเฉพาะของดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการอ้างอิง

ผลการวิจัย (Results)

1. ลักษณะสัณฐานวิทยาและจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ของพันธุ์พืชพื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม

1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพันธุ์พืชพื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม

1.1.1 ลักษณะสัณฐานร่วมของพันธุ์พืชพื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม

จากผลการศึกษา พบว่า ลักษณะทางสัณฐานของพันธุ์พืชพื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม รวมทั้งพันธุ์จีนที่มีอายุการปลูก 4 เดือน มีลักษณะร่วมที่เหมือนกันของราก ลำต้น มือพัน ขน ใบ ช่อดอก/ดอก และผล/เมล็ด(ภาพที่ 3.2.1) ดังนี้

ลักษณะพืช	รายละเอียดลักษณะสัณฐาน
ราก	อยู่ใต้ดินและบริเวณข้อของลำต้น มีสีขาวถึงน้ำตาลอ่อน
ลำต้น	เป็นเถาเลื้อย หนา 1.5-3.7 เซนติเมตร ยาว 1.3-5.20 เมตร เป็นร่องตามยาว ผิวค่อนข้างเกลี้ยงหรือมีขนปกคลุม
มือพัน (tendrils)	รูปเส้นด้าย (filiform) ปลายแยกเป็น 2 แฉก เมื่ออายุมากขึ้นปลายแฉกจะม้วนหด
ขน (trichome)	ขนแบบหลายเซลล์ (multicellular trichome) ผนังหนา รูปกรวยหรือยี่ดียวออก มีสันตามขวาง ปลายแหลมมีขนาดยาวตั้งแต่ 100-650 ไมโครเมตร ความกว้างที่ฐาน 50-100 ไมโครเมตร
ใบ	ก้านใบมีขนกระจายทั่วไป ก้านใบย่อยสั้น ใบรูปคล้ายตีนเป็ด มีใบย่อย 3-7 ใบ (subpedately 5-7-foliolate) ใบย่อยส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นรูปรีหรือค่อนข้างรูปไข่กลับ ใบย่อยกลางมีขนาดใหญ่สุด ใบย่อยด้านนอกมีขนาดเล็กสุด ใบมีสีเขียวถึงเขียวเข้ม (สีเขียวจัดพบในพันธุ์ดอยตุง 1) ใบด้านบนมีขนปกคลุมกระจายทั่วไป ด้านล่างใบมีขนปกคลุมเฉพาะเส้นใบ เส้นใบข้างละ 5-9 เส้น ฐานใบรูปหัวใจ ขอบใบหยักซี่ฟัน (dentate) ส่วนใหญ่พบเป็นหยักห่าง หรือพบทั้งหยักห่างและถี่ในใบเดียวกันแบบไม่สมมาตร มีติ่งหนามสั้นที่หยัก ปลายใบเรียวแหลมมีติ่งหนามสั้น ความยาวส่วนปลายใบ (acumen) ในแต่ละพันธุ์แตกต่างกันตั้งแต่ 2-13 มิลลิเมตร
ช่อดอก/ดอก	ดอกแยกเพศต่างต้น (dioecious) ช่อดอกแบบช่อแยกแขนง ช่อดอกเพศผู้ยาว (2-)3-13 เซนติเมตร มี 5-15 ช่อย่อย ช่อดอกเพศเมียยาว 3-9.5 เซนติเมตร มี 6-11 ช่อย่อย ปกติช่อดอกเพศเมียมีขนาดเล็กกว่าช่อดอกเพศผู้ ดอกมีสีขาวออกเขียว กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีอย่างละ 5 กลีบ ดอกเพศผู้มีเกสร 5 อัน ดอกเพศเมียมีรังไข่เกินกิ่งอยู่ใต้วงกลีบ ก้านเกสรเพศเมียมี 3 อัน ส่วนปลายแยกเป็น 2 แฉก ยกเว้นพันธุ์ลูกผสมเชียงใหม่ 2 ที่ไม่มีการติดดอกติดผล
ผล/เมล็ด	รูปร่างทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-8 มิลลิเมตร ผลอ่อนสีเขียว เมื่อแก่จัดจะมีสี

เหลือง และเป็นสีดำเมื่อสุก มีขนนุ่มปกคลุมผิวผล มีเมล็ด 2-3 เมล็ดต่อผล เมล็ดมีผิว
ขรุขระแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์

1.1.2 ลักษณะสัณฐานที่แตกต่างของพันธุ์ 20 พันธุ์

จากผลการศึกษา พบว่า ลักษณะสัณฐานที่แยกความแตกต่างของพันธุ์แต่ละพันธุ์ คือ ลักษณะใบและ
เมล็ด แยกอธิบายรายละเอียดได้ ดังนี้

1) ความแตกต่างของพันธุ์แยกด้วยลักษณะของใบ

ผลการศึกษาลักษณะใบที่แตกต่างของพันธุ์ จำนวน 7 ลักษณะ คือ รูปร่างวงใบ ขนาดเส้น
ผ่านศูนย์กลางวงใบ จำนวนใบ ขนาดของใบย่อยกลาง ความยาวของส่วนปลายใบ (acumen) และจำนวนหยักของ
ขอบใบ (ตารางที่ 3.2.1) พบว่า ลักษณะที่สามารถใช้แยกพันธุ์ทั้ง 20 พันธุ์ ออกจากกันได้ คือ

- รูปร่างวงใบ สามารถแยกพันธุ์พันธุ์เชิงรายชื่อ 2 ที่มีรูปร่างกลมออกจากพันธุ์พันธุ์อื่นๆ
อีก 19 พันธุ์ ที่มีรูปร่างเป็นรูปไข่

- เส้นผ่านศูนย์กลางใบ สามารถแยกพันธุ์ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง
ใบสั้น มีจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ ลูกผสม 1-9, ลูกผสม 1-11, ลูกผสม 1-13, ลูกผสม 1-19, ลูกผสม 2-10 และสัน
กำแพง; กลุ่มที่ 2 เส้นผ่านศูนย์กลางใบยาวปานกลาง มีจำนวน 9 พันธุ์ ได้แก่ ลูกผสม 1-7, สิบสองปันนา, อ่างขวาง
, ดอยตุง 2, เวียงแก่น 1, วาวี 2, วาวี 4, เชียงของ และแพร่ 1; และกลุ่มที่ 3 มีเส้นผ่านศูนย์กลางใบยาว มีจำนวน
5 พันธุ์ ได้แก่ เชียงราย 1, เชียงราย 2, ลูกผสมจีน-พื้นเมือง ดอยตุง 1, และเวียงแก่น 2

- ขนาดของใบย่อยกลาง สามารถแยกพันธุ์ได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีใบย่อยกลางขนาดเล็ก
มีจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ ลูกผสม 1-9, ลูกผสม 1-11, ลูกผสม 1-13, ลูกผสม 1-19, ลูกผสม 2-10 และสันกำแพง;
กลุ่มที่ 2 มีใบย่อยกลางขนาดปานกลาง มีจำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ เชียงราย 1, เชียงราย 2, ลูกผสม 1-7, ลูกผสม
จีน-พื้นเมือง, สิบสองปันนา, อ่างขวาง, เวียงแก่น 1, วาวี 2, วาวี 4 และเชียงของ; และกลุ่มที่ 3 มีใบย่อยกลางขนาด
ใหญ่ มีจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ดอยตุง 1, ดอยตุง 2, เวียงแก่น 2 และแพร่ 1

- รูปร่างของใบย่อยกลาง แยกพันธุ์ออกได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ใบย่อยกลางเป็นรูปรีป้อม มี
จำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ เชียงราย 1, เชียงราย 2, ลูกผสม 1-7, ลูกผสม 1-19, ลูกผสม 2-10, ลูกผสมจีน-พื้นเมือง,
สิบสองปันนา, เวียงแก่น 1, เวียงแก่น 2 และวาวี 2; กลุ่มที่ 2 ใบย่อยกลางเป็นรูปรี มีจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ลูกผสม
1-9, ลูกผสม 1-13, สันกำแพง, วาวี 4 และแพร่ 1; และกลุ่มที่ 3 ใบย่อยกลางเป็นรูปรีขอบขนาน มีจำนวน 5 พันธุ์
ได้แก่ ลูกผสม 1-11, อ่างขวาง, ดอยตุง 1, ดอยตุง 2 และเชียงของ

ส่วนจำนวนใบย่อย ความยาวส่วนปลายใบของใบย่อยกลาง และจำนวนหยักของขอบใบ เป็น
ลักษณะที่มีความคาบเกี่ยวกันระหว่างพันธุ์ ยากในการแบ่งกลุ่มความแตกต่างได้

2) ความแตกต่างของพันธุ์แยกด้วยลักษณะเมล็ด

ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานของเมล็ดพันธุ์ จำนวน 6 พันธุ์ คือ ดอยตุง 1, เชียงราย 1, สัน
กำแพง, สิบสองปันนา, อ่างขวาง (M-O) และลูกผสม 1-7 (ภาพที่ 3.2.2) พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของ
เมล็ดพันธุ์ออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

-กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย พันธุ์พันธุ์ดอยตุง 1 แสดงลักษณะสัณฐาน ดังนี้ เมล็ดทรงแบน
รูปร่างสามเหลี่ยมออกกลม ขนาด 3-4 x 3-3.5 มิลลิเมตร ผิวเมล็ดเป็นตุ่ม (verrucose) ขนาดเล็ก รูปร่างไม่
สม่ำเสมอ ผสมกับตุ่มนูนเป็นสันสูงขนาดใหญ่กระจายตัวไม่สม่ำเสมอทั่วเมล็ด ด้านข้างเมล็ดกว้าง ตรงกลางเป็น
ร่อง ขอบเมล็ดเป็นหยักยื่นยาวออกมาทั้งสองด้านชัดเจน ฐานเมล็ดรูปตัด (truncate) ปลายเมล็ดเรียวมน
(acuminate-obtuse) ถึงมน เมล็ดมีสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม (ภาพที่ 3.2.2A-C)

-กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ปญจขันธุ์พันธุ์เชียงใหม่ 1, สิบสองปันนา, อ่างขาง และลูกผสม 1-7แสดงลักษณะสัณฐาน ดังนี้ เมล็ดทรงแบน รูปร่างสามเหลี่ยมถึงสามเหลี่ยมรูปหัวใจ ขนาด 2-2.5 x 2-2.5 มิลลิเมตร ผิวเมล็ดเป็นตุ่มขนาดเล็ก รูปร่างไม่สม่ำเสมอ กระจายทั่วเมล็ด ด้านข้างเมล็ดกว้าง ตรงกลางเป็นร่อง ขอบเมล็ดหักชัดเจนทั้งสองด้าน แต่ไม่ยื่นยาวออกมาเด่นชัด บางครั้งขอบเมล็ดยกตัวนูนขึ้น พบได้ในพันธุ์เชียงใหม่ 1, สิบสองปันนา และอ่างขาง ฐานเมล็ดรูปตัดถึงรูปหัวใจ ปลายเมล็ดเรียวมนถึงมน เมล็ดมีสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม (ภาพที่ 3.2.2D-F, J-R)

-กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ปญจขันธุ์พันธุ์สันกำแพง แสดงลักษณะสัณฐาน ดังนี้ เมล็ดทรงออกกลม ขนาด 3 x 2.5 มิลลิเมตร ผิวเมล็ดมีตุ่มเล็ก กระจายตัวค่อนข้างสม่ำเสมอทั่วเมล็ด ด้านข้างเมล็ดกว้าง ตรงกลางเป็นร่อง ขอบเมล็ดหักกึ่งชัดเจนทั้งสองด้าน แต่ไม่ยื่นยาวออกมาเด่นชัด ฐานเมล็ดรูปตัด ปลายเมล็ดมน เมล็ดมีสีน้ำตาลเข้มถึงคล้ำดำ (ภาพที่ 3.2.2G-I)

ตารางที่ 3.2.1 แสดงลักษณะสัณฐานส่วนใบของปญจขันธุ์ที่มีอายุ 4 เดือน จำนวน 20 พันธุ์

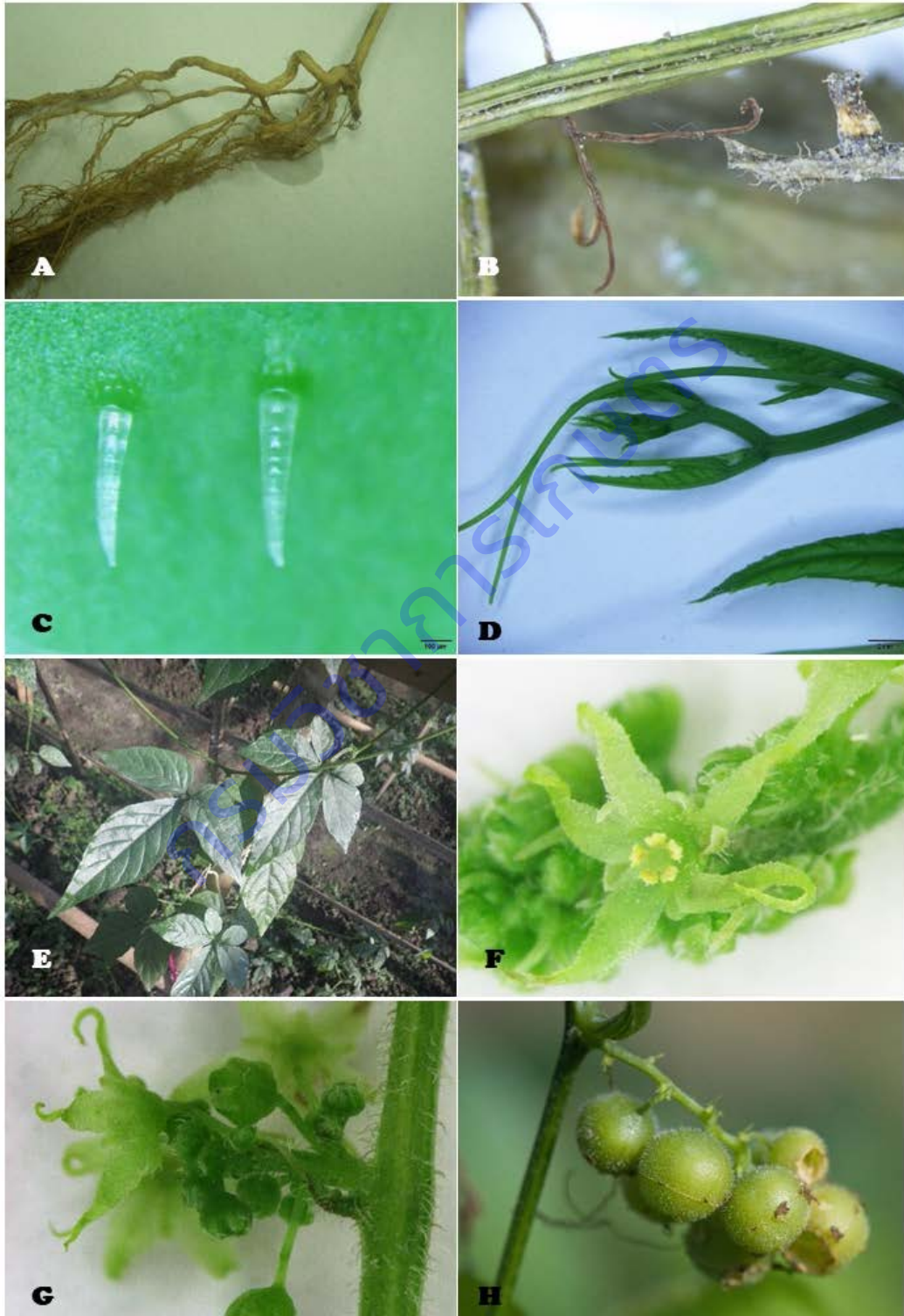
ชื่อพันธุ์ปญจขันธุ์	วงใบ		จำนวนใบย่อย	ใบย่อยกลาง			
	รูปร่างวงใบ	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)		ขนาด (ซม.)	ความกว้าง/ยาวของใบ	ความยาวส่วนปลายใบ (มม.)	จำนวนหยักขอบใบต่อข้าง
เชียงใหม่ 1	รูปไข่	13	5-7	4.5x8.5**	1.889*	5.5-7.5	8-14
เชียงใหม่ 2	รูปวงกลม	12.5	7	4x7**	1.75*	2-2.5	8-11
ลูกผสม 1-7	รูปไข่	10**	5-7	4.5x8.5**	1.889*	7-12.5	7
ลูกผสม 1-9	รูปไข่	7*	5	3x6*	2**	3	7-11
ลูกผสม 1-11	รูปไข่	6*	5	2x4.5*	2.25***	8	6-9
ลูกผสม 1-13	รูปไข่	6*	5	2x4*	2**	2	11
ลูกผสม 1-19	รูปไข่	6*	5	2x3.5*	1.75*	2.7-3.5	9-10
ลูกผสม 2-10	รูปไข่	5.5*	5	3x4.5*	1.5*	2-5	11
จิน-พื้นเมือง	รูปไข่	13	5	4x7.5**	1.875*	9	9
สิบสองปันนา	รูปไข่	10**	5	4.5x8**	1.778*	2-4	11
อ่างขาง	รูปไข่	10.5**	5-7	4x8.5**	2.125***	6.5-8	7-13
สันกำแพง	รูปไข่	6*	5	2x4*	2**	2-6	7
ดอยตุง 1	รูปไข่	15	3-5	6x15***	2.5***	3-7	12-13
ดอยตุง 2	รูปไข่	10**	5	5x10.5***	2.1**	3.5-5	18-20
เวียงแก่น 1	รูปไข่	8**	5	4x7.5**	1.875*	7-13	4-8
เวียงแก่น 2	รูปไข่	11	5-7	5x7.5***	1.5*	2-5	5-11
วาวี 2	รูปไข่	10**	5	4x7**	1.75*	5-6	5-11
วาวี 4	รูปไข่	8**	5(-6)	3.5x7**	2**	6-9	8-12
เชียงใหม่ของ	รูปไข่	9**	5(-6)	3.5x7.5**	2.143***	4-8.5	8-9
แพร่ 1	รูปไข่	10**	5	5x10***	2**	1.5-2	8-18

หมายเหตุ

-เส้นผ่านศูนย์กลางใบ : * = สั้น (5.5-7 ซม.), ** = กลาง (8-<11 ซม.), *** = ยาว (11-15 ซม.)

-ขนาดใบย่อยกลาง: * = เล็ก (2-3 x 3.5-6 ซม.), ** = กลาง (3.5-4.5 x 7-8.5 ซม.), *** = ใหญ่ (5-6 x 7.5-15)

ชื่อพันธุ์พืช	วงใบ		จำนวนใบย่อย	ใบย่อยกลาง			
	รูปร่างวงใบ	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)		ขนาด (ซม.)	ความกว้าง/ยาวของใบ	ความยาวส่วนปลายใบ (มม.)	จำนวนหยักขอบใบต่อข้าง
-อัตราความกว้าง/ความยาวของใบย่อยกลาง: * = รูปรีป้อม (1.5-<2), ** = รูปรี (2), *** = รูปรีขอบขนาน (>2)							



ภาพที่ 3.2.1 ลักษณะสัณฐานร่วมของพืช : ราก (A), ลำต้น (B), ขน (C), มือพัน (D), ใบ (E), ดอกเพศผู้ (F), ดอกเพศเมีย (G) และผล (H)



ภาพที่ 3.2.2 ลักษณะสัณฐานของเมล็ดปญจชั้น์ แสดงความแตกต่างของขนาด ลักษณะพื้นผิวเมล็ด และลักษณะด้านข้างเมล็ดของปญจชั้น์พันธุ์ดอยตุง 1(A-C), พันธุ์เชียงราย 1 (D-F), พันธุ์สันกำแพง (G-I), พันธุ์ลิบสองป็นนา (J-L), พันธุ์อ่างขาง (M-O) และพันธุ์ลูกผสม 1-7 (P-R)

1.2 การจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ของปญจชั้น์พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม

รายชื่อปัญญาชั้นในรูปวิธานระบุชนิดตามคู่มือการจำแนกพืชสกุล *Gynostemma* ใน Flora of Thailand (De Wilde and Duyfjes, 2008), Flora Malesiana (De Wilde and Duyfjes, 2010) และ Flora of China (Chenet *et al.*, 2011) มีจำนวน 16 ชนิด ประกอบด้วย *G. aggregatum* C.Y. Wu & S.K. Chen, *G. burmanicum* King ex Chakrav., *G. cardiospermum* Cogn. ex Oliv., *G. caulopterum* S.Z. He, *G. compressum* X.X. Chen & D.R. Liang, *G. guangxiense* X.X. Chen & D.H. Qin, *G. intermedium* W.J. de Wilde & Duyfjes, *G. laxiflorum* C.Y. Wu & S.K. Chen, *G. laxum* (Wall.) Cogn., *G. longipes* C.Y. Wu, *G. microspermum* C.Y. Wu & S.K. Chen, *G. papuanum* W.J. de Wilde & Duyfjes, *G. pentagynum* Z.P. Wang, *G. pentaphyllum* (Thunb.) Makino ใน Flora of Thailand และ Flora Malesiana: forma *pentaphyllum*, forma *dasycarpum* (C.Y. Wu in C.Y. Wu & S.K. Chen) W.J. de Wilde & Duyfjes, forma *fasciculare* W.J. de Wilde & Duyfjes, forma *grandiflorum* W.J. de Wilde & Duyfjes, forma *knemandrum* W.J. de Wilde & Duyfjes, forma *pubescens* (Gagnep.) W.J. de Wilde & Duyfjes และ forma *simplicifolium* (Blume) W.J. de Wilde & Duyfjes; ใน Flora of China : var. *pentaphyllum* และ var. *dasycarpum* C.Y. Wu], *G. simplicifolium* Blume และ *G. yixingense* (Z.P. Wang & Q.Z. Xie) C.Y. Wu & S.K. Chen โดยพิจารณาความเป็นไปได้ในการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของปัญญาชั้นนี้ จากลักษณะสัณฐานที่เหมือนกันกับปัญญาชั้นที่ศึกษาทั้ง 20 พันธุ์ ตามลำดับขั้นตอน ดังนี้

1) ปัญญาชั้นทั้ง 20 พันธุ์ มีความใกล้เคียงกับ *G. burmanicum*, *G. caulopterum*, *G. compressum*, *G. guangxiense*, *G. intermedium*, *G. laxum*, *G. longipes*, *G. papuanum*, *G. pentaphyllum* และ *G. simplicifolium* ด้วยลักษณะของผลแบบผลแห้งมีเนื้อหลายเมล็ด (dry berry) (ภาพที่ 3.2.1H) ในขณะที่ *Gynostemma* ชนิดอื่นๆ มีผลแบบผลแห้งแตก (capsular)

2) เมื่อพิจารณาจาก *Gynostemma* กลุ่มใกล้เคียงที่เหลือ 10 ชนิด พบว่าปัญญาชั้นที่ศึกษาทั้ง 20 พันธุ์ มีดอกแยกเพศอยู่ต่างต้น (dioecious) เหมือนกับ *G. burmanicum*, *G. caulopterum*, *G. compressum*, *G. intermedium*, *G. laxum*, *G. longipes*, *G. pentaphyllum* และ *G. simplicifolium* ในขณะที่ *G. guangxiense* และ *G. papuanum* มีดอกแยกเพศร่วมต้น (monoecious)

3) เมื่อพิจารณาจาก *Gynostemma* กลุ่มใกล้เคียงที่เหลือ 8 ชนิด พบว่า ปัญญาชั้นที่ศึกษาทั้ง 20 พันธุ์ มีจำนวนก้านเกสรเพศเมีย (style) 3 อัน (ภาพที่ 3.2.1G) เหมือนกับ *G. burmanicum*, *G. laxum*, *G. longipes*, *G. pentaphyllum* และ *G. simplicifolium* ในขณะที่ *G. caulopterum* และ *G. compressum* มีก้านเกสรเพศเมีย 2 อัน ส่วน *G. intermedium* ก้านเกสรเพศเมีย 5 อัน

4) เมื่อพิจารณาจาก *Gynostemma* กลุ่มใกล้เคียงที่เหลือทั้ง 5 ชนิด คือ *G. burmanicum*, *G. laxum*, *G. longipes*, *G. pentaphyllum* และ *G. simplicifolium* พบว่า ปัญญาชั้นที่ศึกษาทั้ง 20 พันธุ์ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะสัณฐานออกจากกลุ่มใกล้เคียงที่เหลือทั้ง 5 ชนิดได้ เนื่องจากลักษณะสัณฐานมีความคาบเกี่ยวกัน โดยใน Flora of China ได้อธิบายลักษณะของ *G. burmanicum* ไว้ว่าไม่มีขนปกคลุมส่วนผล ซึ่งจะคล้ายกับลักษณะผลของ *G. laxum* และ *G. longipes* แต่ไม่ได้อธิบายลักษณะนี้ของ *G. simplicifolium* ไว้ ซึ่งลักษณะนี้จะคาบเกี่ยวกับ *G. pentaphyllum* ที่พบได้ทั้งผลเกลี้ยงและมีขนปกคลุม ในขณะที่ปัญญาชั้นที่ศึกษาทั้ง 20 พันธุ์ มีแหล่งที่มาจากผลที่มีขนปกคลุมทั้งหมด (ภาพที่ 3.2.1H) ส่วน *G. simplicifolium* สามารถแยกออกจากชนิดอื่นด้วยลักษณะใบเดี่ยว แต่ใน Flora of Thailand และ Flora Malesiana ได้อธิบายพืชชนิดนี้ภายใต้ชื่อ *G. pentaphyllum* forma *simplicifolium* (Blume) W.J. de Wilde & Duyfjes ไว้ว่า สามารถพบใบย่อย 2-3 ใบ ซึ่งคาบเกี่ยวกับ *G. burmanicum* และ *G. laxum* ที่มี 3 ใบย่อย และปัญญาชั้นพันธุ์ดอยตุงที่มี 3-5 ใบย่อย (ภาพที่ 3.2.1E) ส่วน *G. longipes* และ *G. pentaphyllum* ที่อธิบายใน Flora of China มี 7-9 และ 3-9 ใบย่อย

ตามลำดับ ในขณะที่ใน Flora of Thailand และ Flora Malesiana อธิบายว่า *G. pentaphyllum* (ยกเว้น forma *simplicifolium*) มี 3-5(-7) ใบย่อย ซึ่งคาบเกี่ยวกับลักษณะของปัญจชันรติที่ศึกษาทั้ง 20 พันธุ์ คือ พันธุ์ ดอยตุง 1 มี 3 ใบย่อย, พันธุ์เชียงราย 2 มี 7 ใบย่อย, พันธุ์เชียงราย 1, ลูกผสม 1-7, อ่างขาง, เวียงแก่น 2, วาวี 4 และเชียงของ มี 5-7 ใบย่อย ส่วนพันธุ์อื่นที่เหลือมี 5 ใบย่อย (ตารางที่ 3.2.1) ซึ่งความคาบเกี่ยวของลักษณะทาง สันฐานเหล่านี้ ทำให้การระบุยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของปัญจชันรติที่ศึกษาทั้ง 20 พันธุ์ ได้ไม่ชัดเจน

5) พิจารณาความสัมพันธ์ของ *Gynostemma* กลุ่มใกล้เคียงที่เหลือทั้ง 5 ชนิด คือ *G. burmanicum*, *G. laxum*, *G. longipes*, *G. pentaphyllum* และ *G. simplicifolium* สามารถอธิบายเหตุผลได้จากความน่าเชื่อถือ ของผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ของคู่มือการจำแนกพืชสกุล *Gynostemma* โดยจะพิจารณาการยอมรับหรือไม่ยอมรับ สถานะของชื่อพืชทั้ง 5 ชนิดดังกล่าว กล่าวคือ

- *G. burmanicum* เป็นชื่อที่ได้รับการยอมรับในระดับชนิดในการศึกษาสกุลปัญจชันรติในประเทศ จีน โดย Wu and Chen ในปี ค.ศ. 1983 พวกเขาได้จำแนกพืชลงในระดับ variety และตั้งชื่อ var. *molle* C.Y. Wu ขึ้นมาใหม่ และได้รับการยอมรับต่อมาโดย Chen ในปี ค.ศ. 1995 ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 De Wilde and Duyfjes ได้ศึกษาสกุลปัญจชันรติในประเทศไทยและในเขตพรรณพฤกษชาติ Malesiana จึงได้ยุบชื่อชนิดนี้ และ variety ของมันให้อยู่ภายใต้ชื่อ *G. pentaphyllum* forma *pubescens* และในปี ค.ศ. 2011 Chen *et al.* ได้ ยอมรับชื่อนี้ในระดับชนิดอีกตาม Wu and Chen (1983) แต่ C. Jeffrey ซึ่งเป็นหนึ่งในนักวิจัยชุดเดียวกัน กลับมีความ เห็นต่างว่าชื่อชนิดและ variety ของมันควรให้ยุบไว้ในระดับ variety ที่มีขนหนาแน่นภายใต้ *G. pentaphyllum*

- *G. laxum* เป็นชื่อที่ได้รับการยอมรับในระดับชนิดในการศึกษาสกุลปัญจชันรติในประเทศจีน โดย Wu and Chen ในปี ค.ศ. 1983 ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 De Wilde and Duyfjes ได้ศึกษาสกุลปัญจชันรติใน ประเทศไทยและในเขตพรรณพฤกษชาติ Malesiana จึงได้ยุบชื่อชนิดนี้ให้อยู่ภายใต้ชื่อ *G. pentaphyllum* forma *pentaphyllum* ต่อมาในปี ค.ศ. 2011 Chen *et al.* ได้ยอมรับชื่อนี้ก็อีกตาม Wu and Chen (1983) แต่ C. Jeffrey ซึ่งเป็นหนึ่งในนักวิจัยชุดเดียวกัน กลับมีความเห็นต่างให้ชื่อชนิดนี้เป็นชื่อพ้องภายใต้ *G. pentaphyllum* สอดคล้องกับรายงานการศึกษาพืชในประเทศอินเดีย โดย Renner and Pandey ในปี ค.ศ. 2013

- *G. longipes* ถูกตั้งชื่อขึ้นมาใหม่ โดย Wu and Chen ในปี ค.ศ. 1983 และได้รับการยอมรับ ต่อมาโดย Chen ในปี ค.ศ. 1995 และ Chen *et al.* ในปี ค.ศ. 2011 ในการศึกษาพืชสกุลปัญจชันรติในประเทศจีน แต่ C. Jeffrey ซึ่งเป็นหนึ่งในนักวิจัยชุดเดียวกัน กลับมีความเห็นต่างให้ชื่อชนิดนี้เป็นชื่อพ้องภายใต้ *G. pentaphyllum*

- *G. simplicifolium* เป็นชื่อที่ได้รับการยอมรับในระดับชนิดในการศึกษาสกุลปัญจชันรติในประเทศ จีน โดย Wu and Chen ในปี ค.ศ. 1983 และได้รับการยอมรับต่อมาโดย Chen ในปี ค.ศ. 1995 ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 De Wilde and Duyfjes ได้ศึกษาสกุลปัญจชันรติในประเทศไทยและในเขตพรรณพฤกษชาติ Malesiana จึง ได้ยุบชื่อชนิดนี้ให้อยู่ภายใต้ชื่อ *G. pentaphyllum* forma *simplicifolium* และในปี ค.ศ. 2011 Chen *et al.* ได้ ยอมรับชื่อนี้ในระดับชนิดตาม Wu and Chen (1983) แต่ C. Jeffrey ซึ่งเป็นหนึ่งในนักวิจัยชุดเดียวกัน กลับมี ความเห็นต่างให้ชื่อชนิดนี้เป็นชื่อพ้องภายใต้ *G. pentaphyllum*

- *G. pentaphyllum* เป็นชื่อที่ได้รับการยอมรับในระดับชนิดในการศึกษาสกุลปัญจชันรติใน ประเทศจีน โดย Wu and Chen ในปี ค.ศ. 1983 พวกเขาได้จำแนกพืชลงในระดับ variety และตั้งชื่อ var. *dasycarpum* C.Y. Wu ขึ้นมาใหม่ แต่ในปี ค.ศ. 1995 Chen ได้ยกระดับ var. *dasycarpum* ขึ้นเป็นชนิด *G. dasycarpum* (C.Y. Wu et S.K. Chen) S.K. Chen และยอมรับชื่อชนิด *G. pentaphyllum* ที่มี *G. pubescens*

ถูกยุบเป็นชื่อพ้องไว้ ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 De Wilde and Duyfjes ได้ยอมรับชื่อ *G. pentaphyllum* โดยมี *G. simplicifolium*, *G. laxum*, *G. pubescens*, *G. dasycarpum* และ *G. burmanicum* ถูกยุบเป็นชื่อพ้องภายใต้ชนิดนี้ และจำแนกพืชลงในระดับ *forma pentaphyllum*, *forma dasycarpum*, *forma fasciculare*, *forma grandiflorum*, *forma knemandrum*, *forma pubescens* และ *forma simplicifolium* แต่ในปี ค.ศ. 2011 Chen *et al.* ยอมรับ *G. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* และ var. *dasycarpum* ตาม Wu and Chen (1983) ในการศึกษาพืชในประเทศจีน

จากความสับสนในการระบุชื่อพืชดังกล่าว ผลการศึกษาข้างต้น ดังนั้น ในขั้นตอนนี้ จึงสรุปผลการศึกษาปัญจพันธ์ทั้ง 20 พันธุ์ในเบื้องต้นว่า มีลักษณะทางสัณฐานสอดคล้องกับ *G. burmanicum*, *G. laxum*, *G. longipes*, *G. pentaphyllum* และ *G. simplicifolium* ซึ่งลักษณะสัณฐานที่ปรากฏไม่สามารถแสดงความโดดเด่นได้ถึงลักษณะ *forma* หรือ *variety* ตามที่นักพฤกษศาสตร์ได้จำแนกไว้

2. ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปัญจพันธ์พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสมที่มีคุณสมบัติสม่ำเสมอแล้ว

2.1 ความจำเพาะของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณคลอโรพลาสต์ 4 ยีน ในปัญจพันธ์ 20 พันธุ์

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดของคลอโรพลาสต์บริเวณจำเพาะของยีน *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3* พบว่า มีความจำเพาะสูงกับปัญจพันธ์ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ โดยมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *accD* (ภาพที่ 3.2.3 A) และ *psbB* (ภาพที่ 3.2.3 C) ได้ครบทั้ง 20 สายพันธุ์ คิดเป็น 100% และมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *petD* (ภาพที่ 3.2.3 B) และ *ycf3* (ภาพที่ 3.2.3 D) ได้ 19 สายพันธุ์ คิดเป็น 95% ซึ่งปัญจพันธ์พันธุ์พื้นเมืองแพร่และเชียงของ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยยีน *petD* และ *ycf3* ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอในแต่ละยีนในภาพเจลออกาโรสด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ยีน *accD* มีขนาดดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 400-500 คู่เบส ยีน *petD* มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 700-800 คู่เบส ยีน *psbB* มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 600 คู่เบส และยีน *ycf3* มีขนาดดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 200-300 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปัญจพันธ์ที่ได้จากทั้ง 4 ยีน โดยตัดบริเวณของส่วนไพรเมอร์ออกไป พบว่า ยีน *accD* มีขนาด 393 คู่เบส, ยีน *petD* มีขนาด 738 คู่เบส, ยีน *psbB* มีขนาด 558 คู่เบส และยีน *ycf3* มีขนาด 192 คู่เบส

ไทด์ Thiamine (T) เฉพาะในปัญจชั้นพันธุ์เขียงราย 2 ในตำแหน่งที่ 53 นอกจากนี้ ยังพบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ purine transition จาก A<->G ในตำแหน่งที่ 576, การแทนที่แบบ pyrimidine transition จาก C<->T ในตำแหน่งที่ 69 และ 244 และการแทนที่แบบ transversion จาก A<->T ในตำแหน่งที่ 52, จาก A<->T และ G<->T ในตำแหน่งที่ 576, จาก A<->C ในตำแหน่งที่ 148 และ 173

3) ยีน *psbB*

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปัญจชั้นพันธุ์ 20 พันธุ์ จำนวน 558 ตำแหน่ง พบว่า อัตราการ transition จาก A เป็น G, G เป็น A, T เป็น C และ C เป็น T มีค่า 32.06, 29.49, 12.06 และ 26.15 ตามลำดับ ส่วนอัตราการ transversion จาก A เป็น T และ G เป็น T มีค่า 0.04, A เป็น C และ G เป็น C มีค่า 0.02, T เป็น A, T เป็น G, C เป็น A และ C เป็น G มีค่า 0.03 ค่าความถี่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide frequency) ของ A, T, C และ G มีค่า 24.78%, 33.05%, 15.24% และ 26.93% ตามลำดับ พบการแทนที่แบบ purine transition จาก A<->G ในตำแหน่งที่ 328 และ 444 และการแทนที่แบบ pyrimidine transition จาก C<->T ในตำแหน่งที่ 468

4) ยีน *ycf3*

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปัญจชั้นพันธุ์ 19 พันธุ์ จำนวน 192 ตำแหน่ง พบว่า อัตราการ transition จาก A เป็น G, G เป็น A, T เป็น C และ C เป็น T มีค่า 6.25, 9.72, 5.9 และ 11.46 ตามลำดับ ส่วนอัตราการ transversion จาก A เป็น T และ G เป็น T มีค่า 11.46, A เป็น C และ G เป็น C มีค่า 5.9, T เป็น A และ C เป็น A มีค่า 9.72, T เป็น G และ C เป็น G มีค่า 6.25 ค่าความถี่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide frequency) ของ A, T, C และ G มีค่า 29.17%, 34.38%, 17.71% และ 18.75% ตามลำดับ โดยไม่พบการแทนที่แบบในยีน *ycf3* ของปัญจชั้นพันธุ์ทั้ง 19 พันธุ์

2.3 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปัญจชั้นพันธุ์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ของยีน 4 ยีน

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลดีเอ็นเอของปัญจชั้นพันธุ์จำนวน 20 พันธุ์ ด้วยยีน *accD* และ *psbB* และจำนวน 19 พันธุ์ ด้วยยีน *petD* (ไม่รวมพันธุ์พื้นเมืองแพร่ 1) และยีน *ycf3* (ไม่รวมพันธุ์พื้นเมืองเขียงของ) โดยได้รวมพืชสกุล *Gynostemma* อีก 11 taxa ที่มีข้อมูลดีเอ็นเอเผยแพร่ออนไลน์ไว้บนระบบฐานข้อมูลของ GenBank, NCBI เพื่อช่วยยืนยันความใกล้ชิดของปัญจชั้นพันธุ์ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้กับชนิดพืชอื่นในสกุล *Gynostemma* โดยได้วิเคราะห์ข้อมูลดีเอ็นเอของแต่ละยีนแยกจากกัน และนำมาวิเคราะห์ร่วมกัน มีรายละเอียดผลสรุปค่าวิเคราะห์ของยีน *accD*, *petD*, *psbB*, *ycf3* และค่าวิเคราะห์ร่วมกัน *accD+petD+psbB+ycf3* ดังแสดงในตารางที่ 3.2.2

ตารางที่ 3.2.2 ค่าการวิเคราะห์ Maximum Likelihood ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Gynostemma* spp.

Characteristics/Gene	<i>accD</i>	<i>petD</i>	<i>psbB</i>	<i>ycf3</i>	Combined data
No. of taxa	33	32	33	32	33
No. of sites	393	746	557	192	1905
Model best fit	T92	T92+G	HKY	T92	HKY+G
Sum of branch lengths	0.047	0.110	0.047	0.111	0.078
AICc	1466.714	3119.642	2006.654	903.636	7198.873
BIC	1959.069	3635.650	2537.839	1332.905	7812.105
LnL	-667.014	-1495.644	-935.071	-387.138	-3531.360
Invar	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Characteristics/Gene	<i>accD</i>	<i>petD</i>	<i>psbB</i>	<i>ycf3</i>	Combined data
Gamma	n/a	0.080	n/a	n/a	0.140
Ts/Tv	0.501	0.654	4.237	1.575	1.003

1) แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปัญจพันธ์ด้วยยีน *accD*

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้อมูลดีเอ็นเอของปัญจพันธ์ด้วยยีน *accD* (ภาพที่ 3.2.4A) แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากของปัญจพันธ์ที่ศึกษาใหม่ทั้ง 20 พันธุ์ กับ *Gynostemma* อีก 11 taxa โดยมี *G. microspermum* MZ 286581 แยกตัวอยู่ที่ฐานของ phylogram โดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น ส่วนปัญจพันธ์ทั้ง 20 พันธุ์ และ *Gynostemma* อีก 10 taxa อยู่รวมกลุ่มกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 89% BS ภายในกลุ่มพบ *G. laxiflorum* NC036134 กับ *G. yixingense* NC053537 จับคู่กันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 63% BS (Clade A) และ *G. pentagynum* NC036136 จับกลุ่มกับ *G. caulopterum* NC036135 และ *G. compressum* NC037179 ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 69% BS (Clade B) โดย 2 ชนิดหลังจับคู่กันแสดงความใกล้ชิดกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 70% BS

2) แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปัญจพันธ์ด้วยยีน *petD*

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้อมูลดีเอ็นเอของปัญจพันธ์ด้วยยีน *petD* (ภาพที่ 3.2.4B) แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดของปัญจพันธ์ที่ศึกษาใหม่ทั้ง 19 พันธุ์ (ไม่รวมพันธุ์พื้นเมืองแพร่ 1) กับ *Gynostemma* อีก 11 taxa โดยมี *G. microspermum* MZ 286581 แยกตัวอยู่ที่ฐานของ phylogram โดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นเช่นเดียวกับในแผนภูมิของ *accD* ส่วนตัวอย่างพืชที่เหลือจับกลุ่มด้วยกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 80% BS ภายในกลุ่มพบ *G. laxiflorum* NC036134 กับ *G. yixingense* NC053537 จับคู่กันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 99% BS (Clade A), *G. caulopterum* NC036135 และ *G. compressum* NC037179 จับคู่กันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 98% BS (Clade B) ตัวอย่างพืชที่เหลือ (ยกเว้น *G. pentagynum* NC036136) จับกลุ่มกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 90% BS (Clade C) ส่วน *G. pentagynum* NC036136 แสดงความเป็น polytomy กับ Clade A, B และ C โดยภายใน Clade C พบการจับกลุ่มย่อยแสดงความใกล้ชิดของตัวอย่างพืชออกเป็น 3 กลุ่มย่อย (Subclade C1, C2 และ C3) อย่างชัดเจน ดังนี้ :Subclade C1 พบ *G. longipes* NC036140, *G. pentaphyllum* NC029484 และ *G. pentaphyllum* KT695603 จับกลุ่มกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 83% BS และทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวจับคู่แสดงความใกล้ชิดกับปัญจพันธ์ลูกผสมเชียงราย 2 ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 61% BS และตัวอย่างพืชทั้ง 4 ตัวอย่างจับคู่แสดงความใกล้ชิดกับปัญจพันธ์พันธุ์พื้นเมืองสันกำแพงด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 62% BS; Subclade C2 พบการจับกลุ่มกันของปัญจพันธ์พันธุ์พื้นเมืองดอยตุง 1, ดอยตุง 1, วาวี 2, เวียงแก่น 1, เวียงแก่น 2 และพันธุ์ลูกผสมจิน-พื้นเมือง ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 60% BS; และ Subclade C3 พบการจับกลุ่มของปัญจพันธ์พันธุ์พื้นเมืองเชียงใหม่ของ, วาวี 4, อ่างช้าง, พันธุ์ลูกผสมเชียงราย 1, ลูกผสม 1-7, ลูกผสม 1-9, ลูกผสม 1-11, ลูกผสม 1-13, ลูกผสม 1-19, ลูกผสม 2-10 และพันธุ์จีนสิบสองปันนา ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 61% BS นอกจากนี้ ยังพบว่า *G. burmanicum* NC036141 และ *G. pubescens* NC036142 จับกลุ่มแสดงความใกล้ชิดกับสมาชิกของ Subclade C1, C2 และ C3 ภายใน Clade C โดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น

3) แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปัญจพันธ์ด้วยยีน *psbB*

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้อมูลดีเอ็นเอของปัญจพันธ์ด้วยยีน *psbB* (ภาพที่ 3.2.5A) แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดของปัญจพันธ์ที่ศึกษาใหม่ทั้ง 20 พันธุ์ กับ *Gynostemma* อีก 11 taxa โดยมี *G. microspermum* MZ 286581 แยกตัวอยู่ที่ฐานของ phylogram โดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น

เช่นเดียวกับในแผนภูมิของ *accD* และ *petD* ส่วนตัวอย่างพืชที่เหลือจับกลุ่มด้วยกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 68% BS ภายในกลุ่มพบ *G. laxiflorum* NC036134 กับ *G. yixingense* NC053537 จับคู่กันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 95% BS (Cluster A) โดยมี *G. caulopterum* NC036135, *G. compressum* NC037179 และ *G. pentagynum* NC036136 แสดงความใกล้ชิดกับ Cluster A และสมาชิกที่เหลือ (ซึ่งรวมกลุ่มกันอยู่ใน Cluster B) โดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น ภายใน Cluster B พบสมาชิกจับกลุ่มกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 62% BS โดยพบ *G. longipes* NC036140, *G. pentaphyllum* NC029484, *G. pentaphyllum* KT695603, ปญจขันธุ์พันธุ์พื้นเมืองสันกำแพง และพันธุ์ลูกผสมเชียงราย 2 แสดงความใกล้ชิดกับสมาชิกอื่นๆ ที่เหลือ (ซึ่งจับกลุ่มกันเป็นกลุ่มย่อย Subcluster B1) โดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นซึ่งเมื่อพิจารณาความใกล้ชิดของสมาชิกใน Subcluster B1 จะพบการรวมกลุ่มกันของปญจขันธุ์ที่เหลืออีก 18 พันธุ์ รวมอยู่กับ *G. burmanicum* NC036141 ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 86% BS โดยพบการจับคู่แสดงความใกล้ชิดของปญจขันธุ์พันธุ์พื้นเมืองดอยตุง 2 กับพันธุ์ลูกผสมจีน-พื้นเมืองแยกออกมาด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 61% BS

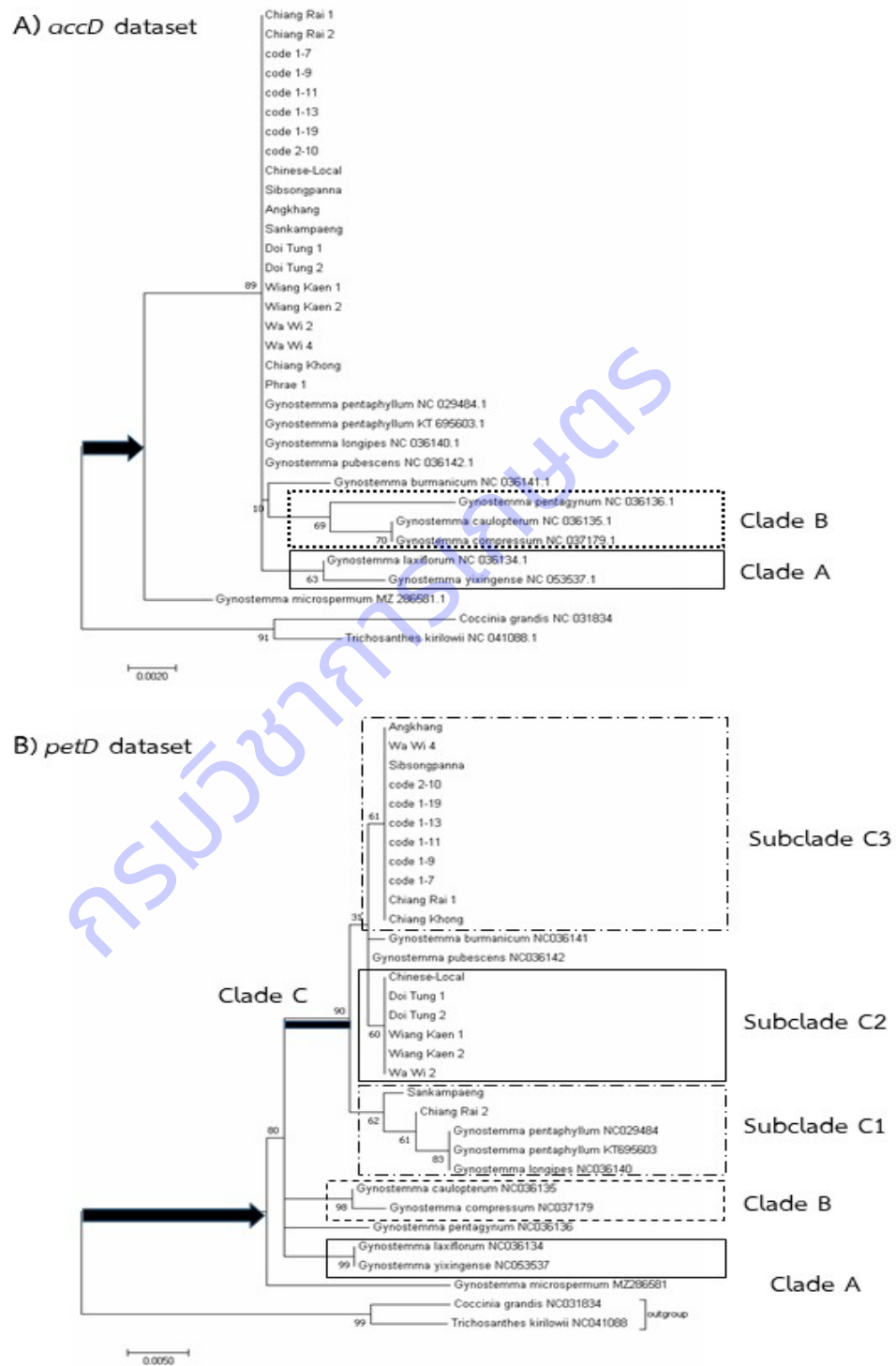
4) แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปญจขันธุ์ด้วยยีน *ycf3*

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้อมูลดีเอ็นเอของปญจขันธุ์ด้วยยีน *ycf3* (ภาพที่ 3.2.5B) แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากของปญจขันธุ์ที่ศึกษาใหม่ทั้ง 19 พันธุ์ (ไม่รวมพันธุ์พื้นเมืองเชียงรายของ) กับ *Gynostemma* อีก 11 taxa ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 99% BS ภายในกลุ่ม พบเพียง *G. caulopterum* NC036135 และ *G. compressum* NC037179 จับคู่กันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 64% BS

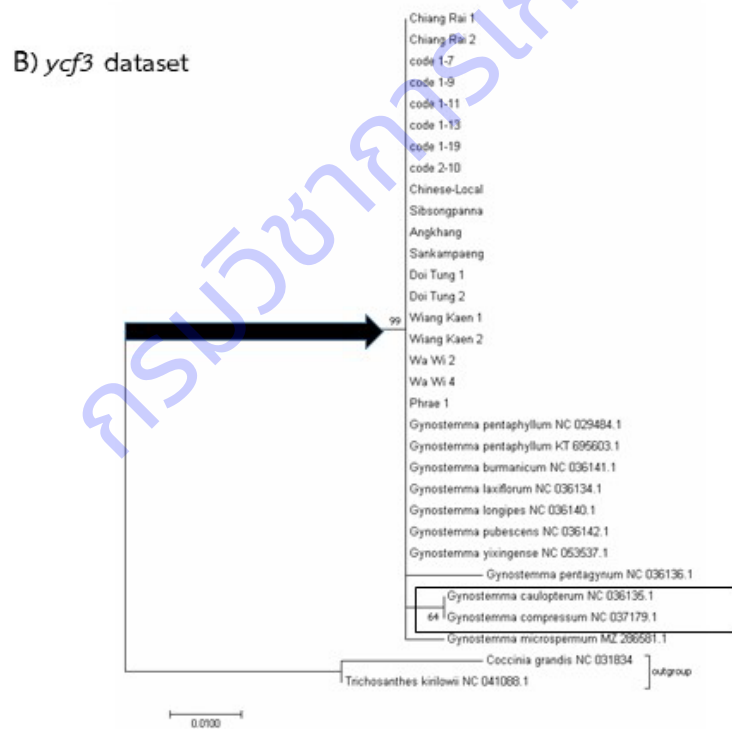
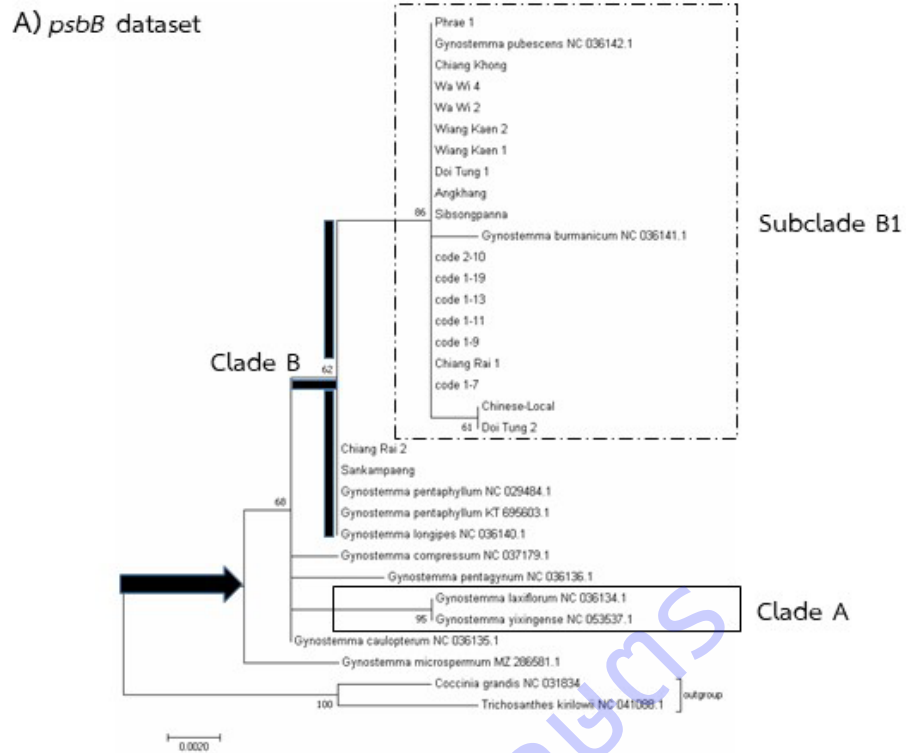
5) แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปญจขันธุ์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอรวมของยีน *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3*

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลดีเอ็นเอรวมของยีน *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3* (ภาพที่ 3.2.6) ของปญจขันธุ์ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ และพืชสกุล *Gynostemma* อีก 11 taxa ที่ได้มีการศึกษามาก่อน พบว่า พืชสกุล *Gynostemma* ทั้งหมดจับกลุ่มยืนยันความใกล้ชิดกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 87% BS โดยมี *G. microspermum* MZ286581 แยกตัวอยู่ที่ฐานล่างโดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นภายในกลุ่มพบ *G. laxiflorum* NC036134 และ *G. yixingense* NC053537 จับกลุ่มแสดงความใกล้ชิดกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นสูงมากที่ 100% BS (Clade A) ในขณะที่ *G. pentagynum* NC036136 จับกลุ่มด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 84% BS กับ *G. caulopterum* NC036135 และ *G. compressum* NC037179 (Clade B) โดยสมาชิก 2 ชนิดหลังจับคู่กันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 99% BS ส่วนสมาชิกอื่นอีก 5 ตัวอย่างของ *Gynostemma* จับกลุ่มอยู่ด้วยกันกับปญจขันธุ์ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 75% BS (Clade C) โดยสมาชิกภายใน Clade C จับกลุ่มแสดงความใกล้ชิดกันได้ค่อนข้างชัดเจน ดังนี้ : Subclade C1 แสดงการจับกลุ่มด้วยกันของ *G. longipes* NC036140, *G. pentaphyllum* NC029484 และ *G. pentaphyllum* KT695603 ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 82% BS และแสดงความใกล้ชิดกับปญจขันธุ์ลูกผสมเชียงราย 2 และพันธุ์พื้นเมืองสันกำแพงด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นต่ำที่ 61% BS; Subclade C2 แสดงการจับกลุ่มกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่ 62% BS พบการจับกลุ่มกันของสมาชิกแยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ Subclade C2-1 สมาชิกรวมกลุ่มกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นต่ำที่ 63% BS โดยสมาชิกทั้งหมดเป็นปญจขันธุ์ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ จำนวน 6 พันธุ์ ประกอบด้วย พันธุ์พื้นเมืองวาวี 2, เวียงแก่น 1, เวียงแก่น 2, ดอยตุง 1, ดอยตุง 2 และลูกผสมจีน-พื้นเมือง โดยพันธุ์พื้นเมืองดอยตุง 2 และลูกผสมจีน-พื้นเมืองจับคู่แสดงความใกล้ชิดกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นต่ำที่ 67% BS ส่วน Subclade C2-2 สมาชิกรวมกลุ่มกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นต่ำที่ 53% BS ประกอบด้วย ปญจขันธุ์พันธุ์พื้นเมืองเชียงรายของ, วาวี 4, อ่างช้าง, ปญจขันธุ์ลูกผสมเชียงราย

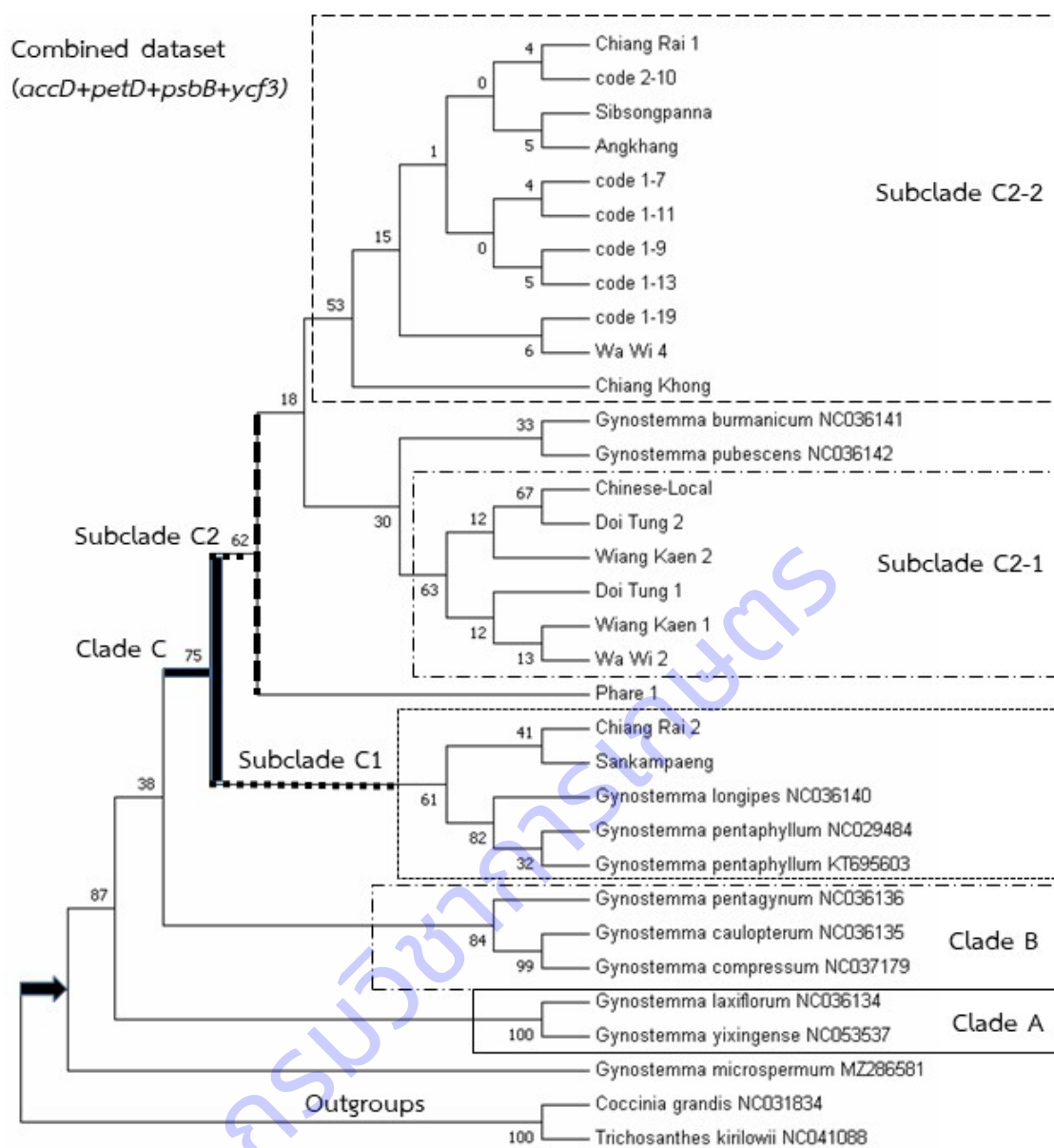
1, ลูกผสม 1-7, ลูกผสม 1-9, ลูกผสม 1-11, ลูกผสม 1-13, ลูกผสม 1-19, ลูกผสม 2-10 และสายพันธุ์จีนสิบสองปันนา ส่วนปัญญาชนพันธุ์พื้นเมืองแพร่, *G. burmanicum* NC036141 และ *G. pubescens* NC036142 แสดงความใกล้ชิดกับสมาชิกใน Subclade C2-1 และ Subclade C2-2 ภายใน Subclade C2 โดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น



ภาพที่ 3.2.4 แผนภูมิ Maximum Likelihood (ML Phylogram) แสดงความสัมพันธ์ของ *Gynostemma* spp. ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอของยีน *accD* (A) และยีน *petD* (B) พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS)



ภาพที่ 3.2.5 แผนภูมิ Maximum Likelihood (ML Phylogram) แสดงความสัมพันธ์ของ *Gynostemma* spp. ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอของยีน *psbB* (A) และยีน *ycf3* (B) พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS)



ภาพที่ 3.2.6 แผนภูมิ Maximum Likelihood (ML consensus tree) แสดงความสัมพันธ์ของ *Gynostemma* spp. ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอร่วมของยีน *accD*, *petD*, *psb* และ *ycf3* พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS)

3. จัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปัญจชันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสมเพื่อใช้ประกอบการระบุยืนยันชื่อปัญจชันธุ์ในประเทศไทย

ตัวอย่างพรรณไม้แห้งของปัญจชันธุ์ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานทั้ง 20 สายพันธุ์ ได้จัดทำเป็นตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย (Herbarium voucher specimens) และเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร (Bangkok Herbarium, รหัสพิพิธภัณฑ์สากล คือ BK) โดยได้รับหมายเลขการลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ (BK number) จำนวน 20 หมายเลข คือ BK no. 071525 – BK no. 071544 พร้อมบันทึกข้อมูลประกอบการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปัญจชันธุ์ไว้ในฉลากรายละเอียดของตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (Herbarium sheet label) แต่ละตัวอย่าง ดังนี้ ชื่อวงศ์พืช (Family name) ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช (Botanical name) ชื่อพันธุ์พืช (Cultivar/Code name) ชื่อพื้นเมือง (Local name) สถานที่เก็บตัวอย่าง

(Location) วันที่เก็บตัวอย่าง (Collected Date) บันทึกลักษณะพืช (Notes) ชื่อผู้เก็บตัวอย่างและหมายเลข (Collector number) ซึ่งข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างพรรณไม้แห้งของปัญญาชนทั้ง 20 สายพันธุ์ ได้ถูกบันทึกไว้ในในระบบฐานข้อมูลพรรณไม้แห้งของพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพตามหมายเลขการบันทึกข้อมูลในระบบคอมพิวเตอร์ (BK barcode) จำนวน 20 หมายเลข คือ BK269121–BK269140 (ตารางที่ 3.2.3) ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงข้างต้นใช้เป็นข้อมูลรายละเอียดของข้อมูลดีเอ็นเอของปัญญาชนแต่ละพันธุ์และแต่ละยีน โดยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปัญญาชน ได้ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้บนฐานข้อมูลGenBank ของ NCBI ประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *accD* จำนวน 20 accession numbers ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *petD* จำนวน 19 GenBank accession number ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *psbB* จำนวน 20 GenBank accession number และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ycf3* จำนวน 19 GenBank accession number รวมข้อมูลดีเอ็นเอบนฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ทั้งสิ้น 78 ข้อมูล

ตารางที่ 3.2.3 รายชื่อปัญญาชนที่ศึกษาในงานวิจัยนี้และรายละเอียดของตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย (Herbarium voucher specimens) ที่ลงทะเบียนเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร

ที่	รายชื่อปัญญาชน	ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK)		
		หมายเลขผู้เก็บตัวอย่าง	BK number	BK barcode
1	เชียงราย 1 (Chiang Rai 1)	K. Pruesapan KP2020-1	BK no. 071525	BK269121
2	เชียงราย2 (Chiang Rai 2)	K. Pruesapan KP2020-2	BK no. 071526	BK269122
3	สายพันธุ์ 1-7 (code no. 1-7)	K. Pruesapan KP2020-3	BK no. 071527	BK269123
4	สายพันธุ์ 1-9 (code no. 1-9)	K. Pruesapan KP2020-4	BK no. 071528	BK269124
5	สายพันธุ์ 1-11 (code no. 1-11)	K. Pruesapan KP2020-5	BK no. 071529	BK269125
6	สายพันธุ์ 1-13 (code no. 1-13)	K. Pruesapan KP2020-6	BK no. 071530	BK269126
7	สายพันธุ์ 1-19 (code no. 1-19)	K. Pruesapan KP2020-7	BK no. 071531	BK269127
8	สายพันธุ์ 2-10 (code no. 2-10)	K. Pruesapan KP2020-8	BK no. 071532	BK269128
9	จีน-พื้นเมือง (Chinese-Local)	K. Pruesapan KP2020-9	BK no. 071533	BK269129
10	สิบสองปันนา(Sibsongpanna)	K. Pruesapan KP2020-10	BK no. 071534	BK269130
11	อ่างขาง (Angkhang)	K. Pruesapan KP2020-11	BK no. 071534	BK269131
12	สันกำแพง (Sankampaeng)	K. Pruesapan KP2020-12	BK no. 071536	BK269132
13	ดอยตุง1(Doi Tung 1)	K. Pruesapan KP2020-13	BK no. 071537	BK269133
14	ดอยตุง2 (Doi Tung 2)	K. Pruesapan KP2020-14	BK no. 071538	BK269134
15	เวียงแก่น1 (Wiang Kaen 1)	K. Pruesapan KP2020-15	BK no. 071539	BK269135
16	เวียงแก่น2 (Wiang Kaen 2)	K. Pruesapan KP2020-16	BK no. 071540	BK269136
17	วาวิ2 (Wa Wi 2)	K. Pruesapan KP2020-17	BK no. 071541	BK269137
18	วาวิ4 (Wa Wi 4)	K. Pruesapan KP2020-18	BK no. 071542	BK269138
19	เชียงของ (Chiang Khong)	K. Pruesapan KP2020-19	BK no. 071543	BK269139

ที่	รายชื่อปัญจชั้น	ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK)		
		หมายเลขผู้เก็บตัวอย่าง	BK number	BK barcode
20	แพร์ 1 (Phrae 1)	K. Pruesapan KP2020-20	BK no. 071544	BK269140

อภิปรายผล (Discussion)

1. ลักษณะสัณฐานวิทยาและการจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ของปัญจชั้นพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม

ข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของปัญจชั้นที่ศึกษาได้ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของปัญจชั้นทั้ง 20 พันธุ์ ได้ค่อนข้างชัดเจน โดยจะพบว่า ปัญจชั้นทั้ง 20 พันธุ์ มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดของพันธุ์ในระดับชนิดเดียวกันได้เป็นอย่างดี เมื่อพิจารณาลักษณะราก ลำต้น และมือพัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ ส่วนลักษณะขนที่ปกคลุมส่วนต่างๆ ของพืช มีรายงานว่า พันธุ์ลูกผสมเชิงราย 1, เชิงราย 2 และพันธุ์พื้นเมืองสันกำแพง มีขนแบบสั้นหนา ส่วนในพันธุ์จีนสิบสองปันนามีขนแบบยาวบาง (ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, 2562a, 2562b) แต่เมื่อวัดขนาดของขนภายใต้กล้องขยายในงานวิจัยนี้ กลับพบว่า ขนาดความยาวและความกว้างที่ฐานของขนมีความคาบเกี่ยวกัน นอกจากนี้ มีรายงานว่าความหนาแน่นของขนที่ปกคลุมส่วนต่างๆ ของพืชใช้แยกความแตกต่างของ *G. pentaphyllum* ออกจาก *G. burmanicum* และ *G. pubescens* ได้ (Ali and Al-Hemaid, 2010) ในรายงานได้ระบุว่า *G. pentaphylla* มีขนเพียง 2-3 เส้น ในขณะที่ *G. burmanicum* และ *G. pubescens* มีขนจำนวนมาก แต่ในงานวิจัยนี้กลับพบว่า ในแต่ละพันธุ์ของปัญจชั้นที่ศึกษาสามารถพบส่วนของพืชที่มีขนหนาแน่นและส่วนที่มีผิวเกือบเกลี้ยงอยู่ในต้นเดียวกันหรือเป็นพันธุ์เดียวกันแต่เป็นคนละต้นก็พบความหนาแน่นของขนแตกต่างกันไป ทั้งนี้ น่าจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและอายุของพืช และในรายงานวิจัยเดียวกันนี้ (Ali and Al-Hemaid, 2010) ได้แยกลักษณะขนใน *G. burmanicum* และ *G. pubescens* ว่ามีความแตกต่างจาก *G. pentaphyllum* แต่เมื่อพิจารณาภาพขยายของขนในรายงานวิจัยนี้ (Figure 1G = *G. burmanicum*, 1H = *G. pentaphylla*, 2A = *G. pubescens*) กลับพบว่า ทั้ง 3 ภาพมีลักษณะของขนเหมือนกัน และลักษณะขนเช่นนี้พบในปัญจชั้นทั้ง 20 พันธุ์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ อย่างไรก็ตาม การค้นพบว่าไม่มีความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาของขนใน *G. burmanicum*, *G. pubescens* และ *G. pentaphyllum* ถือเป็นข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนการปรับแก้ไขชื่อวิทยาศาสตร์ที่ให้ *G. burmanicum* และ *G. pubescens* ยุบเป็นชื่อพ้องอยู่ภายใต้ *G. pentaphyllum* forma *pubescens* (Gagnep.) W.J. de Wilde & Duyfjes (De Wilde and Duyfjes, 2007) สำหรับลักษณะสัณฐานวิทยาของใบในปัญจชั้นทั้ง 20 พันธุ์ พบว่า มีความหลากหลายของขนาดใบ สีใบ และจำนวนใบมาก ซึ่งสอดคล้องกับความหลากหลายของลักษณะใบที่พบใน *G. pentaphyllum* 14 สายพันธุ์ (strain) ซึ่งเก็บรวบรวมมาจาก 47 พื้นที่ในประเทศเกาหลีใต้ (Seong *et al.*, 1990) ในปัญจชั้นทั้ง 20 พันธุ์ พบการมีลักษณะสัณฐานวิทยาอย่างชัดเจนของลักษณะการปกคลุมของขน รูปแบบการหยักของขอบใบแบบหยักซี่ฟัน ลักษณะโคนใบและปลายใบ แต่จำนวนเส้นใบ จำนวนหยักของขอบใบ ความยาวส่วนปลายใบ (acumen) ความยาวก้านใบ เป็นลักษณะสัณฐานวิทยาที่มีความผันแปรคาบเกี่ยวกันสูง จึงยากต่อการแบ่งกลุ่มพันธุ์ด้วยลักษณะเหล่านี้ สำหรับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของใบปัญจชั้นในงานวิจัยนี้ สามารถใช้ลักษณะของรูปร่างของใบ ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางใบ ขนาดและรูปร่างของใบย่อยกลาง มาจัดกลุ่มแยกปัญจชั้นทั้ง 20 พันธุ์ออกจากกัน ซึ่งจะต้องพิสูจน์การจัดกลุ่มพันธุ์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอในหัวข้อถัดไปอีกครั้ง ว่ามีความสอดคล้องหรือขัดแย้งกันอย่างไร ส่วนลักษณะของดอกและช่อดอกทั้งของเพศผู้และเพศเมียนั้น ข้อมูลที่ได้เก็บรวบรวมมาจาก 2 แหล่งประกอบกัน คือ ข้อมูลจากตัวอย่างพืชในแปลงปลูก จำนวน 7 พันธุ์ และข้อมูลจากการสืบประวัติพันธุ์จากนักวิจัยผู้ปรับปรุงพันธุ์ปัญจชั้น เนื่องจากปัญจชั้นที่ปลูกรวบรวมไว้ในแปลงทดลองจะมีอายุ

อยู่ในแปลงปลูกประมาณ 4 เดือน ก่อนจะเก็บผลผลิตไปทำผลิตภัณฑ์ชา ด้วยสภาพนิเวศที่ไม่เอื้ออำนวยเช่นในสภาพธรรมชาติ อีกทั้งช่วงอายุการเก็บเกี่ยวที่สั้น ทำให้ปัญจชันธุ์ส่วนใหญ่ไม่ติดดอกติดผลในช่วงดำเนินงานวิจัย ซึ่งข้อมูลที่ได้แสดงการมีลักษณะร่วมกันของดอกและช่อดอกทั้งเพศผู้และเพศเมียเป็นไปตามผลการศึกษาข้างต้น ในส่วนลักษณะของผลนั้นแสดงความเหมือนกันทั้งการปกคลุมของขน ขนาด และรูปร่าง ในขณะที่ลักษณะของเมล็ดใช้แยกความแตกต่างของพันธุ์ปัญจชันธุ์ที่ศึกษาได้

เมื่อใช้ลักษณะสัณฐานของปัญจชันธุ์ทั้ง 20 พันธุ์ เป็นข้อมูลในตรวจสอบยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของปัญจชันธุ์ด้วยคู่มือการจำแนกพืชสกุล *Gynostemma* แม้จะพบความคล้ายคลึงกันกับ *Gynostemma* ถึง 5 ชนิด คือ *G. burmanicum*, *G. laxum*, *G. longipes*, *G. pentaphyllum* และ *G. simplicifolium* แต่เมื่อตรวจสอบการปรับเปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์ในการศึกษาพรรณพฤกษชาติในประเทศไทยและเขตพรรณพฤกษชาติ Malesiana (De Wilde and Duyfjes, 2007, 2008, 2010) ในประเทศอินเดีย (Renner and Pandey, 2013) และความเห็นของ C. Jeffrey ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญอนุกรมวิธานของพืชวงศ์แตง (Cucurbitaceae) พบว่า ชื่อชนิดพืชอีก 4 ชนิดถูกยุบเป็นชื่อพ้อง *G. pentaphyllum* ตามหลักการพฤกษอนุกรมวิธาน ปัญจชันธุ์ทั้ง 20 พันธุ์ จึงแสดงความคล้ายคลึงกับ *G. pentaphyllum* นั้นแสดงให้เห็นถึงความผันแปรของลักษณะทางสัณฐานตามสภาพแวดล้อมของชนิดพืชในสกุล *Gynostemma* ซึ่งความผันแปรเหล่านี้ส่งผลต่อความถูกต้องสมบูรณ์ในการอธิบายพืชตามหลักทางพฤกษอนุกรมวิธาน หากจำนวนตัวอย่างและข้อมูลที่ศึกษาไม่มากเพียงพอ ทำให้เกิดการตั้งชื่อพืชใหม่ซ้ำกับชื่อเดิมที่มีอยู่แล้ว จนต้องมีการยุบรวมชนิดพืชดังที่กล่าวมาข้างต้น อย่างไรก็ตาม การสรุปผลเช่นนี้มีความน่าเชื่อถือต่ำ เนื่องจากการศึกษาพรรณพฤกษชาติในประเทศจีนได้ยอมรับ *G. burmanicum*, *G. laxum*, *G. longipes*, *G. pentaphyllum* และ *G. simplicifolium* อยู่ในระดับชนิดเหมือนกัน (Chen, 1995; Chen et al., 2011; Wu and Chen, 1983) ในกรณีศึกษาของปัญจชันธุ์ทั้ง 20 พันธุ์ เพื่อระบุชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องด้วยลักษณะทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวจึงยังไม่เพียงพอที่จะสรุปยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชได้ จึงต้องพิสูจน์ความใกล้ชิดของปัญจชันธุ์ทั้ง 20 พันธุ์กับพืชสกุลปัญจชันธุ์ชนิดอื่นๆ ด้วยข้อมูลทางพันธุกรรมดีเอ็นเอ ดังจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

2. ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปัญจชันธุ์เพื่อระบุยืนยันชื่อปัญจชันธุ์ในประเทศไทย

ข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้จากยีน *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3* ของปัญจชันธุ์ทั้ง 20 พันธุ์ ที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้ มีความสอดคล้องกับพืชสกุล *Gynostemma* ที่กระจายพันธุ์อยู่ในคาบสมุทรเกาหลี (Korean peninsula) (Abid et al., 2019) ขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการตรวจสอบพันธุ์ของปัญจชันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำ และเพื่อพิสูจน์ชื่อวิทยาศาสตร์ของปัญจชันธุ์ที่ศึกษา จึงใช้ข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปัญจชันธุ์ โดยพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลดีเอ็นเอรวมของยีน *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3* พบว่า แสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดของปัญจชันธุ์ได้ดีกว่าการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอแยกของแต่ละยีน ในการอภิปรายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปัญจชันธุ์ที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลดีเอ็นเอรวมของยีน *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3* (ภาพที่ 3.2.6) เพื่อใช้พิสูจน์ยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชโดยชนิดของพืชสกุล *Gynostemma* ที่คัดเลือกมาใช้เปรียบเทียบกับความสัมพันธ์ทั้ง 11 taxa เป็นชนิดพืชที่มีการกระจายพันธุ์ทั้งในประเทศไทย และในประเทศใกล้เคียงซึ่งมีสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศคล้ายคลึงกับประเทศไทย ชนิดพืชของสกุล *Gynostemma* ที่คัดเลือกมาเหล่านี้จึงใช้เป็นตัวแทนที่อาจช่วยพิสูจน์ความเป็นชนิดเดียวกันกับปัญจชันธุ์ศึกษาใหม่ ทั้ง 20 พันธุ์

จากความใกล้ชิดของของตัวอย่างพืชที่แสดงในแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุล *Gynostemma* แสดงให้เห็นความสอดคล้องของการจำแนกกลุ่มชนิดของ *Gynostemma* ด้วยลักษณะประเภทของผล (De Wilde and Duyfjes, 2007) จะพบว่า *G. microspermum*, *G. laxiflorum* และ *G. yixingense* แยกตัวอย่างใกล้ชิดกันที่ฐานของแผนภูมิ ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน ที่ได้จัดทั้ง 3 ชนิดนี้ไว้ด้วยกันใน subgenus *Triostellum* ด้วยลักษณะของผลแบบผลแห้งแตก (capsular) (Chen, 1995) ในขณะที่ *G. pentagynum* สมาชิกอีกชนิดของ subgenus นี้ กลับจับกลุ่มอยู่กับ *G. caulopterum* และ *G. compressum* ซึ่งเป็นสมาชิกของ *Gynostemma* subgenus *Gynostemma* ที่มีผลแบบผลแห้งมีเนื้อหลายเมล็ด (dry berry) (Chen, 1995) โดยไม่พบลักษณะทางสัณฐานอื่นที่เชื่อมโยงการแสดงตำแหน่งผิดกลุ่มของ *G. pentagynum* แต่เมื่อพิจารณาคำอธิบายพืชของ *G. pentagynum* (Chen et al., 2011) พบว่า อธิบายลักษณะผลของพืชชนิดนี้เพียงว่าเป็นผลอ่อน ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าผลของ *G. pentagynum* อาจจะเป็นผลแบบผลแห้งมีเนื้อหลายเมล็ดก็ได้ จึงจับกลุ่มแสดงความใกล้ชิดกับชนิดพืชที่อยู่ต่างกลุ่มด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่สูงเช่นนี้ (84% BS, Clade B) ส่วนสมาชิกชนิดอื่นของ *Gynostemma* subgenus *Gynostemma* จับกลุ่มใกล้ชิดกับกับปัญจชันธุ์ที่ศึกษาใหม่ทั้ง 20 สายพันธุ์ (Clade C) ซึ่งพิสูจน์ให้เห็นว่าพืชที่มีผลแบบผลแห้งมีเนื้อหลายเมล็ดนี้แสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสอดคล้องกันกับลักษณะทางสัณฐาน และเมื่อพิจารณาความใกล้ชิดกันของตัวอย่างพืชในกลุ่มนี้ พบว่า *G. longipes* และ *G. pentaphyllum* 2 taxa (NC029484 และ KT695603) จับกลุ่มกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่สูง (82% BS, Subclade C1) จึงยืนยันผลการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของปัญจชันธุ์ทั้ง 20 พันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐาน (ผลการทดลอง หัวข้อ 1.2 จำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ของปัญจชันธุ์พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม) ว่ามีความสอดคล้องกับลักษณะทางพันธุกรรม โดยข้อมูลดีเอ็นเอแสดงให้เห็นว่า ปัญจชันธุ์พันธุ์พื้นเมืองสันกำแพงและลูกผสมเชียงราย 2 มีความใกล้ชิดกับ *G. longipes* และ *G. pentaphyllum* มากกว่าพันธุ์อื่นอีก 18 พันธุ์ แต่เมื่อพิจารณาลักษณะสัณฐานของพืชที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ กลับไม่พบลักษณะสัณฐานใดที่แสดงความใกล้ชิดของปัญจชันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์นี้ได้ชัดเจน มีเพียงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดกัน นั่นคือ ปัญจชันธุ์พันธุ์เชียงราย 2 เป็นลูกผสมจากแม่พันธุ์สันกำแพงกับพ่อพันธุ์สิบสองปันนา สำหรับความใกล้ชิดกับ *G. longipes* กับ *G. pentaphyllum* ในกลุ่มนี้ ยิ่งพิสูจน์การระบุชื่อ *G. longipes* ให้อยู่ภายใต้ *G. pentaphyllum* ตามความเห็นของ C. Jeffrey ผู้ร่วมวิจัย *Gynostemma* ของประเทศจีน (Chen et al., 2011) ส่วนปัญจชันธุ์อีก 18 พันธุ์ที่เหลือ จับกลุ่มอยู่ด้วยกันกับ *G. burmanicum* และ *G. pubescens* จึงยิ่งพิสูจน์ความเป็นชื่อพ้องของ *Gynostemma* ทั้ง 2 taxa ที่นักพฤกษอนุกรมวิธานได้ปรับปรุงแก้ไขให้ถูกต้องว่า พืชทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวเป็นชื่อที่ตั้งซ้ำซ้อนกับ *G. pentaphyllum* และเมื่อพิจารณาความใกล้ชิดของปัญจชันธุ์อีก 18 พันธุ์ จะพบว่าได้แยกออกมาเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยในกลุ่ม Subclade C2-1 พบปัญจชันธุ์พันธุ์พื้นเมือง 5 พันธุ์ (ดอยตุง 1, ดอยตุง 2, วาวี 2, เวียงแก่น 1, เวียงแก่น 2) รวมกลุ่มกับพันธุ์ลูกผสมจีน-พื้นเมือง แต่กลับไม่พบลักษณะสัณฐานที่แยกกลุ่มของทั้ง 5 พันธุ์มาอยู่ด้วยกันได้ ส่วนกลุ่ม Subclade C2-2 พบปัญจชันธุ์พื้นเมือง 3 พันธุ์ (เชียงของ, วาวี 4, อ่างขาง) จับกลุ่มกับพันธุ์ลูกผสม 7 พันธุ์ (เชียงราย 1, ลูกผสม 1-7, ลูกผสม 1-9, ลูกผสม 1-11, ลูกผสม 1-13, ลูกผสม 1-19, ลูกผสม 2-10) และพันธุ์จีนสิบสองปันนา ในกลุ่มนี้ พบความสัมพันธ์ของพันธุ์เชียงราย 1, ลูกผสม 1-7, อ่างขาง และสิบสองปันนาด้วยลักษณะสัณฐานของเมล็ด (ภาพที่ 3.2.2D-F, J-R) แต่เมล็ดของพันธุ์อื่นๆ ในกลุ่มเดียวกันไม่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้ อย่างไรก็ตาม พบว่า พันธุ์ลูกผสมทั้ง 7 พันธุ์ภายในกลุ่มนี้ มีต้นแม่เป็นพันธุ์สิบสองปันนา และต้นพ่อเป็นพันธุ์สันกำแพงเหมือนกัน ลักษณะของเมล็ดที่ได้ อาจจะเป็นแบบเดียวกัน แต่ก็ไม่สามารถสรุปสมมุติฐานนี้ได้อย่างมั่นใจ เพราะพันธุ์ลูกผสมจีน-พื้นเมืองซึ่งมีต้นพ่อต้นแม่เหมือนกันกลับแยกกลุ่มไปอยู่กับพันธุ์พื้นเมือง (Subclade C2-1) อย่างไรก็ตาม จากการแยกกลุ่มของปัญจชันธุ์ทั้ง 20 พันธุ์ ออกเป็น 3 กลุ่มย่อยนี้ มีความสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มลักษณะสัณฐานของปัญจชันธุ์ 6 พันธุ์ (ผลการทดลอง หัวข้อ 1.1.2 : 2)

ความแตกต่างของปัญจชันท์แยกด้วยลักษณะเมล็ด) จะพบว่า มีตัวแทนของปัญจชันท์ทั้ง 6 พันธุ์แยกตัวอยู่ใน Subclade C1 (พันธุ์พื้นเมืองสันกำแพง) Subclade C2-1 (พันธุ์พื้นเมืองดอยตุง 1) และ Subclade C2-2 (ลูกผสมเชียงราย 1, ลูกผสม 1-7, พันธุ์พื้นเมืองอ่างาง และพันธุ์จีนสิบสองปันนา) แสดงแนวทางให้เห็นว่า ลักษณะของเมล็ดสามารถแบ่งกลุ่มพันธุ์ของปัญจชันท์ได้

การแสดงตำแหน่งบนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *G. burmanicum*, *G. longipes* และ *G. pubescens* ยืนยันความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *G. pentaphyllum* และปัญจชันท์ทั้ง 20 พันธุ์ ซึ่งเห็นพ้องกับการยุบชื่อของทั้ง 3 ชนิดไว้ภายใต้ *G. pentaphyllum* (ความเห็นของ C. Jeffrey ใน Chen *et al.*, 2011; De Wilde and Duyfjes, 2007) ทั้งนี้ แม้ไม่มีข้อมูลดีเอ็นเอของ *G. simplicifolium* ร่วมในการวิเคราะห์ด้วย แต่ความคาบเกี่ยวใกล้ชิดของลักษณะทางสัณฐานสามารถสนับสนุนความเป็นชนิดเดียวกันกับ *G. pentaphyllum* ได้นอกจากนี้ ผลการวิจัยที่ได้สนับสนุน Govaerts *et al.* (2021) ในการไม่จำแนกชื่อระดับต่ำกว่าชนิดภายใต้ *G. pentaphyllum* ดังนั้น จึงสรุปยืนยันว่า *G. pentaphyllum* เป็นชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของปัญจชันท์ทั้ง 20 พันธุ์

3. จัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปัญจชันท์พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสมเพื่อใช้ประกอบการระบุยืนยันชื่อปัญจชันท์ในประเทศไทย

ตัวอย่างพันธุ์ปัญจชันท์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ ทั้ง 20 พันธุ์ ได้เก็บบันทึกข้อมูลเพื่อใช้เป็นหลักฐานของงานวิจัยไว้ใน 2 รูปแบบเชื่อมโยงกัน โดยรูปแบบแรกเป็นการเก็บบันทึกข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของตัวอย่างพันธุ์ปัญจชันท์ไว้ในรูปแบบของตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์ระดับชาติ และรูปแบบที่สอง เป็นการเก็บบันทึกข้อมูลดีเอ็นเอของตัวอย่างพันธุ์ปัญจชันท์ได้ที่ได้จากยีน 4 ยีนไว้บนฐานข้อมูลของ GenBank, NCBI โดยข้อมูลดีเอ็นเอทั้งหมดได้บันทึกความเชื่อมโยงของปัญจชันท์แต่ละพันธุ์เชื่อมโยงไปยังตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงที่ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้ในการตรวจสอบยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์และข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของปัญจชันท์ทั้ง 20 พันธุ์ ซึ่งข้อมูลดีเอ็นเอและข้อมูลเชื่อมโยงรายละเอียดทางพฤกษศาสตร์ของพืชที่ถูกเก็บไว้บนระบบฐานข้อมูลของ NCBI เป็นประโยชน์อย่างมากในการใช้ศึกษาทางอนุกรมวิธาน ดังเช่นที่ Renner and Pandey (2013) ใช้ในการจัดทำบัญชีรายชื่อของพืชวงศ์แตงในประเทศอินเดีย ซึ่งเขาสามารถใช้ข้อมูลดีเอ็นเอเหล่านี้มาวิเคราะห์เพื่อใช้สนับสนุนการศึกษาทางสัณฐานวิทยาในยอมรับชื่อตั้งชื่อใหม่ หรือยุบชื่อที่มีความซ้ำซ้อนได้อย่างน่าเชื่อถือ

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การศึกษาความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาของปัญจชันท์พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสมของไทย และใช้พันธุ์จีนมาเป็นตัวเปรียบเทียบกับ สามารถตรวจสอบยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลดีเอ็นเอของปัญจชันท์ทั้ง 20 พันธุ์ โดยชื่อที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของปัญจชันท์ คือ *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino ความหลากหลายทางสัณฐานวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งความผันแปรของลักษณะใบที่เห็นได้อย่างชัดเจนในปัญจชันท์ทั้ง 20 พันธุ์ ไม่ว่าจะเป็นจำนวนใบ สีใบ หรือรูปร่างและขนาดของใบ แต่กลับไม่สามารถแบ่งกลุ่มพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้ที่พบว่า การจำแนกปัญจชันท์ของไทยเล็กน้อยไปถึงระดับ *forma* ตามคู่มือการจำแนกพรรณพฤกษชาติของไทยไม่สามารถใช้ได้จริงกับปัญจชันท์พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสมของไทย แต่ตัวแทนกลุ่มพันธุ์ที่แยกด้วยข้อมูลลักษณะเมล็ดกลับปรากฏสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มพันธุ์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ จึงควรจะปลูกรวบรวมพันธุ์ปัญจ

ขั้นเพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตเมล็ดสำหรับศึกษาความใกล้ชิดของพันธุ์ปลูจขั้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มความหลากหลายของสายพันธุ์ปลูจขั้นของประเทศไทย

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. ผลการศึกษาความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชท้องถิ่น

- ได้ดีเอ็นเออ้างอิงตัวอย่างพรรณไม้แห้งและข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชวงศ์สิลา จำนวน 19 ตัวอย่าง และปลูจขั้นพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม จำนวน 20 ตัวอย่าง

- ได้ข้อมูลและลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์สิลา จำนวน 54 ตัวอย่าง และปลูจขั้นพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม จำนวน 78 ตัวอย่าง ได้ฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เชื่อมโยงกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พร้อมทั้งข้อมูลเชิงวิชาการ ลักษณะเด่น และการนำไปใช้ประโยชน์ในงานด้านอนุกรมวิธานพืชของพืชวงศ์สิลา 1 ฐานข้อมูล และปลูจขั้น 1 ฐานข้อมูล เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการวางแผนการอนุรักษ์พืช การคุ้มครองพันธุ์พืช และการพัฒนาการใช้ประโยชน์ของพืชอย่างยั่งยืน

2. ข้อเสนอแนะ

บุคลากรในสถาบันการศึกษา หน่วยงานภาครัฐ หน่วยงานเอกชน หรือภาคการเกษตรกร สามารถใช้ประโยชน์ของข้อมูล ในการศึกษาข้อมูลด้านพฤกษศาสตร์และอนุกรมวิธานพืช งานปรับปรุงพันธุ์พืช งานวิจัยพัฒนาการใช้ประโยชน์จากพืชวงศ์สิลา และปลูจขั้น

การทดลองที่ 3.3

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายของปลาไหลเผือก

DNA Barcodes and Diversity of *Eurycoma* ssp.

ชื่อผู้วิจัย

อัญชลี แก้วดวงอรุณทัย ซาววา กาญจนนา พฤษพันธ์สมคิด ดำน้อย

Anchalee Kaewdoung Aroonothai SawwaKanchana Pruesapan Somkid Damnoy

คำสำคัญ (Key words)

ปลาไหลเผือก ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Eurycoma ssp. DNA barcode

บทคัดย่อ (Abstracts) ไทยและอังกฤษ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดศึกษาความหลากหลายของพืชสกุลปลาไหลเผือกที่สำรวจรวบรวมจากพื้นที่การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย โดยกำหนดพื้นที่จังหวัดตามการแบ่งเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณของประเทศไทย โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rbcl*, *rpoC* และ ITS ผลการศึกษาได้ข้อมูลดีเอ็นเอที่จะลงทะเบียนเก็บรักษาไว้บนระบบออนไลน์ของ National Center for Biotechnology Information เพื่อใช้ในการระบุยืนยันปลาไหลเผือกรวมทั้งสิ้น 82 ข้อมูลผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rbcl* และ *rpoC* ไม่มีตัวแทนที่สามารถใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกของประเทศไทยได้ จึง

ใช้เฉพาะข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS ในการวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือก พบว่า ปลาไหลเผือกชนิด *Eurycoma harmandiana* แยกออกจากกลุ่มปลาไหลเผือกชนิด *Eurycoma longifolia* Jack อย่างชัดเจน ส่วนกลุ่มปลาไหลเผือกชนิด *Eurycoma longifolia* Jack มีความแตกต่างทางพันธุกรรมแยกกลุ่มอย่างชัดเจนเพียง 2 กลุ่ม และควรมีการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาไหลเผือกที่กระจายพันธุ์ในเขตภูมิศาสตร์พีชอีก 2 เขต เพิ่มเติม เพื่อความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นของงานวิจัย

This study was performed to utilize DNA barcode techniques to study the diversity of the genus *Eurycoma* plant collected and surveyed from the distribution area in Thailand. By defining the provincial area according to the geographical zoning of the flora of Thailand using DNA barcode markers, *rbcl*, *rpoC* and ITS regions, the results demonstrated the total of 82 *Eurycoma*-identifying DNA data deposited on the NCBI. Using *rbcl* and *rpoC* DNA barcode regions, these markers were unable to identify the genetic diversity among Thai phlebae. To meet this need, we have applied DNA barcode within ITS region in analyzing the genetic diversity of *Eurycoma*. The results have shown that there was clearly no correlation between *Eurycoma harmandiana* and *Eurycoma longifolia*. For the *Eurycoma longifolia* identification, there were only two distinct genetic diversity groups identified. This study suggests more survey and collection of *Eurycoma* spp. presented from two other plant geographic areas for the completion of the study.

บทนำ (Introduction)

ปลาไหลเผือก (*Eurycoma* spp.) จัดอยู่ในวงศ์ Simaroubaceae เป็นพืชสมุนไพรที่มีถิ่นกำเนิดในเขตภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ มาเลเซีย อินโดนีเซีย ไทย พม่า และกัมพูชา (Bhat and Karim, 2010) มีชื่อเรียกต่างกันในแต่ละภาคต่างๆ ของประเทศไทย เช่น กรุงบาดาล (สุราษฎร์ธานี) คenang, ชะนาง (ตราด) ตรึงบาดาล (ปัตตานี), ไหลเผือก (ตรัง), เพี้ยก(ภาคใต้), ตุงสอ, แอพันซัน (ภาคเหนือ), หยิกบ่อทองหรือหยิกไม่ถึง, เอียนด่อน (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ในประเทศไทยพบเพียง 2 ชนิดคือ ปลาไหลเผือก (*Eurycoma longifolia* Jack) และปลาไหลเผือกน้อย (*Eurycoma harmandiana* Pierre)

รากปลาไหลเผือกและปลาไหลเผือกน้อย ประกอบด้วยสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น quassinoids, β -carboline alkaloids, canthin-6-one alkaloids, triterpene-type tirucallane, squalene, eurycolactone, eurycomalactone, laurycolactone, biphenyl neolignan และสารกลุ่มสเตียรอยด์ (Kanchanapoom *et al.*, 2001; Rehman *et al.*, 2015) รายงานการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยา แสดงให้เห็นว่า ปลาไหลเผือกมีฤทธิ์ในด้านการกระตุ้นอารมณ์ทางเพศในเพศชาย (Zanoil *et al.*, 2009, Kavitha *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2015) การลดความเป็นหมันในเพศชาย (Solomon *et al.*, 2014) การต้านเชื้อมาลาเรีย (Ridzuan *et al.*, 2007) การลดระดับน้ำตาลในเลือด (Husen *et al.*, 2004) ต้านการอักเสบ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Varghese *et al.*, 2012) ต้านมะเร็งเซลล์ (Tee *et al.*, 2007) การลดโรคกระดูกพรุน (Shuid *et al.*, 2012) ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา (Kuo *et al.*, 1999; Farouk and Benafri, 2007) ปัจจุบันนิยมนำรากปลาไหลเผือกมาเป็นส่วนผสมของยาบำรุงกำลัง และช่วยเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ โดยราคาจำหน่ายรากสูงถึง 1,000-1,500 บาท/กิโลกรัม

จากแนวโน้มความต้องการของรากปลาไหลเผือกที่เพิ่มสูงขึ้น เพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพ ซึ่งส่วนใหญ่ถูกขุดออกมาจากป่าธรรมชาติ ส่งผลให้ปริมาณต้นปลาไหลเผือกในป่าธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็ว อีกทั้งไม่มีการปลูกทดแทน หรือปลูกเพื่อการผลิตในเชิงการค้า จึงอาจส่งผลให้

สมุนไพรปลาไหลเผือกสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม ตลอดจนส่งผลให้เกิดการสูญพันธุ์ในอนาคตได้ นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่ระบุว่าเป็นรากปลาไหลเผือกหรือเบอร์เชินด์ กลับพบว่ามีการนำพืชชนิดอื่นมาเป็นส่วนผสมเพื่อลดต้นทุน และไม่สามารถตรวจสอบหรือตรวจสอบได้ยาก จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) มาช่วยในการจำแนกหรือแยกความแตกต่างระหว่างปลาไหลเผือกกับพืชชนิดอื่น หรือพืชที่มีความใกล้เคียงและคล้ายคลึงกัน

วิจิตร และคณะ (2559) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกในประเทศไทย จำนวน 78 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย AFLP ในการตรวจสอบ พบว่าสามารถแบ่งปลาไหลเผือกได้ 5 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีความสอดคล้องกับพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ภาคใต้ 2 กลุ่ม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคตะวันออก

Newmaster *et al.* (2013) ได้ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสมุนไพร 50 ชนิด ของอเมริกาเหนือ เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบและตรวจสอบกับผลิตภัณฑ์ที่วางขายอยู่ในท้องตลาดจำนวน 44 รายการ ประกอบด้วยสมุนไพรบรรจุแคปซูล สมุนไพรอัดเม็ด และสมุนไพรบดผง ผลจากการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดตรวจสอบพบการปนเปื้อนของสมุนไพรและสารเติมแต่งอื่น ไม่ตรงกับที่ระบุในฉลากไว้ถึง 68 เปอร์เซ็นต์ จากผลิตภัณฑ์ทั้งหมด

Bashir *et al.* (2016) ศึกษาการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์สมุนไพร ที่ระบุในฉลากว่าผลิตมาจากปลาไหลเผือกในประเทศมาเลเซีย โดยใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน *rbcL*, *ITS2* และ *psbA-trnH* เพื่อตรวจสอบระบุชนิดของวัตถุดิบที่นำมาใช้ว่าตรงกันหรือไม่ ผลจากการศึกษาพบว่า ผลิตภัณฑ์สมุนไพรปลาไหลเผือกมีการปนเปื้อนของพืชชนิดอื่นด้วย ได้แก่ *Holoptelea integrifolia*, *Clerodendrum cyrtophyllum*, *Aradichracha indica*, *Brucia javanica* และ *Ficus stenophylla* ซึ่งไม่ตรงกับที่ระบุไว้ในฉลาก

ดังนั้นดีเอ็นเอบาร์โค้ดจึงใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์สมุนไพรอย่างมีประสิทธิภาพ และยังสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่องานด้านการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากปลาไหลเผือกและพืชพรรณชนิดอื่นๆ ด้วย การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาใช้เพื่อจำแนก และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชในสกุล *Eurycoma* จำนวน 2 ชนิดคือ ปลาไหลเผือก (*Eurycoma longifolia*) และปลาไหลเผือกน้อย (*Eurycoma harmandiana*) เพื่อใช้ประโยชน์ในการแสดงความเป็นเจ้าของพันธุกรรม ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรปลาไหลเผือก และใช้ประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์พันธุกรรมของปลาไหลเผือกในประเทศไทยต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย(Research Methodology)

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างต้นปลาไหลเผือกที่สำรวจรวบรวมจากพื้นที่การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย (ตารางที่ 3.3.2)
2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์
 - เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis)
 - เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
 - เครื่องตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอและผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (Gel documentation System)
 - เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)
 - เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ(SORVALL RC28C)
 - ชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

- ตู้อบ (Memmert UF750)
- ไมโครไปเปต ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุล ได้แก่ CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), Tris-HCl, Tag DNA polymerase, sodium EDTA, PVP (Polyvinylpyrrolidone), Acetic acid และ NaCl ฯลฯ 2. 3. 4. 5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (QuantStudio5) 6. 7. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส

3. วัสดุอุปกรณ์ในการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย เช่น กรรไกรตัดกิ่ง กระดาษหนังสือพิมพ์ แฉงอัดพรรณไม้และเชือกมัด กระดาษลูกฟูก ฟองน้ำ ถุงพลาสติก ป้ายชื่อ สมุดบันทึก ดินสอดำ2B กระดาษติดฉลากพรรณไม้แห้ง เข็ม-ด้าย

4. สารเคมี เช่น ชุดสีฟลูออเรสเซนต์สำหรับย้อมดีเอ็นเอ, ผงอะกาโรส, ไนโตรเจนเหลว, แอลกอฮอล์, DNA Ladder, sodium EDTA, Tris-HCl, NaCl, Isopropanol, RNaseA, MgCl₂, dNTP, Taq DNA polymerase

วิธีการ

1. การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลปลาไหลเผือกและการจัดทำตัวอย่างอ้างอิง

1.1 การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลปลาไหลเผือก

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวแทนตัวอย่างปลาไหลเผือกในพื้นที่การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย โดยกำหนดพื้นที่จังหวัดตามการแบ่งเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณของประเทศไทย (Smitinand, 1958) ซึ่งแบ่งออกเป็น 7 เขต คือ 1.เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคเหนือ (Northern) ได้แก่ แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง เชียงราย น่าน แพร่ อุตรดิตถ์ พิชณุโลก ตาก สุโขทัย กำแพงเพชร พิจิตร และนครสวรรค์ 2.เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Northeastern) ได้แก่ เลย หนองคาย นครพนม อุดรธานี สกลนคร และมหาสารคาม 3.เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออก (Eastern) ได้แก่ ชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ ร้อยเอ็ด ยโสธร อำนาจเจริญ ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี 4.เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคกลาง (Central) ได้แก่ ชัยนาท สิงห์บุรี ลพบุรี สุพรรณบุรี อ่างทอง อยุธยา สระบุรี นครปฐม ปทุมธานี นครนายก นนทบุรี กรุงเทพฯ สมุทรปราการ สมุทรสาคร และสมุทรสงคราม 5.เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออกเฉียงใต้ (Southeastern) ได้แก่ ปราจีนบุรี สระแก้ว ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด 6.เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันตกเฉียงใต้ (Southwestern) ได้แก่ อุทัยธานี กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ และ 7.เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคใต้ (Peninsula) ได้แก่ ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี พังงา ภูเก็ต นครศรีธรรมราช พัทลุง ตรัง สตูล สงขลา ปัตตานี ยะลา และนราธิวาส

1.2 การจัดทำตัวอย่างอ้างอิง

นำชิ้นส่วนจากตัวอย่างที่สำรวจและรวบรวมได้มาจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย (Voucher specimens) ตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บรวบรวมชิ้นตัวอย่าง ติดป้ายหมายเลขพันธุ์ บันทึกข้อมูลพืชอัดทับและอบแห้ง อบน้ำยารักษาสภาพพรรณไม้ ติดฉลากพรรณไม้ ติดฉลากรายละเอียดพืชจนถึงขั้นตอนลงทะเบียนเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืช โดยได้ดำเนินการตามหลักการจัดทำพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย และลงทะเบียนเก็บรักษาไว้เป็นตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัยในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร (Bangkok Herbarium, BK)

2. ศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุลปลาไหลเผือก

2.1 นำตัวอย่างชิ้นส่วนใบปลาไหลเผือกมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี CTAB เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB

(cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2% β -mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งใบ 5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแห้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAc 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทั้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยนำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร โดยแยกเก็บเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ชุดที่ 2 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิงงานวิจัย เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *rbcL*, *rpoC1* และ ITS (ตารางที่ 1) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยเตรียมส่วนผสมดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) จำนวน 4 ไมโครลิตร 10x PCR buffer ((NH₄)₂SO₄) 8 ไมโครลิตร 25 mM MgCl₂ 8 ไมโครลิตร 2mM dNTP 8 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ (10 uM) อย่างละ 4 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.5 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 100 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ

ตารางที่ 3.3.1 แสดงไพรมเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ชื่อไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
rpoC1_1_F	GGCAAAGAAGGAAGATTTTCG	Paween <i>et al.</i> , 2011
rpoC1_1_R	TGAGAAAACATAAGTAAACGAGC	Paween <i>et al.</i> , 2011
rbcL - F	ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC	Paween <i>et al.</i> , 2011
rbcL - R	CTTCGGCACAAAATAAGAAACGATCTC	Paween <i>et al.</i> , 2011
ITS1	ATCCATATGGAAATCTTGTTTC	Paween <i>et al.</i> , 2011
ITS4	GTTCTAGCACACGAAAGTCG	Paween <i>et al.</i> , 2011

2.3 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ทำการตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ใน Agarose gel 1.5% ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ในสารละลาย 0.5X TBE บันทึกภาพดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง Gel documentation System

2.4 นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบริเวณ *rbcl*, *rpoC*, และ ITS ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบความปนเปื้อนด้วยโปรแกรม BlastN บนฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit 7 (Hall, 1999) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้ไปจัดเรียง (Alignment) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกจาก ITS ได้เพิ่มเติม Ingroup taxa คือ *Eurycoma longifolia* หมายเลข GenBank accession MG64310 และ MN715379 และ Outgroup taxa ซึ่งเป็นสกุลพืชในวงศ์ Simaroubaceae เดียวกันกับปลาไหลเผือก คือ *Simaba cuneata* A.St.-Hil.&Tul., *Quassia amara* L. และ *Picrasma crenata* Engl. หมายเลข GenBank accession MG643082, MG643114 และ MG643115 ตามลำดับที่ดาวน์โหลดจากฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) ด้วยวิธี Multiple alignment และตรวจสอบความถูกต้องของการจัดเรียงด้วยตาเปล่าอีกครั้ง

2.5 การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือก

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งจำเพาะบริเวณ *rbcl*, *rpoC* และ ITS ในเมตริกซ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates (Felsenstein, 1985), วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมด้วย number of differences method (Nei and Kumar, 2000) และไม่เกิน 10 trees/replicate ถูกเก็บไว้ ประเมินค่า Bootstrap Percentages (BPs) ที่ 85-100% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับสูง, 75-84% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับกลาง, 50-74% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับต่ำ และ <50% เป็นค่าที่ไม่สนับสนุนความเชื่อมั่น

เวลาและสถานที่

- เริ่มต้น 1 ตุลาคม 2561 สิ้นสุด 30 กันยายน 2563 รวม 2 ปี
- สถานที่ทำการทดลอง คือ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิจัย (Results) และอภิปรายผล (Discussion)

การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลปลาไหลเผือก

จากการสำรวจและรวบรวมพบว่ามีกระจายพันธุ์เกือบทุกภูมิภาคของประเทศไทย การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการสำรวจในพื้นที่เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณ 5 เขตทั้งหมด 18 จังหวัด รวบรวมได้ทั้งหมด 63 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.3.2) จำนวน 59 ตัวอย่างพบเป็นปลาไหลเผือก *Eurycoma longifolia* Jack และมีเพียง 4 ตัวอย่างเป็นปลาไหลเผือกน้อย *Eurycoma harmandiana* Pierre

ตารางที่ 3.3.2 แสดงตัวอย่างปลาไหลเผือก ที่สำรวจและเก็บรวบรวมในเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณของประเทศไทย

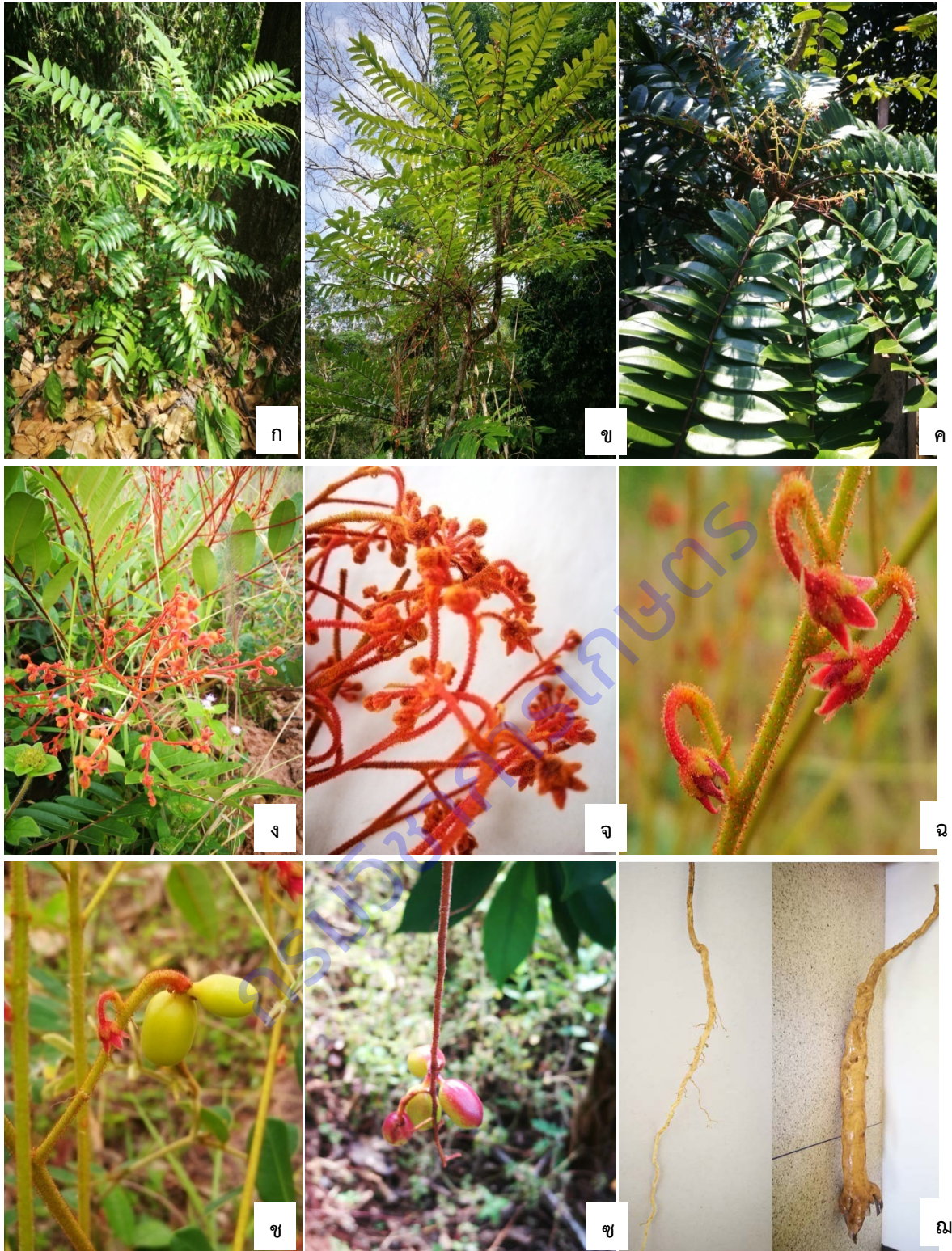
เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณ	จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง
ภาคเหนือ	ลำพูน	3 ตัวอย่าง	AK57, AK58, AK59
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ขอนแก่น	3 ตัวอย่าง	AK42, AK43, AK44
	เพชรบูรณ์	4 ตัวอย่าง	AK13, AK14, AK15, AK16
	สกลนคร	2 ตัวอย่าง	AK60, AK61
	เลย	2 ตัวอย่าง	AK62, AK63

ภาคตะวันออกเฉียงใต้	สุรินทร์	5 ตัวอย่าง	AK45, AK46, AK47, AK48, AK49
	ศรีสะเกษ	3 ตัวอย่าง	AK50, AK51, AK52
	อุบลราชธานี	4 ตัวอย่าง	AK53, AK54, AK55, AK56
ภาคตะวันออกเฉียงใต้	ปราจีนบุรี	4 ตัวอย่าง	AK17, AK18, AK19, AK20
	ระยอง	1 ตัวอย่าง	AK4
	จันทบุรี	3 ตัวอย่าง	AK35, AK36, AK41
	ตราด	4 ตัวอย่าง	AK37, AK38, AK39, AK40
ภาคใต้	ชุมพร	7 ตัวอย่าง	AK9, AK10, AK11, AK12, AK32, AK33, AK34
	ระนอง	5 ตัวอย่าง	AK21, AK22, AK23, AK24, AK25
	สุราษฎร์ธานี	1 ตัวอย่าง	AK3
	กระบี่	6 ตัวอย่าง	AK26, AK27, AK28, AK29, AK30, AK31
	สงขลา	4 ตัวอย่าง	AK5, AK6, AK7, AK8
	ยะลา	2 ตัวอย่าง	AK1, AK2
	รวม	18 จังหวัด	63 ตัวอย่าง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปลาไหลเผือก

1. ปลาไหลเผือก หรือปลาไหลเผือกใหญ่ *Eurycoma longifolia* Jack เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดเล็ก ต้นที่สำรวจพบในจังหวัดกระบี่ มีความสูงมากที่สุดประมาณ 6 เมตรอย่างไรก็ตามต้นที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติสามารถสูงได้ถึง 10-15 เมตร ใบเป็นใบประกอบ ยาว 20-40 เซนติเมตร ใบย่อยเรียงตรงข้าม รูปใบหอกแกมรูปไข่ กว้างหรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่ ขนาดใบย่อยกว้าง 1.5-6 เซนติเมตร ยาว 3-10 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อขนาดใหญ่ ยาวได้เกือบ 1 เมตร ดอกสีแดงที่ก้านช่อดอก แกนช่อ ก้านดอกและผิวด้านนอกของกลีบรอง กลีบดอก มีขนชนิดที่ปลายขนมีตุ่มพองสีส้มแดงกลีบรองกลีบดอกรูปสามเหลี่ยม ยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร กลีบดอกรูปคล้ายรูปไข่หรือรูปรี กว้าง 2-3 มิลลิเมตร มีขนนุ่ม ดอกตัวผู้และดอกสมบูรณ์เพศมีเกสรตัวผู้สมบูรณ์ 5 อัน ก้านชูอับเรณู ยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ดอกตัวเมียมีเกสรตัวผู้ที่ไม่สมบูรณ์และเล็กมาก ผลรูปรีป้อม กว้าง 5-12 มิลลิเมตร ยาว 10-17 มิลลิเมตร ก้านผลสั้น มักอยู่เป็นกลุ่ม 1-5 ผล ผลแก่มีสีแดง มี 1 เมล็ด รากขนาดใหญ่ เนื้อในรากมีสีขาว (ภาพที่ 3.3.1)

2. ปลาไหลเผือกน้อย *Eurycoma harmandiana* Pierre เป็นไม้พุ่มเล็กสูงไม่เกิน 1 เมตร มีรากแก้วขนาดใหญ่เพียงรากเดียวที่กิ่ง ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ยาว 8-18 เซนติเมตร เรียงสลับ มีใบย่อย 11-17 ใบ เรียงตรงข้ามรูปแถบ กว้าง 3-5 มิลลิเมตร ยาว 3-7 เซนติเมตร ไม่มีก้านใบย่อย ใบย่อยเรียวแคบ ปลายใบแหลม ด้านบนใบสีเขียวและเป็นมันเรียกว่าด้านล่าง ช่อดอกยาวไม่เกิน 20 เซนติเมตร มีขนนุ่มกระจายอยู่ทุกส่วนของ ดอก กลีบรองกลีบดอก 5 กลีบ รูปสามเหลี่ยมยาว 1-1.5 มิลลิเมตร กลีบดอกรูปรียาวปลายแหลม กว้าง 1-1.5 มิลลิเมตร ยาว 3-3.5 มิลลิเมตร มีขนนุ่มปกคลุมที่ผิวทั้งสองด้าน เกสรตัวผู้มี 5 อัน ก้านชูอับเรณูมีขน ผลสด มีประมาณ 5 ผลย่อย ทรงรี ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ก้านผลสั้นๆ เปลือกนอกบาง(ภาพที่ 3.3.2)



ภาพที่ 3.3.1 แสดงลักษณะต้น (ก, ข) ใบ (ค) ดอก (ง, จ, ฉ) ผลอ่อน (ช) ผลแก่ (ซ) และราก(ณ)
ของปลาไหลเผือก *Eurycoma longifolia* Jack



ภาพที่ 3.3.2 แสดงลักษณะต้น และ ใบ ของปลาไหลเผือกน้อย *Eurycoma harmandiana* Pierre

การจัดเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห่งอ้างอิงงานวิจัยของปลาไหลเผือก

ตัวอย่างพรรณไม้แห่งอ้างอิงของปลาไหลเผือก ได้ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร จำนวน 43หมายเลขอ้างอิง (BK number) รายละเอียดหมายเลขลงทะเบียน ดังแสดงในตารางที่ 3 เป็นตัวแทนของปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* และ *E. harmandiana* ซึ่งมีเพียง 2 ชนิดนี้ ที่มีรายงานการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย

ตารางที่ 3.3.3 ตัวอย่างพรรณไม้แห่งอ้างอิงของปลาไหลเผือก จำนวน 43 ตัวอย่าง ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเลขลงทะเบียน
1	AK1	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070660
2	AK2	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070661
3	AK4	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071290
4	AK9	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071291

5	AK18	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071292
6	AK21	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070662
7	AK22	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070663
8	AK23	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070664
9	AK24	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070665
10	AK25	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070666
11	AK26	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070667
12	AK27	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070668
13	AK28	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070669
14	AK29	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070670
15	AK30	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070671
16	AK31	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070672
17	AK32	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070673
18	AK33	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070674
19	AK34	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070675
20	AK35	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070676
21	AK36	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070677
22	AK37	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070678
23	AK38	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070679
24	AK39	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070680
25	AK40	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070681
26	AK41	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 070659
27	AK42	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071293
28	AK43	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071294
29	AK44	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071295
30	AK45	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071296
31	AK46	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071297
32	AK47	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071298
33	AK48	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071299
34	AK49	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071300
35	AK50	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071301
36	AK51	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071302
37	AK52	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071303
38	AK54	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071304
39	AK55	<i>Eurycoma harmandiana</i> Pierre	BK 071305
40	AK56	<i>Eurycoma harmandiana</i> Pierre	BK 071306
41	AK57	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071307

42	AK58	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071308
43	AK59	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	BK 071309





ภาพที่ 3.3.3 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของปลาไหลเผือก *E. longifolia* ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3.3.4 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของปลาไหลเผือก *E. harmandiana* ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

ความจำเพาะของดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาไหลเผือก

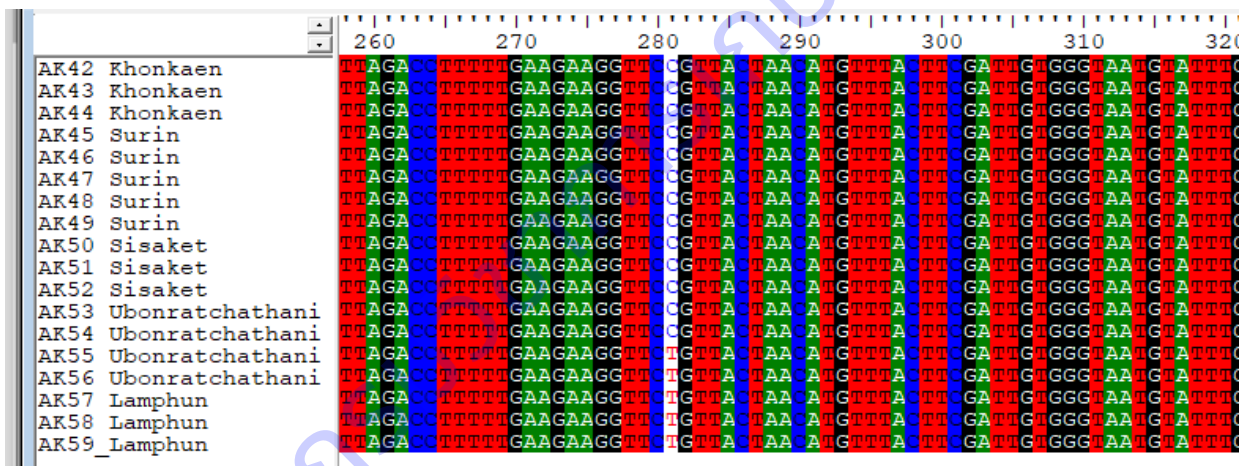
ผลการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยบริเวณ *rbcl*, *rpoC*, และ ITS ในปลาไหลเผือก พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกที่มีคุณภาพแตกต่างกัน ดังนี้ *rbcl* จำนวน 18 ตัวอย่าง, *rpoC* จำนวน 32 ตัวอย่าง, และ ITS จำนวน 32 ตัวอย่าง คิดเป็น 34.61%, 61.52% และ 61.52% ตามลำดับ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ความยาว 696-698 คู่เบส โดยปลาไหลเผือกชนิด *E. harmandiana* (AK55) มีความยาวมากที่สุด คือ 698 คู่เบส ในขณะที่ปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* ทั้ง 31 ตัวอย่าง มีความยาวเท่ากัน คือ 696 คู่เบส ส่วนดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rbcl* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ความยาว 526 คู่เบส โดยสามารถศึกษาปลาไหลเผือกได้ทั้ง 2 ชนิด คือ *E. harmandiana* และ *E. longifolia* และดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rpoC* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ความยาว 423 คู่เบส โดยตัวอย่างปลาไหลเผือกที่ศึกษาได้ทั้ง 32 ตัวอย่าง มีเฉพาะตัวแทนชนิด *E. longifolia* รวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้รวมทั้งสิ้น 82 ตัวอย่าง

จากการตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *rpoC* ด้วยการ BlastN พบว่า มีเพียงข้อมูลดีเอ็นเอของปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* หมายเลข GenBank accession MH751519 (Wei *et al.*, 2019) ซึ่งเป็นการศึกษาทั้งจีโนมพืชถูกลงทะเบียนบนที่ไว้บนระบบ NCBI ดังนั้น ข้อมูลดีเอ็นเอของปลาไหลเผือกที่ได้จากงานวิจัยนี้ทั้ง 32 ตัวอย่าง จึงเป็นข้อมูลใหม่ที่จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการใช้เป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rpoC* ในการพิสูจน์ชื่อปลาไหลเผือกในงานด้านสมุนไพร นอกจากนี้ยังพบว่าข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ของปลาไหลเผือกน้อยชนิด *E. harmandiana* บริเวณ *rbcl* และ ITS ที่ได้จากงานวิจัยนี้จำนวน 3 หมายเลข เป็นข้อมูลใหม่

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือก

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกทั้งบริเวณ *rbcl*, *rpoC*, และ ITS มาจัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าเมตริกซ์ของ *rbcl* ทั้ง 18 ตัวอย่าง มีความยาว 526 ตำแหน่ง โดยมีความหลากหลายที่เกิดจากการกลายแบบ pyrimidine transition (C \leftrightarrow T) ของตัวอย่างที่ตำแหน่งที่ 281 (ภาพที่ 3.3.5) โดยพบว่า ความผันแปรทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* แยกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจากเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ขอนแก่น: AK42, AK43, AK44) และเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออกเฉียงใต้ (สุรินทร์: AK45, AK46, AK47, AK48, AK49; ศรีสะเกษ: AK50, AK51, AK52; อุบลราชธานี: AK53, AK54) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น Cytosine (C) ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างจากเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคเหนือ (ลำพูน: AK57, AK58, AK59) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น Thymine (T) ส่วนปลาไหลเผือกชนิด *E. harmandiana* ซึ่งมาจากเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออกเฉียงใต้ (อุบลราชธานี: AK55, AK56) กลับแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น T เช่นเดียวกับปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* ที่มาจากเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคเหนือ



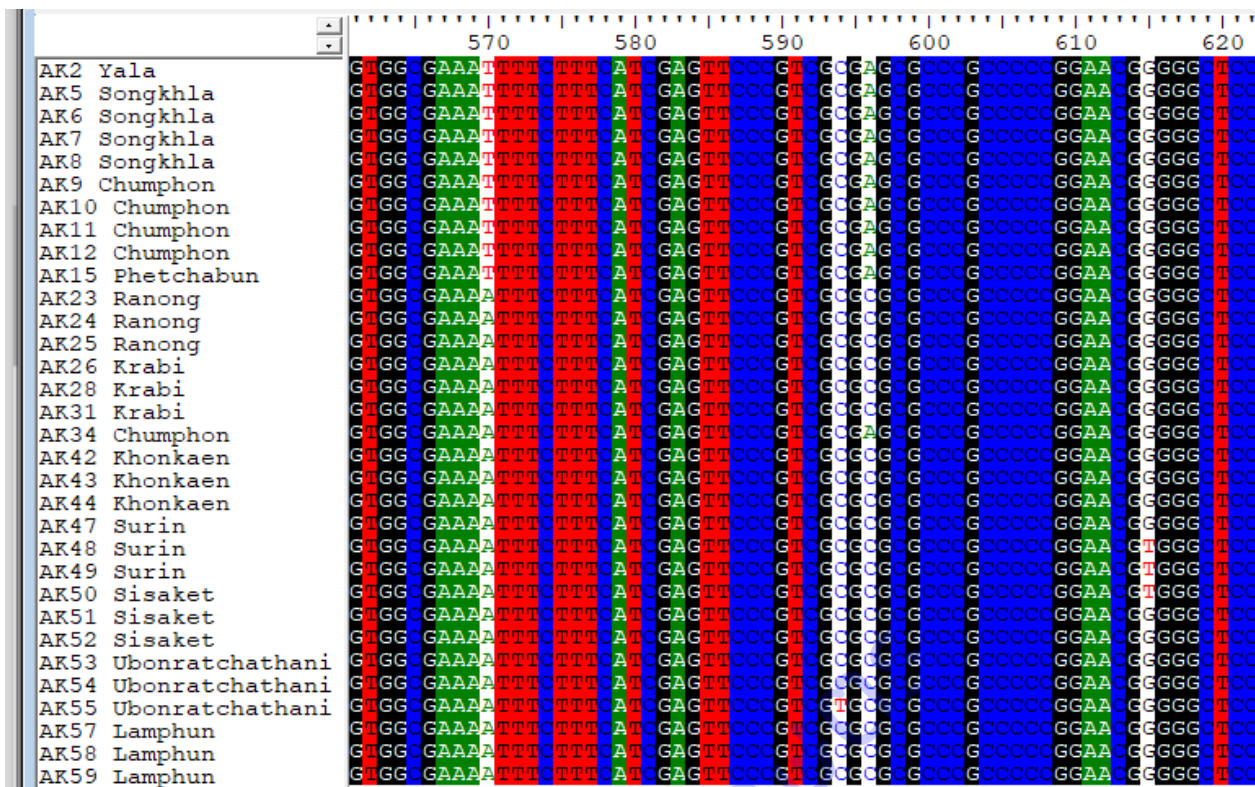
ภาพที่ 3.3.5 แสดงความหลากหลายรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาไหลเผือกบริเวณ *rbcl*

ส่วนเมตริกซ์ของ *rpoC* ทั้ง 32 ตัวอย่าง (ภาพที่ 3.3.6) เมื่อจัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งด้วยโปรแกรม ClustalW แล้ว พบว่ามีความยาว 423 ตำแหน่ง และไม่มีความหลากหลายรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ปรากฏในดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rpoC* ของปลาไหลเผือกทั้ง 32 ตัวอย่าง ซึ่งมีตัวแทนตัวอย่างมาจากพื้นที่แตกต่างกัน 3 เขต คือ เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เพชรบูรณ์: AK13, AK14, AK15, AK16) เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออกเฉียงใต้ (ปราจีนบุรี: AK17, AK18, AK19, AK20; ระยอง: AK4) และเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคใต้ (ยะลา: AK1, AK2; สุราษฎร์ธานี: AK3; สงขลา: AK5, AK6, AK7, AK8; ชุมพร: AK9, AK10, AK11, AK12, AK32, AK33, AK34; ระนอง: AK21, AK22, AK23, AK24, AK25; กระบี่: AK26, AK28, AK30, AK31) อย่างไรก็ตาม ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rpoC* ที่ศึกษาได้ในงานวิจัยนี้ มีเฉพาะตัวแทนของปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* จึงไม่สามารถทำนายได้ว่ามีความหลากหลายรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกชนิด *E. harmandiana* เกิดขึ้นหรือไม่

	310	320	330	340	350	360	370													
AK1 Yala	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK2 Yala	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK3 Suratthani	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK4 Rayong	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK5 Songkhla	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK6 Songkhla	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK7 Songkhla	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK8 Songkhla	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK9 Chumphon	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK10 Chumphon	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK11 Chumphon	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK12 Chumphon	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK13 Phetchabun	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK14 Phetchabun	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK15 Phetchabun	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK16 Phetchabun	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK17 Prachinburi	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK18 Prachinburi	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK19 Prachinburi	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK20 Prachinburi	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK21 Ranong	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK22 Ranong	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK23 Ranong	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK24 Ranong	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK25 Ranong	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK26 Krabi	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK28 Krabi	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK30 Krabi	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK31 Krabi	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK32 Chumphon	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK33 Chumphon	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C
AK34 Chumphon	GTTT	CATC	CA	TTAG	TTT	GTAAG	GGGATTTAA	G	AGA	TTT	GAT	TGGG	GA	AAA	TGG	T	GTT	CAT	GTA	C

ภาพที่ 3.3.6 แสดงบริเวณที่ไม่มี ความหลากหลายที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาไหลเผือก บริเวณ *rpoC*

ส่วนเมตริกซ์ของ ITS ทั้ง 32 ตัวอย่าง (ภาพที่ 3.3.7) เมื่อจัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งด้วยโปรแกรม ClustalW แล้ว พบว่ามีความยาว 696 ตำแหน่ง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 14 ตำแหน่งที่มีความหลากหลายที่เกิดจากการกลาย ทำให้มีความแตกต่างกันในปลาไหลเผือกแต่ละตัวอย่างซึ่งพบการกลาย 4 รูปแบบ ได้แก่ Indel พบที่ตำแหน่ง 135 และ 440, Purine transition พบที่ตำแหน่ง 145, Pyrimidine transition พบที่ตำแหน่ง 56, 211, 231, 464, 594 และ 658 และ transversion พบที่ตำแหน่ง 457, 466, 570, 596 และ 615 (ตารางที่ 3.3.4) ปลาไหลเผือกบริเวณบาร์โค้ด ITS ที่ศึกษาได้ในงานวิจัยนี้มีตัวแทนจาก 4 จาก 5 เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณที่เก็บสำรวจและรวบรวมมา ขาดเพียงตัวแทนจากเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้น ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกที่ได้จากข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS นี้ จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกต่อไป



ภาพที่ 3.3.7 แสดงตัวอย่างตำแหน่งที่มีความหลากหลายที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกบริเวณ ITS

ตารางที่ 3.3.4 แสดงรูปแบบการกลายที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกบริเวณ ITS

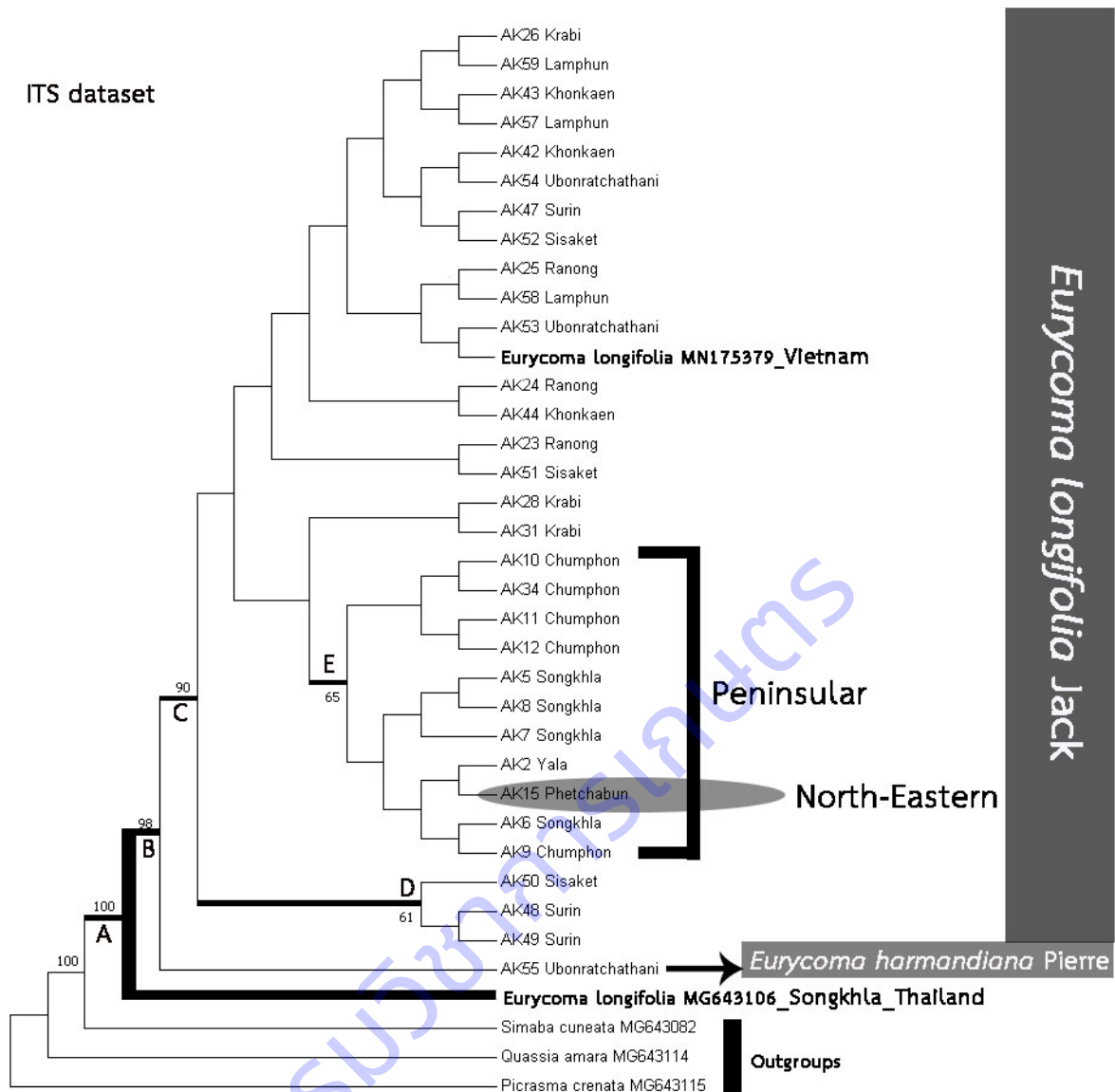
ตำแหน่งลำดับเบส	ความหลากหลายที่เกิดจากการกลาย	รูปแบบการกลาย
56	C/T	Pyrimidine transition
135	Gap, T	Indel
145	G/A	Purine transition
211	C/T	Pyrimidine transition
231	C/T	Pyrimidine transition
440	Gap, C	Indel
457	C/A	transversion
464	C/T	Pyrimidine transition
466	C/A	transversion
570	T/A	transversion
594	C/T	Pyrimidine transition
596	C/A	transversion
615	G/T	transversion
658	C/T	Pyrimidine transition

การวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือก

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rbcl* และ *rpoC* ไม่มีตัวแทนที่สามารถใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกของประเทศไทยได้ จึงใช้เฉพาะข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS ในการวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือก โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์

จำนวน 37 ตัวอย่าง ประกอบด้วย Ingroups จำนวน 34 ตัวอย่าง เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ 32 ตัวอย่าง และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ดาวน์โหลดจาก Genbank 2 ตัวอย่าง (GenBank accession no. MN175379 และ MG643106) และ Outgroups จำนวน 3 ตัวอย่าง (รายละเอียดดังแสดงไว้ในส่วนวิธีดำเนินการแล้ว)

ลำดับนิวคลีโอไทด์สุดท้ายใน ITS dataset มีความยาว 608 ตำแหน่ง แผนภูมิการแบ่งกลุ่มของ UPGMA bootstrap consensus ที่ได้แสดงค่า branch length เฉลี่ย 163.729 โดยพบว่า ปลาไหลเผือกทั้ง 34 ตัวอย่าง ใน **clade A** จับกลุ่มกันชัดเจนด้วยค่า bootstrap support 100% โดยมีปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* MG643109 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่กระจายพันธุ์ในจังหวัดสงขลา เขตภูมิศาสตร์พีชพรรณภาคใต้ จับกลุ่มอยู่ที่ฐาน แต่ *E. longifolia* MN175370 จากประเทศเวียดนามกลับจับกลุ่มกับปลาไหลเผือกของประเทศไทยใน **clade B** ด้วยค่า bootstrap support 90% เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มตัวอย่างใน **clade B** พบว่า ปลาไหลเผือกชนิด *E. harmandiana* แยกออกจากกลุ่มปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* อย่างชัดเจน ส่วนกลุ่มปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* จัดกลุ่มอยู่ด้วยกันใน **clade C** ด้วยค่า bootstrap support 90% โดยพบว่า ปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมแยกกลุ่มอย่างชัดเจนเพียง 2 กลุ่ม คือ **clade D** และ **clade E** ซึ่งใน **clade D** นั้น มีตัวแทนของปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* เพียง 3 ตัวอย่าง คือ จากศรีสะเกษ 1 ตัวอย่าง (AK50) และจากสุรินทร์ 2 ตัวอย่าง (AK48, AK 49) ซึ่งทั้ง 3 ตัวอย่างนี้กระจายพันธุ์อยู่ในเขตภูมิศาสตร์พีชพรรณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในขณะที่ตัวอย่างจากศรีสะเกษอีก 2 ตัวอย่าง (AK51, AK52) และจากสุรินทร์อีก 1 ตัวอย่าง (AK47) ไม่ได้แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมแยกออกได้ชัดเจนจากปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* ตัวอื่น อย่างไรก็ตาม ค่า bootstrap support ใน **clade D** นี้กลับต่ำเพียง 61% ส่วนใน **clade E** พบตัวแทนของปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* จำนวน 11 ตัวอย่าง จับกลุ่มกันด้วย bootstrap support ต่ำเช่นกันที่ 65% โดยพบสมาชิกส่วนใหญ่มาจากเขตภูมิศาสตร์พีชพรรณภาคใต้ คือ ชุมพร (AK9, AK10, AK11, AK12, AK34) สงขลา (AK5, AK6, AK7, AK8) และยะลา (AK2) แต่ที่น่าสนใจคือ มีสมาชิกจากเพชรบูรณ์ (AK15) ซึ่งอยู่ในเขตภูมิศาสตร์พีชพรรณภาคตะวันออกเฉียงเหนือรวมอยู่ด้วย ส่วนสมาชิกที่เหลือตัวอื่นๆ ของ **clade C** ไม่ได้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แตกต่างออกไป



ภาพที่ 3.3.8 UPGMA bootstrap consensus tree แสดงการการจัดกลุ่มของปลาไหลเผือกบริเวณ ITS: เส้นดำหนาแสดง clade ของ Ingroups และ clade ที่มีค่า bootstrap support มากกว่า 50%

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การศึกษาความหลากหลายของปลาไหลเผือกในประเทศไทยจากตัวอย่างที่สำรวจรวบรวมมาได้จากการแบ่งเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณของประเทศไทย 5 เขต ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณคลอโรพลาสต์ *rbcL*, *rpoC* และบริเวณนิวเคลียร์ ITS ได้ข้อมูลดีเอ็นเอที่จะลงทะเบียนเก็บรักษาไว้บนระบบออนไลน์ของ National Center for Biotechnology Information เพื่อใช้ในการระบุยืนยันปลาไหลเผือกรวมทั้งสิ้น 82 ข้อมูล โดยพบว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rbcL* และ *rpoC* ไม่มีตัวแทนที่สามารถใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ จึงใช้เฉพาะข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS ในการวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกโดยพบว่า สามารถแยกกลุ่มปลาไหลเผือก และปลาไหลเผือกน้อย ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และสามารถแบ่งปลาไหลเผือกได้เป็น 2 กลุ่ม และควรมีการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาไหลเผือกที่กระจายพันธุ์ในเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณอีก 2 เขตที่เหลือเพิ่มเติม เพื่อความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นของงานวิจัย

การทดลองที่ 3.5
ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดสมุนไพรเพื่อการอนุรักษ์ : หนอนตายหยาก
DNA barcode for identification of Conservation of *Stemona* sp.

ชื่อผู้วิจัย

สุกัลยา ศิริฟองนุกูล พัฒน์นรี รักษ์คิด
Sukunlaya Sirifongnukul Padharee Rukkid

คำสำคัญ (Key words)

คำสำคัญ (TH) หนอนตายหยาก การอนุรักษ์เชื้อพันธุพืชดีเอ็นเอบาร์โค้ด

คำสำคัญ (EN) Non-Tai-Yak, *Stemona* sp., Plant conservation, DNA barcode

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาและรวบรวมพืชสกุลหนอนตายหยาก (*Stemona* sp.) ที่พบในประเทศไทย จากแหล่งที่มาต่างกัน 11 แห่ง จำแนกตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ได้จำนวน 6 ชนิด (species) ได้แก่ *Stemona curtisii* Craib., *S. collinsiae* Craib., *S. tuberosa* Lour., *S. rupestris* Inthachub., *S. pierreii* Gagnep. และ *S. phyllantha* Gagnep. สามารถสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอได้จากพืชตัวอย่างที่คัดเลือกมาได้ทั้งหมด ทำการศึกษาไพรเมอร์จากดีเอ็นเอบาร์โค้ด 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS5, *trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcl* พบว่า การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวยีนทั้ง 5 ตำแหน่ง มีค่าความสำเร็จเท่ากับ 71.42%, 62.85%, 88.57%, 62.85% และ 45.71% ตามลำดับ จากผลผลิตพีซีอาร์ที่ตำแหน่งยีน *trnL-trnF* ให้ผลผลิตเป็น double-stand ทั้งหมดจึงไม่นำไปทดสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ของตำแหน่งยีน ITS, *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcl* ไปทดสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมีค่าความสำเร็จร้อยละ 34.28, 37.14, 62.85 และ 45.71 ตามลำดับ ตรวจสอบภาพโครมาโตแกรมที่ตำแหน่งยีน ITS พบมีความปนเปื้อนสูงไม่เหมาะสมสำหรับการนำไปทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด จากนั้นจึงนำเอาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากตำแหน่งยีน *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcl* มาตรวจสอบความถูกต้องด้วยโปรแกรม BioEdit แล้วทำการเปรียบเทียบค่า K2P distance ด้วยโปรแกรม MEGA7 ระหว่างชนิดของพืชสกุลหนอนตายหยากในแต่ละตำแหน่งยีนที่ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ข้อมูลค่าเฉลี่ย K2P distance ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากตำแหน่งยีน *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcl* มีค่าเท่ากับ 0.009, 0.004 และ 0.007 แสดงว่าพืชสกุลหนอนตายหยากแต่ละชนิดในแต่ละตำแหน่งยีนมีความใกล้เคียงกันสูงมาก เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมจากแต่ละยีน พบว่า ยีน *matK* และ *rbcl* สามารถจัดทำเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุลหนอนตายหยากที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้ โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* สามารถจัดจำแนกพืชสกุลหนอนตายหยากได้ 3 ชนิด คือ *S. curtisii* Hook. f., *S. rupestris* Inthachub. และ *S. pierreii* Gagnep. และดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rbcl* สามารถจำแนกพืชสกุลหนอนตายหยากได้ 2 ชนิด คือ *S. tuberosa* Lour. และ *S. phyllantha* Gagnep.

Abstracts

In this study, plants in genus *Stemona* in Thailand were collected from 11 sources, six species of genus *Stemona* were identified by morphology; *S. curtisii* Hook. f., *S. collinsiae* Craib.,

S. tuberosa Lour., *S. rupestris* Inthachub, *S. pierrei* Gagnep. and *S. phyllantha* Gagnep. Genomic DNA was successfully extracted from every selected specimen. Five primer of DNA regions, ITS5, *trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *matK* and *rbcl* were studied for DNA barcode. Upon PCR amplification, success rate of PCR amplification of ITS5, *trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *matK* and *rbcl* were 71.42%, 62.85%, 88.57%, 62.85% and 45.71%, respectively. The *trnL-trnF* primer was eliminated due to double-stand of PCR product. The PCR product of ITS, *psbA-trnH*, *matK* and *rbcl* gene region were tested for nucleotide sequencing. Nucleotide sequence reading had success value of 34.28%, 37.14%, 62.85% and 45.71%, respectively. Sequences were validated in BioEdit program and ITS5 region was eliminated due to high contaminated chromatogram. Kimura-2 distances between pairs of *Stemona* each region were calculated by MEGA7. The average K2P of *psbA-trnH*, *matK* and *rbcl* gene were 0.009, 0.004 and 0.007, respectively. It showed that each species of genus *Stemona* in each gene region was very closely related. When phylogenetic tree from each gene region were charted, it was found that the *matK* and *rbcl* genes were able to form the DNA barcodes of the genus *Stemona* used in this research. The *matK* was able to classified *S. curtisii* Hook. f., *S. rupestris* Inthachub and *S. pierrei* Gagnep. and the *rbcl* was able to classified *S. tuberosa* Lour. and *S. phyllantha* Gagnep.

บทนำ (Introduction)

หนอนตายหยาก (*Stemona* Lour.) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ชาวบ้านรู้จักและมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนของราก โดยมีชื่อแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น แต่ที่รู้จักกันทั่วไป คือ หนอนตายหยากใหญ่ และหนอนตายหยากเล็ก (วุฒิ, 2552) ซึ่งอาจเรียกตามลักษณะของรากที่มีขนาดแตกต่างกัน สารออกฤทธิ์ที่ต้นหนอนตายหยากสร้างขึ้นมานั้นมีสะสมอยู่ในส่วนของรากที่มีลักษณะคล้ายกระสวยเกาะกันเป็นกระจุก แต่เดิมชาวบ้านรู้จักนำมาใช้ฆ่าเห็บเหาในสัตว์ประเภทโคกระบือ (วีระพลและคณะ, 2536) บางชนิดใช้ฆ่าหนอนหรือใส่ในไผ่ปลาร้าเพื่อป้องกันหนอนแมลงวัน (พนมกร, 2550) ปัจจุบัน จากการส่งเสริมการใช้สารสกัดจากธรรมชาติทดแทนสารเคมีในภาคเกษตรกรรมซึ่งหนอนตายหยากก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระตุ้ม หนอนไผ่ฝัก ด้วงหมัดฝัก และด้วงวงข้าวโพด ได้ (อริยาภรณ์ และคณะ, 2547) นอกจากนี้ รากหนอนตายหยากยังเป็นส่วนผสมในตำรับยาแผนไทยใช้รักษาโรคได้ สารออกฤทธิ์ที่สะสมอยู่ในรากหนอนตายหยากนั้นเป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ (*Stemonaalkaloid*) มีหลายชนิด แบ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช และจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ได้หลายชนิด (Pilli and Ferreira de Oiveira, 2000; Yang *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า สาร 1',2' -didehydrostemofoline และ stemofoline จากรากหนอนตายหยากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ (Baird *et al.*, 2009) การปลูกและขยายพันธุ์หนอนตายหยากในสภาพธรรมชาติต้องใช้เวลาหลายปี จึงจะได้หนอนตายหยากที่มีขนาดรากที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ ส่งผลให้มีการขุดต้นหนอนตายหยากออกจากป่ามาขายเป็นจำนวนมาก จากในอดีตที่สามารถหาได้ง่ายและมีการกระจายพันธุ์ทั่วประเทศ แต่ในปัจจุบันกลับพบได้น้อย การค้นหาเพื่อขุดออกมาขายต้องเข้าค้นหาในป่าลึกมากขึ้น อย่างไรก็ตาม Pajaree (2008) รายงานพบพืชสกุลหนอนตายหยาก 9 ชนิด (species) ได้แก่ *Stemonaaphylla*, *S. burkillii* Prain, *S. cochinchinensis* Gagnep., *S. collinsiae* Craib, *S. curtisii* Hook. F., *S. kerrii* Craib, *S. phyllantha* Gagnep., *S. pierrei* Gagnep. และ *S. tuberosa* และรายงานจาก Flora of Thailand (2011) พบพืชสกุลหนอน

ตายหยาก ในประเทศไทยทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ *Stemonaaphylla*, *S. burkillii*, *S. cochinchinensis*, *S. collinsiae*, *S. curtisii*, *S. involuta*, *S. kerrii*, *S. phyllantha*, *S. pierrei*, *S. rupestris* และ *S. tuberosa* และลักษณะทางกายภาพคล้ายคลึงกันมาก โดยเฉพาะส่วนรากที่เป็นวัตุุดิบหลักในการนำมาใช้เป็นสมุนไพรสมุนไพรเพื่อการรักษาโรคหรือการนำมาใช้เพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งคุณสมบัติของรากพืชสกุลหนอนตายหยากแต่ละชนิดถูกนำมาใช้ประโยชน์แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องระมัดระวังในการนำรากของชนิดพืชมาใช้ให้ถูกต้องตามวัตถุประสงค์ มิฉะนั้นอาจเกิดอันตรายต่อผู้บริโภคและ/หรือไม่ได้ประสิทธิภาพตามความต้องการ

การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของหนอนตายหยากจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชจำเป็นต้องมีความรู้ความเชี่ยวชาญ เนื่องจากพืชมีความคล้ายคลึงกันดังที่กล่าวมาข้างต้น อีกทั้งการตรวจสอบระบุชนิดพืชด้วยวิธีดั้งเดิมแบบนี้จำเป็นต้องอาศัยส่วนประกอบของชิ้นตัวอย่างพืชที่สมบูรณ์ทั้งใบ ดอก ผล ราก แต่หนอนตายหยากที่นำมาบริโภคหรือจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดกลับอยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์หรือเฉพาะส่วนราก จึงไม่สามารถระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของหนอนตายหยากเหล่านั้นได้ ดังนั้น การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลจึงเป็นอีกทางเลือกที่มีประสิทธิภาพ และเป็นที่ยอมรับในปัจจุบันในการช่วยพิสูจน์ยืนยันชนิดของหนอนตายหยาก ซึ่งนอกจากจะช่วยตรวจสอบการปนเปื้อนของชนิดหนอนตายหยากที่นำมาใช้ประโยชน์แล้ว ยังเป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชนิดหนอนตายหยากด้วย รวมถึงสามารถจัดทำเป็นฐานข้อมูลชีวโมเลกุลควบคู่ไปกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นประโยชน์สำคัญในการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช และจะช่วยแก้ปัญหาการใช้ประโยชน์เชื้อพันธุ์พืช การคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาที่มีการนำเชื้อพันธุ์พืชไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าในอนาคต งานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอ (DNA) ของพืชด้วยเทคนิค DNA barcode ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาข้อมูลของดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์ (chloroplast) และนิวเคลียส (nuclear) ร่วมกัน ซึ่งในปัจจุบันมีช่วงดีเอ็นเอที่ผ่านการศึกษากการใช้เป็นบาร์โค้ดสำหรับพืชหลายช่วงด้วยกันตัวอย่างเช่น *matK*, *rbcL*, internal transcribed spacers (ITS), *psbA-trnH* intergenic spacer, *trnL-trnF* intergenic spacer เป็นต้น (วุฒิพงศ์, 2554) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาข้อมูล DNA barcode ของพืชสกุลหนอนตายหยาก มาใช้ในตรวจสอบและจัดทำฐานข้อมูล DNA barcode ของพืชสกุลหนอนตายหยากที่เก็บรวบรวมและอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่างรายงานการศึกษา ดังนี้

มณฑาและคณะ (2551) ศูนย์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้จำแนกชนิดของพืชสกุลหนอนตายหยากโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ร่วมกับการจำแนกด้วยอนุกรมวิธาน โดยพิจารณาจากใบและดอก สามารถจำแนกได้ 9 ชนิด คือ *Stemona kerrii*, *S. tuberosa* Lour., *S. tuberosa* cf. *phyllantha*, *S. burkillii*, *S. curtisii*, *S. collinsiae* Craib., *S. cochinchinensis* Unknown group-1 และ Unknown group-2

ณริพร (2555) ศึกษาการจำแนกเพื่อระบุชนิดพืชสกุลหนอนตายหยากจากแปลงรวมพันธุ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่จำนวน 44 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค AFLP ร่วมกับเทคนิค SCAR พบว่า สามารถจำแนกตัวอย่างต้นหนอนตายหยากได้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม จากนั้นคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับพืชสกุลหนอนตายหยากชนิด *S. burkillii* Prain., *S. curtisii* Hook. f., *S. tuberosa* Lour. และแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในพืชสกุลหนอนตายหยากทุกชนิด จำนวน 20 แถบ นำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับตรวจสอบชนิดของพืชสกุลหนอนตายหยากด้วยเทคนิค SCAR ได้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ที่สามารถนำไปตรวจสอบชนิดของพืชสกุลหนอนตายหยากได้

ณรีพร และคณะ (2558) ใช้เทคนิค HAT-RAPD ในการระบุชนิดของหนอนตายหยากจากราก เพื่อตรวจสอบชนิดของหนอนตายหยากที่ใช้เป็นวัตถุติดสำหรับการสกัดสารกำจัดศัตรูพืช คือ สาร stemocurtisine ซึ่งพบว่ามีมากที่สุดจากรากของพืชสกุลหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii* ซึ่งพบปัญหาจากการจัดซื้อวัตถุติดเนื่องจากไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างรากของ *S. curtisii* กับรากของหนอนตายหยากชนิดอื่นได้ด้วยตาเปล่า เพราะมีความคล้ายคลึงกัน ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิค HAT-RAPD โดยมีไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ (จากไพรเมอร์ที่คัดเลือกจำนวน 20 ไพรเมอร์) สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *S. curtisii* แตกต่างจากหนอนตายหยากชนิดอื่นได้

อภิชา และสิริพร (2558) ศึกษาการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค sequence related amplified polymorphism (SRAP) ของต้นหนอนตายหยาก จำนวน 160 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ เมื่อนำไปสร้างภาพแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ 5 กลุ่ม ได้แก่ *S. kerrii* Craib, *S. tuberosa* Lour., *S. curtisii* Hook.f. และ *S. burkillii* Prain และกลุ่มตัวอย่างที่ยังไม่ทราบชนิดแต่ลักษณะของใบคล้ายกับ *S. tuberosa* Lour.

การทบทวนวรรณกรรม

ข้อมูลด้านพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลหนอนตายหยาก

พืชพวกหนอนตายหยากเป็นพืชสกุล *Stemona* Lour. วงศ์ *Stemonaceae* สามารถพบได้ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย แต่จะพบมากบริเวณป่าเชิงเขาไม่สูงมากนักในแถบภาคกลางและภาคเหนือ เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอายุหลายปี มีลักษณะเป็นทั้งแบบไม้เลื้อยคลุม เลื้อยพัน ทอดนอน หรือตั้งตรง ลำต้นใต้ดินเป็นเหง้าสั้นๆ มีระบบรากเป็นรากสะสมอาหาร ออกเป็นกระจุกจำนวนมาก ใบเป็นใบเดี่ยว มีทั้งแบบเรียงสลับ แบบระนาบเดียว เรียงตรงข้าม หรือเรียงเป็นวง แผ่นใบเรียบรูปร่างแผ่นใบรี ไข่แกมรี หรือไข่กว้าง ฐานใบรูปหัวใจ หรือสอบเรียว เส้นใบขนาดตามยาวมีหลายเส้นเห็นได้ชัดเจนขนานกับขอบใบ เจริญออกจากจุดเดียวกัน ระหว่างเส้นใบตามยาวจะมีเส้นใบย่อยกั้นกลางออกมาประสานกันจนดูเป็นตาสี่เหลี่ยม โคนก้านใบป้องดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือช่อดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีกลีบรวม 4 กลีบ เกสรเพศผู้ 4 อัน เกสรเพศเมีย 1 อัน 2 คาร์เพล 1 ช่อ รังไข่อยู่เหนือวงกลีบรวม ก้านเกสรเพศเมีย 1 อัน บางชนิดผลแห้งแตก 2 ซ้ำง เมล็ดมีรูปทรงรีกว้าง มีสันนูนยาวตามความยาวของเมล็ดชัดเจนหรือเลือนราง ก้านเมล็ดยาว เมล็ดสร้างปุยหุ้มเมล็ดชนิดพิเศษเรียกว่า elaiosome มีลักษณะฉ่ำน้ำและเป็นที่สะสมไขมัน (ปาจารย์, 2551) การขยายพันธุ์ต้นหนอนตายหยากตามธรรมชาติ แบ่งออกเป็น 2 วิธี (เมธี, 2544) คือ การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการเพาะเมล็ดให้เจริญเป็นต้นใหม่ แต่เนื่องจากหนอนตายหยากมีการพักตัวในฤดูหนาว จึงต้องใช้เวลาในการเจริญเติบโตหลายปี จึงจะสามารถนำรากมาใช้ประโยชน์ได้ และการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการใช้กระจุกรากที่มีส่วนของเหง้าและตาติดอยู่ นำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำและความชื้นสูง ซึ่งจะช่วยให้ตาเจริญขึ้นจากเหง้าหรือลำต้นที่หุดสั้นเหนือกระจุกรากนั้น จากนั้นจึงตัดแบ่งรากตามจำนวนตาที่แตกยอดใหม่เหนือกระจุกราก แยกปลูกเป็นต้นกล้าใหม่ได้นอกจากนี้ มีการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชช่วยเพิ่มจำนวนต้นหนอนตายหยากให้ได้เป็นจำนวนมากในเวลาสั้นๆ เพื่อให้ได้ต้นทดแทนการสูญเสียจากการชุดออกจากป่าจำนวนมาก และเพื่อเป็นวัตถุติดทดแทนการชุดต้นหนอนตายหยากออกจากป่า (รังสฤษดิ์, 2540; อารีย์, 2541; นิตยศรี, 2551)

ประโยชน์ของพืชสกุลหนอนตายหยาก

ต้นหนอนตายหยากเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ ชาวบ้านรู้จักนำมาใช้ประโยชน์ในการฆ่าเห็บเหา ในสัตว์ประเภทโคกระบือและมีรายงานพบว่าสารสกัดรากหนอนตายหยากที่ความเข้มข้น ร้อยละ 50 สามารถฆ่าเห็บในระยะเวลาตัวอ่อนและระยะตัวเต็มวัยได้สูงสุดที่ร้อยละ 100 และ 93.33 ตามลำดับ โดยไม่พบผลข้างเคียง เนื่องจากการแพ้สารสกัดดังกล่าว (วีระพล และคณะ, 2536) บางชนิดใช้ฆ่าหนอน หรือใส่ในไหปลาร้าเพื่อกำจัด หนอนแมลงวันและแมลงศัตรูพืช (พนมกร, 2550) ในร้านขายยาแผนโบราณประเทศจีนหนอนตายหยากจะถูก เรียกชื่อว่า “Pai-pu” มีสรรพคุณใช้เป็นยาแก้ไอ ยาขับลม ยาถ่ายพยาธิลำไส้ ส่วนประเทศแถบอินโดจีนมีการนำ รากของต้นหนอนตายหยากมาใช้เป็นยารักษาโรคเจ็บหน้าอก แก้กโรคผิวหนัง (Stuart, 1911) ในส่วนของการทำ การเกษตรกรรมนั้น ได้มีการนำรากของหนอนตายหยากมาบดละเอียดแล้วนำไปละลายน้ำ และนำน้ำที่กรองได้มา ใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้ เช่นการใช้สารสกัดจากรากต้นหนอนตายหยากทำลายหนอนกระทู้ผักและแมลงวัน ทอง (อำนาจและอรณพ, 2535) การควบคุมปริมาณหนอนในแปลงปลูกพืชตระกูลกระหล่ำ (กฤตชญา, 2547) เป็นต้นและจากรายงานของ Jiyavorrant (2001) พบว่า สารสกัดจากรากหนอนตายหยาก สามารถทำให้ หนอนใยผักตายได้ร้อยละ 62.5 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และพบการตกค้างของสารสกัดหยากจากหนอนตายหยากในปริมาณเล็กน้อยในช่วง 24 ชั่วโมง แต่เมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมง ไม่พบการตกค้างของสารสกัด

สารออกฤทธิ์ในรากต้นหนอนตายหยาก

จากรายงานของ Pilli *et al.* (2005) พืชสกุลหนอนตายหยาก (*Stemona* Lour.) มีสารทุติยภูมิ ที่ออกฤทธิ์อยู่ในกลุ่มอัลคาลอยด์เรียกว่า *Stemonaalkaloids* พบว่ามีมากกว่า 80 ชนิด จัดแบ่งเป็น 8 กลุ่มตาม โครงสร้างหลักคือ 1. กลุ่ม stenine 2. กลุ่ม stemoamide 3. กลุ่ม tuberostemospironine 4. กลุ่ม stemonamine 5. กลุ่ม pavistemoline 6. กลุ่ม stemofoline 7. กลุ่ม stemocurtisin 8. กลุ่มอื่นๆ หรือ เรียกว่า miscellaneous group โดยต้นหนอนตายหยากแต่ละชนิดมีสาร *Stemona alkaloids* สะสมอยู่ในราก แตกต่างกันไป เช่น *Stemona tuberosa* มีสารอัลคาลอยด์ที่สามารถระบุชนิดได้แล้ว 14 ชนิด เช่น stenine, stemoamide, tuberostemone, didehydrohuberostemone, stemotinine, tuberostemospironine เป็นต้น นอกจากนี้ Chotikadachanarong *et al.* (2011) ได้รายงานผลการวิเคราะห์สารใน *S. curtisii* Hook. *f.* พบว่ามี oxyprotostemone, stemocurtisine และ stemocurtisinol ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดแมลง ศัตรูพืช ตรงกับรายงานของ เจษฎาภรณ์ (2554) ที่วิเคราะห์สารใน *S. kerrii* พบสารทั้ง 3 ชนิดเช่นเดียวกัน

การศึกษาด้านอนุกรมวิธาน และการทำ DNA barcodes

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของพืช โดยเฉพาะข้อมูลทางด้านอนุกรมวิธานนั้น เมื่อ เทียบกับความหลากหลายของพืชในประเทศไทย โดยเฉพาะพืชสมุนไพรใช้เป็นยา หรือใช้ทดแทนสารเคมีทางการ เกษตร ยังถือว่ามีจำนวนน้อย และจากการเข้าป่าเพื่อขุดถอนพรรณไม้มาใช้ประโยชน์เพียงแค่การอยู่กินและรักษา โรคร้อยละประมาณในอดีต ปัจจุบันกลับพบว่าการขุดถอนพืชพรรณออกจากป่าเป็นการทำเพื่อการค้าใน ปริมาณมากขึ้นหลายเท่าตัวซึ่งรวมถึงพืชสกุลหนอนตายหยากด้วยเช่นกัน ประกอบกับการขยายตัวของภาค เกษตรกรรมที่ปลูกพืชเชิงเดี่ยวมากขึ้นทำให้ต้นหนอนตายหยาก และพืชสมุนไพรหลายชนิด ที่ถือว่าเป็นวัชพืชและ ถูกกำจัดไป ทำให้มีความพยายามที่จะอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชเพิ่มขึ้น

การศึกษาด้านอนุกรมวิธานพืชนั้น แบ่งเป็น

1) การศึกษาระดับพื้นฐาน เช่น การจำแนกโดยอาศัยหลักการจำแนกทางสัณฐานวิทยาพืช ลักษณะทางกายวิภาคของพืช ลักษณะละอองเรณู ลักษณะดอกและผล เป็นต้น จากรายงานของ Pajaree (2008)

เป็นการศึกษาการสำรวจและจำแนกพืชวงศ์ Stemonaceae ในประเทศไทย สามารถสำรวจและจำแนกพืชในวงศ์ Stemonaceae ได้ 2 สกุล คือ *Stemona* Lour. (9 ชนิด) และ *Stichoneuron* Hook. f. (1 ชนิด) รวมทั้งหมด 10 ชนิด (Species) ซึ่งกระจายตัวอยู่ในพื้นที่ตั้งแต่ความสูงระดับน้ำทะเล จนถึงที่ระดับความสูง 1,200 เมตรจากระดับน้ำทะเล

2) การศึกษาระดับสูง คือ การใช้เทคโนโลยีขั้นสูงเพื่อตรวจสอบและระบุชนิดของพืชได้อย่างแม่นยำและรวดเร็วโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเป็นเครื่องมือในการศึกษาจำแนก เช่น เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) และ Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) รวมทั้งเทคโนโลยีล่าสุดที่เป็นที่น่าสนใจสำหรับการนำมาใช้ศึกษาอนุกรมวิธานพืช เพื่อให้ตรวจสอบและระบุชื่อพืชได้อย่างถูกต้องในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งก็คือเทคนิค DNA barcodes นั่นเอง ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้หลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในส่วนของดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แน่นอนแล้ว (Casirghi et al., 2010; วุฒิพงศ์, 2554) วิธีนี้ นอกจากจะสามารถตรวจสอบ พิสูจน์ และยืนยันการระบุชนิดของพืชได้อย่างถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือ ยังสามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชได้ด้วย เช่น การศึกษา DNA barcode เพื่อการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุลขี้เหล็ก (พรรษา และคณะ, 2556) พบว่า บริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer และ *rbcL* สามารถระบุชนิดของพืชได้ดี เมื่อนำสมุนไพรที่แปรรูปแล้ว จำนวน 11 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer และ *rbcL* ได้ 7 ตัวอย่าง โดยบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer สามารถใช้ระบุชนิดของสมุนไพรแปรรูปได้ดีที่สุดคิดเป็น 71.43% เป็นต้น

ระเบียบวิธีการวิจัย(Research Methodology)

อุปกรณ์

1. แผงอัดพรรณไม้แห้ง เชือกมัด
2. กระดาษลูกฟูก แผ่นฟองน้ำ สำหรับอัดพรรณไม้
3. เชือก กรรไกรตัดกิ่ง ป้ายชื่อ ดินสอ ถุงพลาสติก
4. สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ และการทำพีซีอาร์ เช่น ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy plant kit (50) , Qiagen แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ชุดน้ำยา Master Mix สำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction : PCR) น้ำกลั่นเป็นต้น
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูง
6. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
7. เครื่องวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation)
8. เครื่อง Gel electrophoresis
9. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

วิธีการ

- 1 ตัวอย่างหนอนตายหยากที่ใช้ในการศึกษา และการเก็บรักษา

(1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชหนอนตายหยากจากแหล่งต่างๆ มาปลูกเลี้ยงเพื่อการอนุรักษ์ในโรงเรียนของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

(2) นำพืชสมุนไพรหนอนตายหยากที่รวบรวมมาปลูกอนุรักษ์จัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (Herbarium specimen) ตามหลักการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งเพื่ออ้างอิงงานวิจัยตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บรวบรวมขึ้นตัวอย่าง ติดป้ายหมายเลขพันธุ์ บันทึกข้อมูล อัตราและอบแห้ง ออบน้ำยารักษาสภาพพรรณไม้ ติดฉลาก รายละเอียดพืช และส่งลงทะเบียนเก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

(3) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อระบุชนิด โดยเปรียบเทียบข้อมูลจากรายงานของ Pajaree (2008) และ Flora of Thailand (2011)

2 การสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอ และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

(1) นำใบพืชสกุลหนอนตายหยากมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNeasy Plant kit, Qiagen) วัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แบ่งเป็น 2 ชุดต่อ 1 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ชุด และเก็บเป็นตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิงงานวิจัยอีก 1 ชุด

(2) นำตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นหนอนตายหยากที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะบริเวณ ITS, *trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcL* (ตารางที่ 3.4.1) มาทำการทดสอบเพื่อการคัดเลือกไพรเมอร์สากลที่มีความจำเพาะสูงกับดีเอ็นเอมาตรฐานจากบริเวณคลอโรพลาสต์และนิวเคลียร์ โดยใช้เทคนิคการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยใช้สภาวะเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 3.4.2 จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Electrophoresis ใน Agarose gel 1.8% ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 40 นาที ในสารละลาย 1X TBE บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง Gel Documentation System

(3) นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (U2Bio (Thailand) Co., Ltd.) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit7 โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสมุนไพรหนอนตายหยากที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้ไปจัดเรียง (Alignment) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละยีนร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสกุลหนอนตายหยากซึ่งเป็น Ingroup taxa และ Outgroup taxa ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank (<https://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) โดยใช้โปรแกรม ClustalW (Thompson *et al.*, 1994)

(4) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) ด้วยวิธี Maximum Likelihood : ML โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 ซ้ำ

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

เริ่ม 1 ตุลาคม 2563 สิ้นสุด 30 กันยายน 2564 รวม 2 ปี

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3.4.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ตำแหน่ง/ยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
<i>trnL-trnF</i>	c	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	Fan <i>et al.</i> , 2009
<i>trnL-trnF</i>	f	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	Fan <i>et al.</i> , 2009

<i>psbA-trnH</i>	<i>psbA</i>	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	Sang et al., 1997
<i>psbA-trnH</i>	<i>trnH</i>	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	Tate & Simpson, 2003
ITS	ITS5	GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G	White et al., 1990
ITS	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al., 1990
<i>matK</i>	3F_KIM	CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA	Li et al., 2011
<i>matK</i>	1R_KIM	ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC	Li et al., 2011
<i>rbcL</i>	<i>a_f</i>	ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC	Kress and Erickson, 2007
<i>rbcL</i>	<i>a_r</i>	CTT CTG CTA CAA ATA AGA ATC GAT CTC	Kress and Erickson, 2007

ตารางที่ 3.4.2 สภาวะเริ่มต้นของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สภาวะ	อุณหภูมิ	ระยะเวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	94°C	3 นาที	1 รอบ
Denaturation	94°C	30 วินาที	
Annealing	53°C	50 วินาที	35 รอบ
Extension	72°C	60 วินาที	
Final extension	72°C	10 minutes	1 รอบ
Hold	4°C	∞	

ผลการวิจัย (Results)

- สำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืชสมุนไพรหนอนตายหายากเพื่อการศึกษาและการเก็บรักษา รวบรวมตัวอย่างพืชสกุลหนอนตายหายากปลูกลงกระถางเก็บอนุรักษ์ไว้ในโรงเรือน ได้จำนวนทั้งสิ้น 92 ตัวอย่าง จากแหล่งที่มา 11 แห่ง ได้แก่
 - เชื้อพันธุ์ดั้งเดิมที่มีการอนุรักษ์ไว้ในโรงเรือนของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช
 - ตลาดนัดสมุนไพร บริเวณวัดพระศรีรัตนมหาธาตุ (วัดพระพุทธชินราช) จ. พิษณุโลก
 - พื้นที่การเกษตร ต. กุดสิบล้อมใหม่ อ.เขาวง จ.กาฬสินธุ์
 - หาดทุ่งวัวแล่น ต.สะพลี อ.ประทีป จ.ชุมพร
 - พื้นที่สวนยางพารา ต.แหลมสัก อ.อ่าวลึก จ.กระบี่
 - พื้นที่ป่าชุมชน อ.เมืองปาน จ.ลำปาง
 - พื้นที่ใน ต. ท่าเสา อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี
 - พื้นที่ใน ต. หนองทะเล อ.เมืองกระบี่ จ.กระบี่
 - พื้นที่การเกษตร ต.ปากน้ำ อ.บางน้ำจืด จ.ชุมพร
 - พื้นที่ป่าชุมชน อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา
 - ตลาดขายสินค้าและต้นไม้บริเวณ ด้านช่องจอม บ้านด่านพัฒนา ต.ด่าน อ.กาบเชิง จ.สุรินทร์

ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเข็ญนักรวมวิธานซึ่งชำนาญการจำแนกพืชสกุลหนอนตายหายากมาทำการตรวจลักษณะตัวอย่างที่รวบรวมมาได้ สามารถจัดจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์โดยเปรียบเทียบ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจาก Flora of Thailand (2011) และ Pajaree (2008) ได้ 6 ชนิด (species) (ภาพที่ 3.4.1) คือ *Stemona curtisii* Craib., *S. collinsiae* Craib., *S. tuberosa* Lour., *S. rupestris* Inthachub., *S. pierrei* Gagnep. และ *S. phyllantha* Gagnep.



ภาพที่ 3.4.1 พืชสมุนไพรหนอนตายหยากที่รวบรวมปลูกอนุรักษ์ไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช หมายเลข 1-2 = *Stemona curtisii* Hook. f. หมายเลข 3-4 = *Stemona tuberosa* Lour. หมายเลข 5 = *Stemona collinsiae* Craib. หมายเลข 6 = *Stemona rupestris* Inthachub. หมายเลข 7 = *Stemona pierrei* Gagnep. หมายเลข 8 = *Stemona phyllantha* Gagnep.

จัดทำตัวอย่างพรรณไม้เพื่อจัดเก็บเป็นตัวอย่างอ้างอิง ซึ่งมีส่วนประกอบใบ กิ่งก้าน ลำต้น ดอก และผล (ถ้ามี) จัดวางทุกส่วนให้เห็นรายละเอียด กรณีถ้ามีผล หรือดอกร่วงหลุดจากต้น จะใส่ในถุงกระดาษต่างหาก วางอยู่ด้วยกัน พร้อมติดป้ายรหัส และป้ายข้อมูลพรรณไม้ที่จัดเก็บ ลงทะเบียนเป็นพรรณไม้อ้างอิง (Voucher specimen) ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ จำนวน 40 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.4.3, ภาพที่ 3.4.2)

ตารางที่ 3.4.3 รายชื่อ แหล่งที่มา และหมายเลขลงทะเบียนการเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ ของพืชสมุนไพรหนอนตายหยากสกุล *Stemona* ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้

ที่	หมายเลข (Number)	ชื่อวิทยาศาสตร์ (Botanical Name)	แหล่งที่มา	หมายเลขลงทะเบียน เก็บรักษาใน พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ (Bk number)
1	SS1.1	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	อ.เมืองปาน จ. ลำปาง	070617
2	SS2.2	<i>Stemona collinsiae</i> Craib	อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี	070618
3	SS3.1	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. ประทิว จ. ชุมพร	070619
4	SS3.2	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. ประทิว จ. ชุมพร	070620
5	SS3.3	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. ประทิว จ. ชุมพร	070621
6	SS4.1	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. อ่าวลึก จ. กระบี่	070622
7	SS4.2	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. อ่าวลึก จ. กระบี่	070623
8	SS4.4	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. อ่าวลึก จ. กระบี่	070624
9	SS6.1	<i>Stemona collinsiae</i> Craib	อ. เมือง จ. พิชณุโลก	070626
10	SS6.2	<i>Stemona collinsiae</i> Craib	อ. เมือง จ. พิชณุโลก	070627
11	SS6.3	<i>Stemona collinsiae</i> Craib	อ. เมือง จ. พิชณุโลก	070628
12	SS6.5	<i>Stemona collinsiae</i> Craib	อ. เมือง จ. พิชณุโลก	070629
13	SS7.1	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. เมือง จ. กระบี่	070630
14	SS7.2	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. เมือง จ. กระบี่	070631
15	SS7.4	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. เมือง จ. กระบี่	070632
16	SS7.5	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. เมือง จ. กระบี่	070633
17	SS7.6	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. เมือง จ. กระบี่	070634
18	SS7.7	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. เมือง จ. กระบี่	070635
19	SS8.1	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. บางน้ำจืด จ. ชุมพร	070636
20	SS8.4	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. บางน้ำจืด จ. ชุมพร	070637
21	SS10.1	<i>Stemona rupestris</i> Inthachub	อ. เขาวง จ. กาฬสินธุ์	070638
22	SS10.2	<i>Stemona rupestris</i> Inthachub	อ. เขาวง จ. กาฬสินธุ์	070639
23	SS10.3	<i>Stemona rupestris</i> Inthachub	อ. เขาวง จ. กาฬสินธุ์	070640
24	SS10.5	<i>Stemona rupestris</i> Inthachub	อ. เขาวง จ. กาฬสินธุ์	070641
25	SS10.8	<i>Stemona rupestris</i> Inthachub	อ. เขาวง จ. กาฬสินธุ์	070642
26	SS10.15	<i>Stemona rupestris</i> Inthachub	อ. เขาวง จ. กาฬสินธุ์	070643
27	SS0.9	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	พันธุ์ดั้งเดิม	082334
28	SS13.5	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. พังท้าว จ. สตูล	082335
29	SS13.6	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. พังท้าว จ. สตูล	082336
30	SS13.8	<i>Stemona curtisii</i> Hook. f.	อ. พังท้าว จ. สตูล	082337
31	SS14.1	<i>Stemona pierrei</i> Gagnep.	อ. กาบเชิง จ. สุรินทร์	082338

ที่	หมายเลข (Number)	ชื่อวิทยาศาสตร์ (Botanical Name)	แหล่งที่มา	หมายเลขลงทะเบียน เก็บรักษาใน พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ (Bk number)
32	SS14.7	<i>Stemona pierrei</i> Gagnep.	อ. กาบเชิง จ. สุรินทร์	082339
33	SS14.12	<i>Stemona pierrei</i> Gagnep.	อ. กาบเชิง จ. สุรินทร์	082340
34	SS19.1	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	อ.เมืองปาน จ. ลำปาง	082341
35	SS19.4	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	อ. เมืองปาน จ. ลำปาง	082342
36	SS19.5	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	อ. เมืองปาน จ. ลำปาง	082343
37	SS22.1	<i>Stemona phyllantha</i> Gagnep.	อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	082344
38	SS22.2	<i>Stemona phyllantha</i> Gagnep.	อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	082345
39	SS22.3	<i>Stemona phyllantha</i> Gagnep.	อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	082346
40	SS22.5	<i>Stemona phyllantha</i> Gagnep.	อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	082347

หมายเหตุ พันธุ์ดั้งเดิม คือพันธุ์ที่ได้รับการปลูกอนุรักษ์ในโรงเรียนธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สทช. (บางเขน) ตั้งแต่อดีต



ภาพที่ 3.4.2 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งผ่านกระบวนการรักษาสภาพและทำเป็นพรรณไม้อ้างอิง (Voucher specimen) จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ

2. การสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอ และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

(1) การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เลือกตัวอย่างพืชสมุนไพรหนอนตายหายากมาสกัดดีเอ็นเอจำนวน 35 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนหนอนตายหายากทั้ง 6 ชนิด (species) จากแหล่งที่มา 11 แห่ง พบว่า สามารถสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอได้ทั้ง 35 ตัวอย่าง คิดเป็นค่าความสำเร็จในการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของพืชทั้งหมดร้อยละ 100 (ตารางที่ 3.4.4) เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (เทคนิคพีซีอาร์) ใน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS(ไพรเมอร์ ITS5-ITS4), *trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcL* ผลการทดลอง พบว่า มีค่าร้อยละความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์เท่ากับ 71.42, 62.85, 88.57, 62.85 และ 45.71 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.4.4) โดยมีรายละเอียดดังนี้

- ไพรเมอร์ ITS ให้ผลผลิตพีซีอาร์จำนวน 25 ตัวอย่าง แบ่งเป็น multi-band จำนวน 10 ตัวอย่าง และ single-band จำนวน 15 ตัวอย่างโดยมีขนาดดีเอ็นเออยู่ในช่วง 600-800 คู่เบส

- ไพรเมอร์ยีน *trnL-trnF* ให้ผลผลิตพีซีอาร์ จำนวน 22 ตัวอย่าง เป็น double-band ทั้งหมดโดยมีขนาดดีเอ็นเออยู่ในช่วง 900-1200 คู่เบส

- ไพรเมอร์ ยีน *psbA-trnH* ให้ผลผลิตพีซีอาร์ จำนวน 31 ตัวอย่าง ได้ผลเป็น multi-band จำนวน 1 ตัวอย่าง และ single-band จำนวน 30 ตัวอย่างโดยมีขนาดดีเอ็นเออยู่ในช่วง 900-1100 คู่เบส

- ไพรเมอร์ ยีน *matK* ให้ผลผลิตพีซีอาร์ จำนวน 22 ตัวอย่าง ได้ผลเป็น single-band ทั้งหมดโดยมีขนาดดีเอ็นเออยู่ในช่วง 900-1200 คู่เบส

- ไพรเมอร์ ยีน *rbcl* ให้ผลผลิตพีซีอาร์ จำนวน 16 ตัวอย่าง ได้ผลเป็น single-band ทั้งหมด โดยมีขนาดดีเอ็นเออยู่ในช่วง 900-1000 คู่เบส

เลือกนำผลผลิตดีเอ็นเอจากตำแหน่งที่ให้ผลเป็น single-band เกิน 50% ได้แก่ ตำแหน่ง ITS(ไพรเมอร์ ITS5-ITS4), *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcl* นำไปทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (U2Bio (Thailand) Co., Ltd.) พบว่า การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมีค่าความสำเร็จร้อยละ 34.28, 37.14, 62.85 และ 45.71 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.4.4) เมื่อตรวจสอบภาพโครมาโตแกรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตำแหน่ง ITS มีการปนเปื้อนหรือความไม่แน่นอนสูง สังเกตได้จากภาพโครมาโตแกรมที่มีกราฟสูงซ้อนทับกันอยู่หลายตำแหน่ง ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์क्रमมีภาพโครมาโตแกรมที่ชัดเจนไม่มีกราฟสูงซ้อนทับกัน (ภาพที่ 3.4.3) ดังนั้น จึงเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcl* ไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

(2) การเปรียบเทียบวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด

เพื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดของพืชสกุลหนอนตายหยากในตำแหน่งยีน *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcl* โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcl* ที่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแตกต่างด้วยฟังก์ชัน Kimura 2-Parameter model (K2P) distance ด้วยโปรแกรม MEGA7 พบว่า เมื่อคำนวณค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดพืชในสกุลหนอนตายหยากบนตำแหน่งยีนทั้งสามด้วย K2P distance เปรียบเทียบครั้งละ 1 คู่ (ค่า K2P distance มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.00 หมายความว่าลำดับนิวคลีโอไทด์คู่นั้นมีความแตกต่างกัน 100 เปอร์เซ็นต์) จะได้ค่าเฉลี่ย K2P distance ของพืชสกุลหนอนตายหยากในตำแหน่งยีน *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcl* เท่ากับ 0.009, 0.004 และ 0.007 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.4.5, 3.4.6 และ 3.4.7)

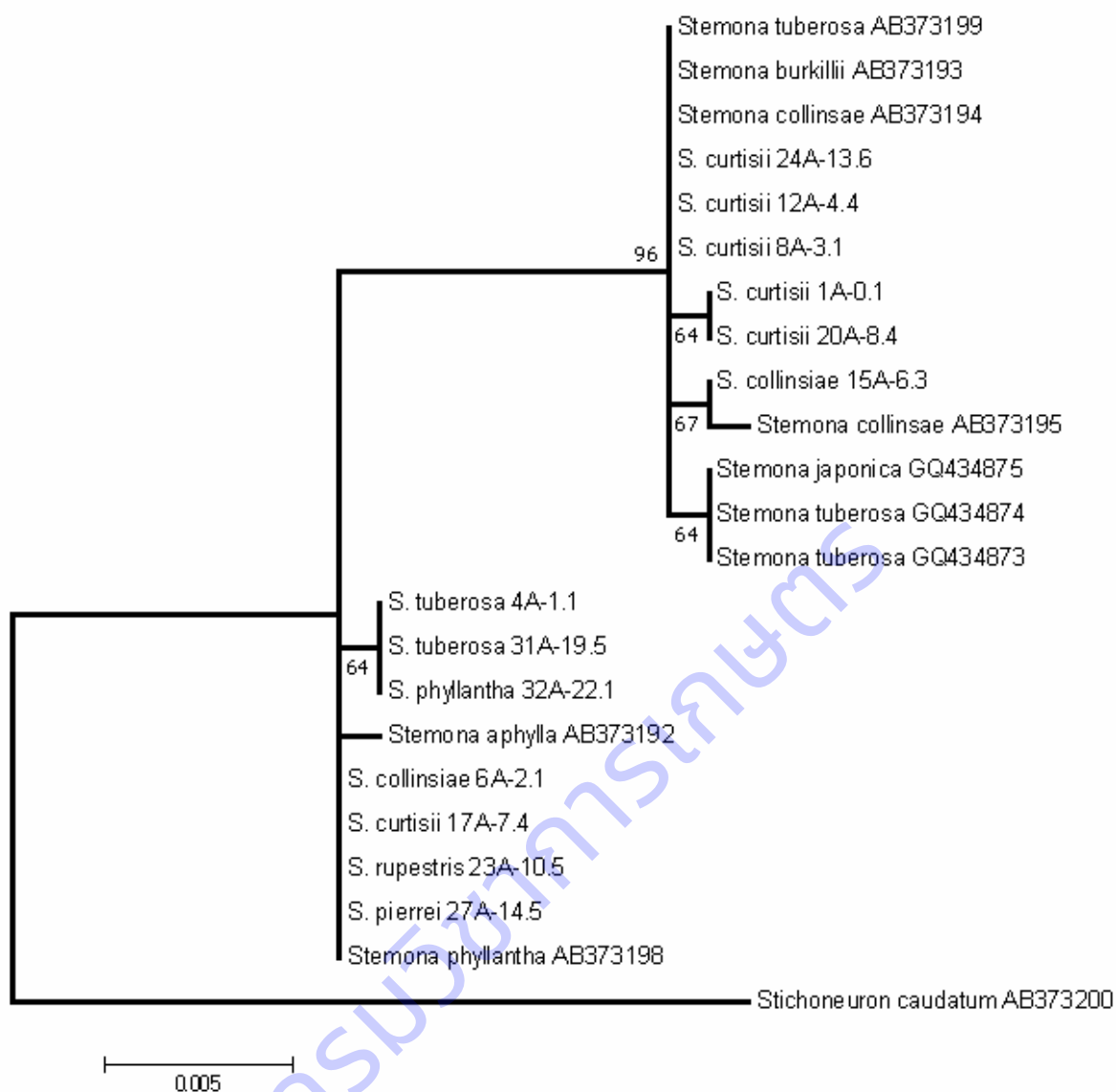
(3) การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้บนตำแหน่งยีน *psbA-trnH* จำนวน 13 ตัวอย่าง, *matK* จำนวน 22 ตัวอย่าง และ *rbcl* จำนวน 16 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมโดยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap test เท่ากับ 1000 รอบ (replicates) พบว่า ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเชิงพันธุกรรมของพืชสกุลหนอนตายหยากที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่งยีน *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcl* แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของพืชสกุลหนอนตายหยากที่ศึกษา มีความสอดคล้องและคล้ายคลึงกันเป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 3.4.4, 3.4.5 และ 3.4.6 ตามลำดับ) โดยผลการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด *psbA-trnH* ไม่สามารถจัดแบ่งกลุ่มของพืชสกุลหนอนตายหยากที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้อย่างชัดเจน แสดงว่าที่ตำแหน่งยีน *psbA-trnH* ของพืชสกุลหนอนตายหยากมีความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง (ภาพที่ 3.4.4) ส่วนดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rbcl* สามารถจัดจำแนก *S. tuberosa* Lour. ได้ด้วย

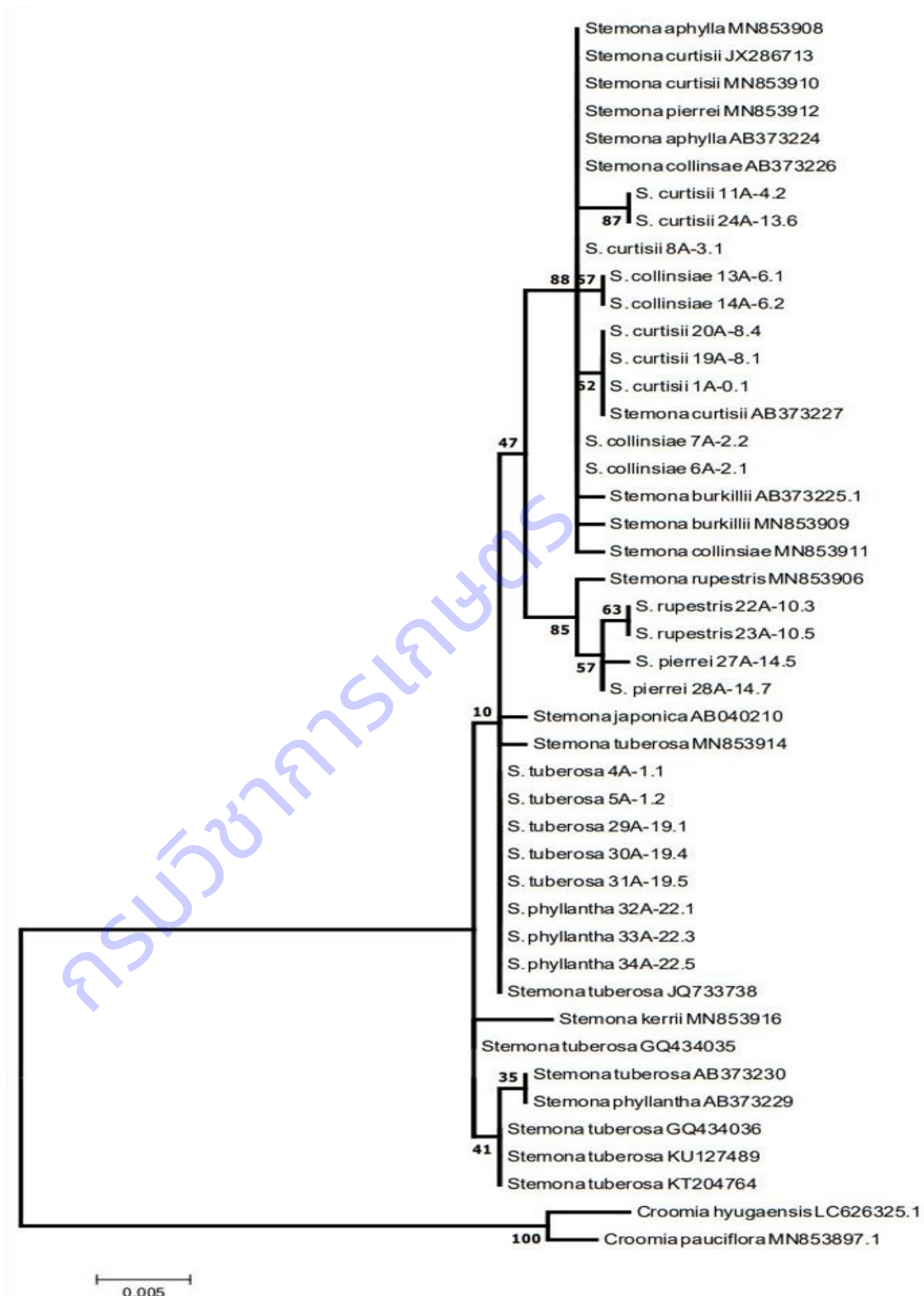
ค่าความเชื่อมั่นในระดับต่ำมาก (<50% BS) และยังแยก *S. phyllantha* Gagnep. ออกเป็นอีกกลุ่มได้ที่ค่าความเชื่อมั่นระดับต่ำเท่ากับ 62% BS (ภาพที่ 3.4.6) และตีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* สามารถจัดจำแนกกลุ่มของ *S. curtisii* Hook. f. ได้ โดยให้ค่าความเชื่อมั่นในระดับต่ำเท่ากับ 62% BS ซึ่งจัดให้ *S. curtisii* Hook. f. ที่ได้จาก อ. อ่าวลึก จ.กระบี่ และ อ.ทุ่งหว้า จ.สตูล อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และที่ค่าความเชื่อมั่นในระดับสูงเท่ากับ 87% BS ได้จัดให้ *S. curtisii* Hook. f. ที่ได้จาก อ.บางน้ำจืด จ.ชุมพร และพันธุ์ดั้งเดิม อยู่ในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้ ยังสามารถจำแนก *S. rupestris* Inthachub กับ *S. pierrei* Gagnep. ได้ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 63% BS และ 57% BS ตามลำดับ (ภาพที่ 3.4.5)



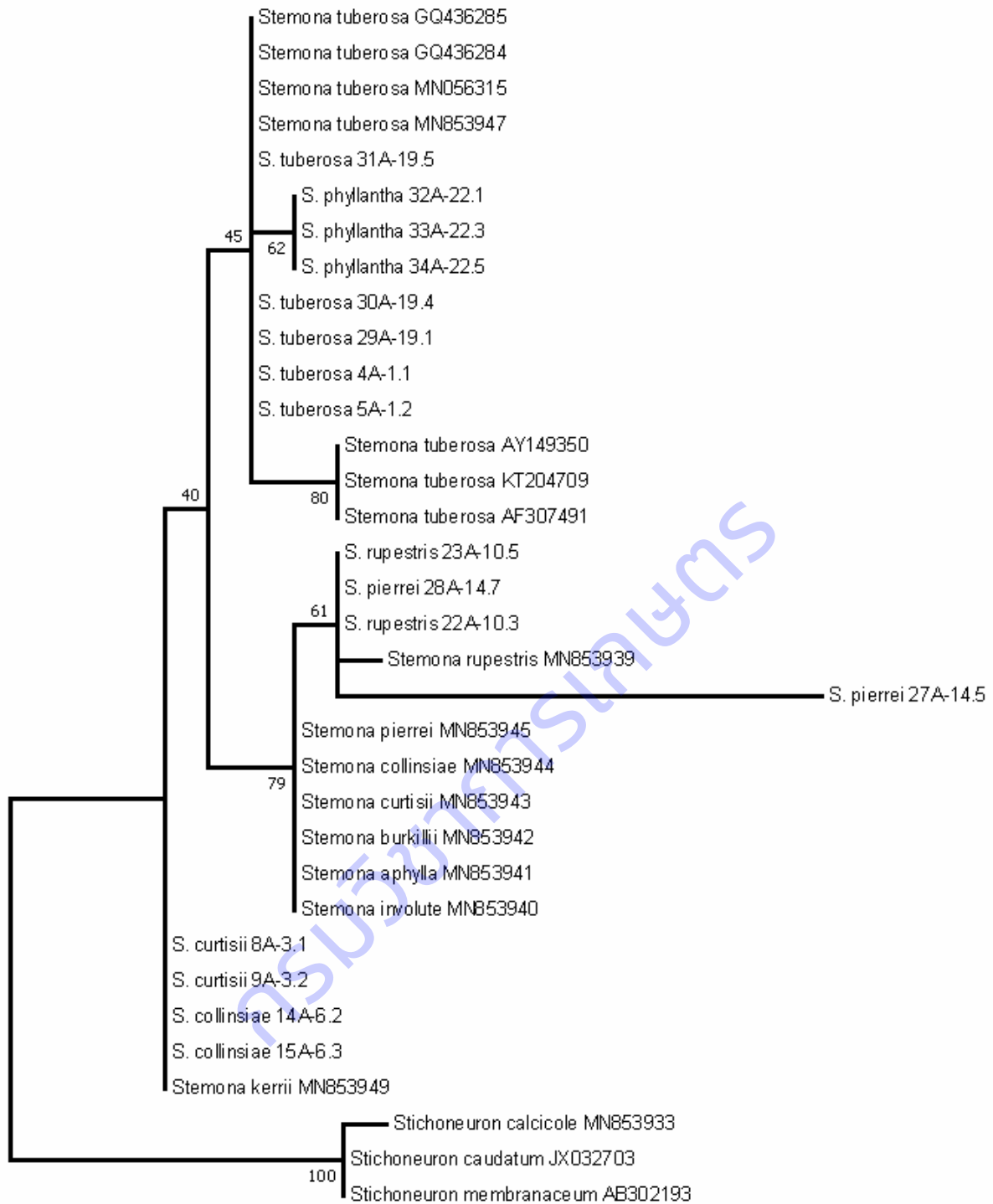
ภาพที่ 3.4.3 ภาพลักษณะโครมาโตแกรม (Chromatogram) ที่นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดทำตีเอ็นเอบาร์โค้ด



ภาพที่ 3.4.4 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก จากยีนบริเวณ *psbA-trnH* วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA7 ด้วยวิธี Maximum Likelihood กำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates



ภาพที่ 3.4.5 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างพืชสมุนไพรหนอนตายหายาก จากยีน *matK* วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA7 ด้วยวิธี Maximum Likelihood กำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates



0.001

ภาพที่ 3.4.6 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก จากยีน *rbcL* วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA7 ด้วยวิธี Maximum Likelihood กำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates

ตารางที่ 3.4.4 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสกุล *Stemona* ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ	ผลการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์					ผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์				
				ITS5	<i>trnL</i>	<i>psbA</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	ITS5	<i>trnL</i>	<i>psbA</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
1	1A-0.1	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	✓✓	✓✓	✓	✓	-	✓	na	✓	✓	-
2	2A-0.9	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	3A-0.10	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	-	-	✓	-	-	-	-	-	-	-
4	4A-1.1	<i>S. tuberosa</i> Lour.	✓	✓✓	✓✓	✓	✓	✓	✓	na	✓	✓	✓
5	5A-1.2	<i>S. tuberosa</i> Lour.	✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	-	na	-	✓	✓
6	6A-2.1	<i>S. collinsiae</i> Craib.	✓	✓✓	✓✓	✓	✓	-	✓	na	✓	✓	-
7	7A-2.2	<i>S. collinsiae</i> Craib.	✓	✓✓✓	✓✓	✓	✓	-	-	na	-	✓	-
8	8A-3.1	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	✓	na	✓	✓	✓
9	9A-3.2	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	-	✓✓	✓	-	✓	-	na	-	-	✓
10	10A-4.1	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	11A-4.2	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	-	-	✓	✓	-	-	-	-	✓	-
12	12A-4.4	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	-	-	✓	-	-	-	-	✓	-	-
13	13A-6.1	<i>S. collinsiae</i> Craib.	✓	-	-	✓	✓	-	-	-	-	✓	-
14	14A-6.2	<i>S. collinsiae</i> Craib.	✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	✓	na	-	✓	✓
15	15A-6.3	<i>S. collinsiae</i> Craib.	✓	✓✓✓	✓✓	✓	-	✓	-	na	✓	-	✓
16	16A-7.1	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	✓	-	✓✓✓	-	-	✓	-	-	-	-
17	17A-7.4	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	✓	-	✓	-	-	-	-	✓	-	-
18	18A-7.5	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	19A-8.1	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	-	-	✓	✓	-	-	-	-	✓	-
20	20A-8.4	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	-
21	21A-10.2	<i>S. rupestris</i> Inthachub.	✓	✓✓✓	✓✓	✓	-	-	-	na	-	-	-
22	22A-10.3	<i>S. rupestris</i> Inthachub.	✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	-	na	-	✓	✓
23	23A-10.5	<i>S. rupestris</i> Inthachub.	✓	✓✓	✓✓	✓	✓	✓	✓	na	✓	✓	✓

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ	ผลการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์					ผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์				
				ITS5	<i>trnL</i>	<i>psbA</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	ITS5	<i>trnL</i>	<i>psbA</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
24	24A-13.6	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	✓	✓✓	✓	✓	-	✓	na	✓	✓	-
25	25A-13.8	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	26A-13.10	<i>S. curtisii</i> Hook. f.	✓	✓	-	✓	-	-	-	-	-	-	-
27	27A-14.5	<i>S. pierrei</i> Gagnep.	✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	✓	na	✓	✓	✓
28	28A-14.7	<i>S. pierrei</i> Gagnep.	✓	✓✓	✓✓	✓	✓	✓	-	na	-	✓	✓
29	29A-19.1	<i>S. tuberosa</i> Lour.	✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	-	na	-	✓	✓
30	30A-19.4	<i>S. tuberosa</i> Lour.	✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	-	na	-	✓	✓
31	31A-19.5	<i>S. tuberosa</i> Lour.	✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	✓	na	✓	✓	✓
32	32A-22.1	<i>S. phyllantha</i> Gagnep.	✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	✓	na	✓	✓	✓
33	33A-22.3	<i>S. phyllantha</i> Gagnep.	✓	-	✓✓	✓	✓	✓	-	na	-	✓	✓
34	34A-22.5	<i>S. phyllantha</i> Gagnep.	✓	✓✓	✓✓	✓	✓	✓	-	na	-	✓	✓
35	35A-22.7	<i>S. phyllantha</i> Gagnep.	✓	✓✓	✓✓	✓	-	-	-	na	-	-	-
ร้อยละความสำเร็จ				71.42	62.85	88.57	62.85	45.71	34.28	-	37.14	62.85	45.71

หมายเหตุ ✓ = single-band ✓✓ = double-band ✓✓✓ = multiple-band na = no data

ตารางที่ 3.4.5 ค่าความแตกต่าง Kimura-2Parameter (K2P) distance ระหว่างชนิดของพืชสกุล *Stemona* ในตำแหน่ง *psbA-trnH*

ลำดับ ที่	ชนิดของพืช (รหัสตัวอย่าง)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>S.curtisii</i> _1A-0.1												
2	<i>S.tuberosa</i> _4A-1.1	0.015											
3	<i>S.collinsiae</i> _6A-2.1	0.016	0.005										
4	<i>S.curtisii</i> _8A-3.1	0.001	0.014	0.015									
5	<i>S.curtisii</i> _12A-4.4	0.001	0.014	0.015	0.000								
6	<i>S.collinsiae</i> _15A-6.3	0.005	0.018	0.013	0.004	0.004							
7	<i>S.curtisii</i> _17A-7.4	0.013	0.002	0.003	0.012	0.012	0.016						
8	<i>S.curtisii</i> _20A-8.4	0.000	0.015	0.016	0.001	0.001	0.005	0.013					
9	<i>S.rupestris</i> _23A-10.5	0.016	0.005	0.000	0.015	0.015	0.013	0.003	0.016				
10	<i>S.curtisii</i> _24A-13.6	0.004	0.017	0.012	0.003	0.003	0.001	0.015	0.004	0.012			
11	<i>S.pierrei</i> _27A-14.5	0.016	0.005	0.000	0.015	0.015	0.013	0.003	0.016	0.000	0.012		
12	<i>S.tuberosa</i> _31A-19.5	0.015	0.000	0.005	0.014	0.014	0.018	0.002	0.015	0.005	0.017	0.005	
13	<i>S.phyllantha</i> _32A-22.1	0.018	0.003	0.002	0.017	0.017	0.015	0.005	0.018	0.002	0.014	0.002	0.003
ค่าเฉลี่ย		0.009											

ตารางที่ 3.4.6 ค่าความแตกต่าง Kimura-2Parameter (K2P) distance ระหว่างชนิดของพืชสกุล *Stemona* ในตำแหน่งยีน *matK*

ลำดับ	ชนิดของพืช (รหัสตัวอย่าง)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	<i>S.curtisii</i> _1A-0.1																					
2	<i>S.tuberosa</i> _4A-1.1	0.005																				
3	<i>S.tuberosa</i> _5A-1.2	0.005	0.000																			
4	<i>S.collinsiae</i> _6A-2.1	0.001	0.003	0.003																		
5	<i>S.collinsiae</i> _7A-2.2	0.001	0.003	0.003	0.000																	
6	<i>S.curtisii</i> _8A-3.1	0.001	0.003	0.003	0.000	0.000																
7	<i>S.curtisii</i> _11A-4.2	0.003	0.006	0.006	0.002	0.002	0.002															
8	<i>S.collinsiae</i> _13A-6.1	0.002	0.005	0.005	0.001	0.001	0.001	0.003														
9	<i>S.collinsiae</i> _14A-6.2	0.002	0.005	0.005	0.001	0.001	0.001	0.003	0.000													
10	<i>S.curtisii</i> _19A-8.1	0.000	0.005	0.005	0.001	0.001	0.001	0.003	0.002	0.002												
11	<i>S.curtisii</i> _20A-8.4	0.000	0.005	0.005	0.001	0.001	0.001	0.003	0.002	0.002	0.000											
12	<i>S.rupestris</i> _22A-10.3	0.008	0.006	0.006	0.007	0.007	0.007	0.009	0.008	0.008	0.008	0.008										
13	<i>S.rupestris</i> _23A-10.5	0.008	0.006	0.006	0.007	0.007	0.007	0.009	0.008	0.008	0.008	0.008	0.000									
14	<i>S.curtisii</i> _24A-13.6	0.003	0.006	0.006	0.002	0.002	0.002	0.000	0.003	0.003	0.003	0.003	0.009	0.009								
15	<i>S.pierrei</i> _27A-14.5	0.008	0.006	0.006	0.007	0.007	0.007	0.009	0.008	0.008	0.008	0.008	0.002	0.002	0.009							
16	<i>S.pierrei</i> _28A-14.7	0.007	0.005	0.005	0.006	0.006	0.006	0.008	0.007	0.007	0.007	0.007	0.001	0.001	0.008	0.001						
17	<i>S.tuberosa</i> _29A-19.1	0.005	0.000	0.000	0.003	0.003	0.003	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005					
18	<i>S.tuberosa</i> _30A-19.4	0.005	0.000	0.000	0.003	0.003	0.003	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.000				
19	<i>S.tuberosa</i> _31A-19.5	0.005	0.000	0.000	0.003	0.003	0.003	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.000	0.000			
20	<i>S.phyllantha</i> _32A-22.1	0.005	0.000	0.000	0.003	0.003	0.003	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.000	0.000	0.000		
21	<i>S.phyllantha</i> _33A-22.3	0.005	0.000	0.000	0.003	0.003	0.003	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	
22	<i>S.phyllantha</i> _34A-22.5	0.005	0.000	0.000	0.003	0.003	0.003	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ค่าเฉลี่ย		0.004																				

ตารางที่ 3.4.7 ค่าความแตกต่าง Kimura-2Parameter (K2P) distance ระหว่างชนิดของพืชสกุล *Stemona* ในตำแหน่งยีน *rbcl*

ลำดับ	ชนิดของพืช (รหัสตัวอย่าง)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	<i>S.tuberosa</i> _4A-1.1															
2	<i>S.tuberosa</i> _5A-1.2	0.000														
3	<i>S.curtisii</i> _8A-3.1	0.002	0.002													
4	<i>S.curtisii</i> _9A-3.2	0.002	0.002	0.000												
5	<i>S.collinsiae</i> _14A-6.2	0.002	0.002	0.000	0.000											
6	<i>S.collinsiae</i> _15A-6.3	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000										
7	<i>S.rupestris</i> _22A-10.3	0.008	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006									
8	<i>S.rupestris</i> _23A-10.5	0.008	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006	0.000								
9	<i>S.pierrei</i> _27A-14.5	0.031	0.031	0.029	0.029	0.029	0.029	0.023	0.023							
10	<i>S.pierrei</i> _28A-14.7	0.008	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006	0.000	0.000	0.023						
11	<i>S.tuberosa</i> _29A-19.1	0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.008	0.008	0.031	0.008					
12	<i>S.tuberosa</i> _30A-19.4	0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.008	0.008	0.031	0.008	0.000				
13	<i>S.tuberosa</i> _31A-19.5	0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.008	0.008	0.031	0.008	0.000	0.000			
14	<i>S.phyllantha</i> _32A-22.1	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.010	0.010	0.033	0.010	0.002	0.002	0.002		
15	<i>S.phyllantha</i> _33A-22.3	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.010	0.010	0.033	0.010	0.002	0.002	0.002	0.000	
16	<i>S.phyllantha</i> _34A-22.5	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.010	0.010	0.033	0.010	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000
ค่าเฉลี่ย		0.007														

อภิปรายผล (Discussion)

จากการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับพืชสกุลหนอนตายหายากในประเทศไทย พบว่า มีรายงานจำนวนชนิด (species) ของพืชสกุลนี้ที่พบในประเทศไทยทั้งหมด จำนวน 11 ชนิด (Flora of Thailand, 2011) ซึ่งในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยสามารถรวบรวมตัวอย่างพืชสมุนไพรหนอนตายหายากหรือพืชสกุลหนอนตายหายากนี้ได้ทั้งหมด 6 ชนิด (species) ซึ่งปลูกอนุรักษ์ไว้ในโรงเรือนของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (บางเขน) กรมวิชาการเกษตร และได้ตรวจสอบความถูกต้องของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชื่อวิทยาศาสตร์จาก Flora of Thailand (2011) และโดยนักอนุกรมวิธาน จึงสามารถจำแนกพืชสกุล *Stemona* บางชนิดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้

การจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับพืชสกุลหนอนตายหายากในครั้งนี้ จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้จากผลผลิตพีซีอาร์ และสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของพืชสกุลหนอนตายหายากในการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* สามารถจำแนกและจัดกลุ่มพืชสกุลหนอนตายหายากได้ 3 ชนิด ได้แก่ *S. curtisii* Hook. f., *S. rupestris* Inthachub และ *S. pierrei* Gagnep. มีค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 87% BS, 62% BS และ 57% BS ตามลำดับ ส่วนดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rbcl* สามารถจำแนกจัดกลุ่ม *S. tuberosa* Lour. และ *S. phyllantha* Gagnep. ได้ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 45% BS และ 62% BS ตามลำดับ และดีเอ็นเอบาร์โค้ด *psbA-trnH* นั้น ไม่สามารถจำแนกหรือจัดกลุ่มพืชสกุลหนอนตายหายากในการทดลองนี้ได้ จากแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม (ภาพที่ 3.4.4, 3.4.5 และ 3.4.6) และความแตกต่าง K2P distance ของพืชสกุลหนอนตายหายากบนตำแหน่งยีน *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcl* ที่ทดลองใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับการวิจัยนี้ มีค่าความแตกต่างน้อยมากเท่ากับ 0.009, 0.004 และ 0.007 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชสกุลหนอนตายหายากมีความใกล้ชิดกันสูงของนิวคลีโอไทด์ในบริเวณตำแหน่งยีน *psbA-trnH* ทำให้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *psbA-trnH* ไม่สามารถทำหน้าที่เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ดีสำหรับพืชสกุลหนอนตายหายากได้ ส่วนดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* และ *rbcl* นั้น ถึงแม้ว่า จะสามารถจัดจำแนกพืชสกุลหนอนตายหายากได้ บางชนิด (species) แต่ค่าความเชื่อมั่นยังอยู่ในระดับต่ำ และความสามารถในการจำแนกพืชสกุลหนอนตายหายากได้เพียงบางชนิด แสดงให้เห็นว่า ไม่ควรใช้เพียงดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพียงยีนใดยีนหนึ่งเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพียงชนิดเดียวได้ มีรายงานวิจัยยืนยันว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกันกับยีน *rbcl* สามารถแยกกล้วยไม้สิ่งโตกลอกตาได้ในระดับสกุล (Siripiyasing *et al.*, 2012)

หลักเกณฑ์การพิจารณายีนที่สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้ต้องมีลักษณะที่สำคัญ 3 ข้อ (CBOL Plant Working Group, 2009) ได้แก่ 1) ความเป็นสากล คือไพรเมอร์ที่ใช้ต้องสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเดียวกันในพืชอื่นได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 2) คุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปตรวจเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลสากล NCBI ต้องมีความเหมือนกัน (กรณีที่ไม่เหมือนกัน อาจเกิดจาก data missing ได้ ดังนั้นต้องมั่นใจในข้อมูล ตรวจสอบให้ชัดเจน มีแหล่งอ้างอิง และมีข้อมูลมากกว่า 1 เพื่อความเชื่อมั่น) และ 3) ประสิทธิภาพในการแยกพืชแต่ละชนิดออกจากกัน จากงานวิจัยนี้ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *psbA-trnH* จึงยังไม่เหมาะสำหรับการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับพืชสกุลหนอนตายหายากได้ ส่วนดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการตรวจสอบพืชสกุลหนอนตายหายาก *S. curtisii* Hook. f., *S. rupestris* Inthachub และ *S. pierrei* Gagnep. ได้ ส่วนดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rbcl* นั้น อาจใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดพืชสกุลหนอนตายหายากชนิด *S. tuberosa* Lour. และ *S. phyllantha* Gagnep. ได้ แต่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อความเชื่อมั่นและแม่นยำในการตรวจสอบระบุชนิดของพืชสกุลหนอนตายหายากได้

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

1. สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างพันธุ์พืชสกุลหนอนตายหายากมาปลูกอนุรักษ์ในโรงเรือนของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ได้จากแหล่งที่มา 11 แห่ง จำนวน 92 ตัวอย่าง และสามารถจำแนกชนิดได้ 6 ชนิด (species) ได้แก่ *Stemona curtisii* Craib., *S. collinsiae* Craib., *S. tuberosa* Lour., *S. rupestris* Inthachub., *S. pierrei* Gagnep. และ *S. phyllantha* Gagnep.
2. สามารถจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุลหนอนตายหายากที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้ จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ Maturase K encoding gene (*matK*) และ RuBisCO large subunit encoding gene (*rbcl*)
3. จากผลการศึกษาควรใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมากกว่าหนึ่งตำแหน่งในการระบุชนิดของพืชสกุลหนอนตายหายากที่พบในประเทศไทย

การทดลอง 3.5

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสะตอ

DNA Barcoding and Genetic Diversity of Sator (*Parkia speciosa* Hassk).

กุหลาบคองทอง ประสานสืบสุข บุญชนะวงศ์ชนะชญาอนุชตรีพันธ์

Kularb Kongthong Prasarn Seubsuk Boonchana Wongchana Chayanuch Tripan

คำสำคัญ : สะตอ, ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

Keyword: Sator (*Parkia speciosa* Hassk), DNA Barcode, DNA

บทคัดย่อ

สะตอ เป็นพืชพื้นเมืองทางภาคใต้ของประเทศไทย เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่นิยมบริโภคทั่วไป นำมาปรุงอาหารได้หลายชนิดมีคุณค่าทางอาหารสูงและมีคุณค่าทางเภสัชวิทยางานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสะตอ ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกต่างๆของภาคใต้มาปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์บาร์โค้ดของพืช ได้แก่ *rbcl*, *matK*, *ITS* และ *TrnH-psbA* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในตัวอย่างสะตอ 2 ชนิดคือ สะตอข้าว และ สะตอดาน ได้ขึ้นส่วนยีนที่เพิ่มปริมาณได้ มีขนาดประมาณ 600 1800 700 และ 450 คู่เบสตามลำดับโดยพบว่ายีนใน *matK* และ *ITS* สามารถนำมาใช้จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจัดจำแนกสะตอได้ จึงได้คัดเลือกชิ้นส่วนของยีน *matK* และ *ITS* มาศึกษาในสะตอข้าวในแปลงคัดเลือกพันธุ์ และสะตอดานเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสะตอ 2 ชนิดจำนวน 16 ต้นพบว่า เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยสร้างแผนผังพันธุกรรมสามารถแบ่งกลุ่มสะตอได้เป็น 4 กลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากบริเวณยีน *matK* และ *ITS* ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ในระดับที่น้อยมาก ซึ่งระดับความแตกต่างนี้ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสะตอข้าวและสะตอดานได้จึงควรนำเทคนิคอื่นๆเช่น เทคนิค GBS มาใช้ในการจัดจำแนกพันธุ์สะตอต่อไป

ABSTRACT

Sator (*Parkia speciosa* Hassk) is a plant native to the south of Thailand. It is an economically important vegetable that is commonly taken consumed, can be used to cook many types of food. It has high nutritional value and pharmacological value. This research aims

toStudy of DNA barcodes and genetic correlations of sator collected from various planting sites in the south to be planted in the breeding plot of the Trang Horticultural Research Center. The results showed that the plant barcode primers, *rbcl matK ITS* and *TmH-psbA* can amplified DNA fragment in the two types of sator samples, sator-khao and sator-dan by PCR technique with the size of about 600, 1800, 700 and 450 base pairs, respectively. The *matK* and *ITS* genes could be used to generate a DNA barcode to classify sators. Therefore, we selected *matK* gene and *ITS* gene to study the genetic correlation of 16 plants, sator-khao in the breeding plot and sator-dan plots. The nucleotide sequence was analyzed, the relationship was created by creating phylogenetic tree with the MEGAx program. The sators was classified into 4 groups. DNA barcode markers from *matK* and *ITS* gene regions provides a very small degree of genetic different, which cannot differentiate between sator-khao and sator-dan. Therefore, other techniques such as GBS techniques should be used in the identification of sator species.

บทนำ

สะตอเป็นไม้ยืนต้นผลัดใบที่มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Parkia speciosa* Hassk. อยู่ในวงศ์ Leguminosae หรือ Fabaceae เป็นพืชพื้นเมืองทางภาคใต้ของประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย (ปารณัฐ, 2541) สำหรับพื้นที่ปลูกสะตอได้ดีในประเทศไทยส่วนใหญ่กระจายอยู่ในภาคใต้สะตอให้ผลผลิตเป็นฝักและเมล็ดสำหรับรับประทานเป็นผักสดและแปรรูปเป็นอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารได้หลายอย่างสะตอเป็นพืชผักชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ที่นิยมบริโภคทั่วไปในประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน สามารถปรุงอาหารได้หลายชนิดมีคุณค่าทางอาหารสูงและยังมีคุณค่าทางเภสัชวิทยา คือ ช่วยลดความดันโลหิต ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ช่วยลดน้ำตาลในเลือด และช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ (สุรีย์และอนันต์, 2540)

คุณค่าทางโภชนาการของสะตอ เมล็ดสะตอ 100 กรัมประกอบด้วย พลังงาน 130.00 กิโลแคลอรี น้ำ 70.70 กรัม คาร์โบไฮเดรต 15.50 กรัม โปรตีน 8.00 กรัม ไขมัน 4.00 กรัม เส้นใย 0.50 กรัม เถ้า 1.30 กรัม แคลเซียม 76.00 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 83.00 มิลลิกรัม เหล็ก 0.70 มิลลิกรัม วิตามินเอ 9.00 I.U. วิตามินบี1 0.10 มิลลิกรัม วิตามินบี2 0.01 มิลลิกรัม วิตามินซี 6.00 มิลลิกรัม Niacin 1.00 mg (กองโภชนาการ กรมอนามัย ,2535) สารสำคัญที่พบในเมล็ดสะตอประกอบด้วย 1) กรดอะมิโน และสารประกอบไกลโคโปรตีน ได้แก่ dichrostachnic acid, djenkolic acid, thiazolidine-4-carboxylic acid, glycine, aspartic acid, isoleucine, serine, methionine, cysteine 2) สารประกอบซัลเฟอร์ ได้แก่ 1-2-4-5-7-8 hexathionane, 1-2-3-5-6 pentathiepane, 1-2-4 tetrathiepane, trithiolane 3) สารประกอบ steroidal ได้แก่ β -sitosterol, stigmasterol เปลือกฝักสะตอพบสารในกลุ่ม steroidal ได้แก่ stigmast-4-en-3-one

ตามตำราไทยใช้เมล็ดขบลงน้ำดื่มในลำไส้ แก้ปัสสาวะปวดขัดหรือกะปริดกะปรอย หรือขุ่นข้น หรือมีเลือดไหลหรือเกี่ยวกับไตพิการ ที่ปัสสาวะมีสีขุ่นข้น เหลืองหรือแดง และมีอาการแน่นท้อง กินอาหารไม่ได้แพทย์แผนโบราณเชื่อว่าสะตอช่วยลดน้ำตาลในเส้นเลือดได้ ผู้ที่กินสะตอเป็นประจำจึงเป็นการป้องกันโรคเบาหวานได้ด้วยสรรพคุณสะตอ และฤทธิ์ทางเภสัชกรรม ได้แก่ 1) ฤทธิ์ต่อการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว สารที่ออกฤทธิ์ คือ สารเลคติน ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกาย 2) ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และแบคทีเรีย สารที่ออกฤทธิ์ ได้แก่ สารในกลุ่ม polysulfides 3) ฤทธิ์กระตุ้นการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (heamagglutination) สารที่ออกฤทธิ์ คือ สารเลคติน 4) ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด โดยเฉพาะสาร β -sitosterol และ stigmasterol ที่ออกฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดได้ดี 5) ฤทธิ์กระตุ้นให้ลำไส้บีบตัวของลำไส้ ช่วยให้อุจจาระอ่อนตัว และช่วยกระตุ้นการขับถ่ายด้วย

คุณประโยชน์อันมากมายทำให้มีผู้สนใจทำงานวิจัยเกี่ยวกับสะตอทั้งในหน่วยงานราชการและมหาวิทยาลัย กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้เล็งเห็นความสำคัญและทำการวิจัยและพัฒนาต่อเนื่องตลอดมา

ด้านการปรับปรุงพันธุ์ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง กรมวิชาการเกษตร ได้ทำวิจัยด้านพันธุ์สะตอ สำหรับส่งเสริมเกษตรกรเป็นการสร้างรายได้จากทรัพยากรพืชพื้นเมือง คัดเลือกสะตอที่ให้ผลผลิตนอกฤดูมีลักษณะเด่นได้ทยอยออกจดทะเบียน เป็นพันธุ์แนะนำของกรมวิชาการเกษตร เช่น สะตอพันธุ์ตรัง 1 สะตอพันธุ์ ตง. 4 เป็นต้นพันธุ์สะตอ แบ่งได้ 3 พันธุ์ คือ 1) สะตอข้าว มีลักษณะเด่น คือ ฝักบิดเป็นเกลียว อาจเป็นฝักสั้นหรือยาว เมล็ดมีกลิ่นไม่ฉุนมาก ให้รสหวานมันหลังจากปลูก 3-5 ปี จึงเริ่มติดฝัก 2) สะตอดาน มีลักษณะเด่น คือ ฝักจะค่อนข้างแบนและตรง ไม่บิดเป็นเกลียวเหมือนสะตอข้าว ฝักยาว เนื้อเมล็ดมีกลิ่นค่อนข้างฉุน และฉุนมากกว่าสะตอข้าว รวมถึงเนื้อเมล็ดมีรสเผ็ด หลังปลูกแล้ว 5-7 ปี จึงเริ่มติดฝัก 3) สะตอเตหรือสะตอป่าเป็นสะตอที่พบได้ในป่าลึก ไม่นิยมปลูก แต่เชื่อว่าเป็นพันธุ์สะตอดั้งเดิมของสะตอข้าว และสะตอดาน ฝักมีลักษณะ เล็ก และสั้น เนื้อให้รสไม่อร่อย

การจำแนกลักษณะประจำพันธุ์ของสะตอที่ได้จากการรวบรวมและจากงานวิจัยนั้น ส่วนใหญ่จัดจำแนกโดยประเมินจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางการเกษตรต่างๆ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของสะตอ และนำมาใช้เป็นข้อมูล ประกอบกันจะเพิ่มความแม่นยำ ในการจัดจำแนกซึ่งดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นวิธีการทางชีวโมเลกุล ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการระบุชนิดหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตภายในเวลาอันรวดเร็ว วิธีการนี้อาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณที่เรียกว่า ดีเอ็นเอมาตรฐาน จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชื่อแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบอาจเป็นบริเวณเดียวหรือ 2-3 บริเวณ แต่ต้องมีความยาวไม่มากและเป็นบริเวณเดียวกับชนิดอื่นๆ ที่ต้องการเปรียบเทียบกัน วิธีการสร้างระบบ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะช่วยระบุชื่อสิ่งมีชีวิตได้จากทุกระยะของการเจริญ รวมถึงสภาพที่เป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กทั้งที่เป็นตัวอย่างสดและตัวอย่างที่ถูกรักษาสภาพไว้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อก่อนุกรมวิธาน และบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความชำนาญทางด้านอนุกรมวิธาน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับศาสตร์สาขาอื่นได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสะตอเพื่อนำมาจัดทำข้อมูล DNA barcode ซึ่งมีประโยชน์ในการจัดจำแนกพันธุ์ เป็นข้อมูลประกอบการรับรองพันธุ์รวมทั้งประโยชน์ด้านการปรับปรุงพันธุ์ การศึกษาความหลากหลายและการอนุรักษ์พันธุกรรมสะตอในประเทศไทยต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

การทำโปรแกรมที่เหมาะสมกับ DNA barcode ของสะตอ และการเก็บตัวอย่างอ้างอิง

ขั้นตอนที่ 1 การเก็บตัวอย่างสะตอและการเก็บตัวอย่างอ้างอิง

เก็บตัวอย่างสำหรับการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยจะเก็บตัวอย่างใบสะตอที่ทำการปลูกรวบรวมพันธุ์สะตอจากแหล่งปลูกต่างๆของภาคใต้ภายในศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จัดทำพรรณไม้แห้ง ส่งเก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ (BK)สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร บันทึกข้อมูลชนิดพืชสถานที่เก็บตัวอย่างและเลขอ้างอิงตัวอย่างพืช (Voucher number)ตามมาตรฐานสากลต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การสกัดดีเอ็นเอของสะตอ

2.1 เก็บตัวอย่างใบอ่อนของสะตอที่ปลูกรวบรวมในแปลงรวบรวมพันธุ์สะตอจากแหล่งปลูกต่างๆของภาคใต้ ภายในศูนย์วิจัยพืชสวนตรังเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

2.2. สกัดดีเอ็นเอจากใบสะตอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับพืช หรือโดยวิธี CTAB ดังนี้เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2% β -mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศา

เซลเซียส นำใบสะตอ 5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแบ่ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAc 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเพื่อใช้สำหรับปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนการทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับ DNA barcode ของสะตอ

ขั้นตอนที่ 3. การทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับ DNA barcode ของสะตอ

3.1 สังเคราะห์ไพรเมอร์จากบริเวณยีนได้แก่ *rbcl*, *matK*, *JTS* และ *TrnH-psbA* ดังตารางแสดงไพรเมอร์ ตารางที่ 3.5.1 ตารางลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *rbcl*, *matK*, *JTS* และ *TrnH-psbA*

	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด (เบส)
1	matK-PsKt1F	ATGGAGGAATTTCAAGTATATTTAGAA	27
2	matK-PsKt1R	CGCTCAAAAAGGACTCCAGA	20
3	matK-PsKt2F	TCTGGAGTCCTTTTTGAGCG	20
4	matK-PsKt2R	CAAACACCAAATCCGACCTC	20
5	matK-PsKt3F	GGAAGAAGATATTTTTTCTTTGATCTT	27
6	matK-PsKt3R	CCAAGCCGTA CTTGCAATTTT	20
7	rbcl-PsKtF	AGCTGGTGTTAAAGATTATAAATTGAC	27
8	rbcl-PsKtR	TATGACGTA AAAATCAAGTCCACCA	24
9	psbA-trnHPsKtF	CTATAAATGGATAAAAATTTTGGTCTTA	27
10	psbA-trnHPsKtR	TCCGCCCTATACTATCTAAAAA	23
11	trnI-trnHPsKt1F	GACTTAATTGGATTGAGCCTTGGT	24
12	trnI-trnHPsKt1R	CGGGCCTTTTGGGGATAG	18
13	trnI-trnHPsKt2F	TTTAGAAATCGTGAGGGTTC AA	22
14	trnI-trnHPsKt2R	TTTCAGTCCTCTGCTCTACCA	21
15	trnQ- pbs16PsKt1F	TATATATCATAATAAAGATTGCCCTTT	27
16	trnQ-	TTCCTTCAATATGAATGCAAATTTCT	26

	pbs16PsKt1R		
17	ITS-P5F	cccttatcaytttagagggaaggag	22
18	ITS-E4R	rgtttcttttcctccgctta	20

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสะดอ โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 18 คู่ ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 4 ไมโครลิตร 10x PCR buffer((NH₄)₂SO₄) 8 ไมโครลิตร 25 mM MgCl₂ 8 ไมโครลิตร 2mM dNTP 8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (10 uM) ตามตารางที่ 2.5.1 อย่างละ 4 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (0.5 unit) 0.5 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 100 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ

3.3 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

ทำการตรวจสอบผล PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

3.4 การทำชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ (PCR purification)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.2 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® PCR Purification Kit ยี่ห้อ Invitrogen ดังนี้ นำพีซีอาร์ 100 ไมโครลิตร มาเติม PureLink® Binding Buffer (B2) จำนวน 1 เท่าคือ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดของเหลวใส่ลงใน PureLink® Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ที่มีส่วนใส ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ที่มีส่วนใส แล้วปั่นคอลัมน์ให้แห้งอีกรอบนาน 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นชะผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสะดอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ

3.6 ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยตาเปล่า โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร

3.7 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ความเหมือนด้วยโปรแกรม Blast ซึ่งอยู่ภายใต้ฐานข้อมูลสากลของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อตรวจสอบความปนเปื้อนของดีเอ็นเอ

3.8 คัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอต้นแบบของสะดอได้ เพื่อนำไพรเมอร์ที่ได้ไปใช้จัดทำ DNA barcode ของกับสะดอพันธุ์อื่น ๆ ต่อไป

การจัดทำ DNA barcode ของสะดอ

1. เก็บตัวอย่างใบอ่อนของสะดอ ที่ปลูกรวบรวมภายในศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จำนวน 16 พันธุ์ (สายต้น) นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับพืช หรือโดยวิธี CTAB ดังนี้ เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2% β-mercaptoethanol ก่อนใช้ป่มที่ 60 องศาเซลเซียส นำใบสะดอ 5 กรัม บดในโกร้งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแห้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction

buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใสในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสในหลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม 3M NaOAc 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เติมน้ำใสที่ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทั้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเพื่อใช้สำหรับปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนการจัดทำ DNA barcode ของสตะอ

2. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ กับดีเอ็นเอของสตะอ โดยใช้ไพรเมอร์ ที่คัดเลือกได้ คัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอต้นแบบของสตะอได้ เพื่อนำไพรเมอร์ที่ได้ไปใช้จัดทำ DNA barcode ของกับสตะอพันธุ์อื่น ๆ จากข้อ 3.8 โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 4 ไมโครลิตร 10x PCR buffer((NH₄)₂SO₄) 8 ไมโครลิตร 25 mM MgCl₂ 8 ไมโครลิตร 2mM dNTP 8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (10 uM) ตามตารางที่ 2.5.1 อย่างละ 4 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ยี่ห้อ (0.5 unit) 0.5 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 100 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ

3. ตรวจสอบผล PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

4. ทำชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ (PCR purification) โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 2 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® PCR Purification Kit ยี่ห้อ Invitrogen ดังนี้ นำพีซีอาร์ 100 ไมโครลิตร มาเติม PureLink® Binding Buffer (B2) จำนวน 1 เท่าคือ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดของเหลวใส่ลงใน PureLink® Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทั้งส่วนใส ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทั้งส่วนใส แล้วปั่นคอลัมน์ให้แห้งอีกรอบนาน 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นชะผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

5. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสตะอไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์หาลำดับเบสอัตโนมัติ

6. ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยตาเปล่า โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอรส์

7. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ความเหมือนด้วยโปรแกรม Blast ซึ่งอยู่ภายใต้ฐานข้อมูลสากลของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อตรวจสอบความปนเปื้อนของดีเอ็นเอ

8. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอโดยวิธีการ Alignment ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ของพันธุ์สะต่อทุกพันธุ์ที่ศึกษา

9. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอที่มีการระบุชื่อที่ถูกต้องแล้วใน NCBI ด้วยโปรแกรม Blast N

10. ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์หาตำแหน่งที่มีความแปรปรวน บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสะต่อแต่ละสายพันธุ์ไว้ในฐานข้อมูล

11. บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบนิวคลีโอไทด์ สรุปผลข้อมูลด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม และนำข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้ไปจัดทำเป็นฐานข้อมูลต่อไป

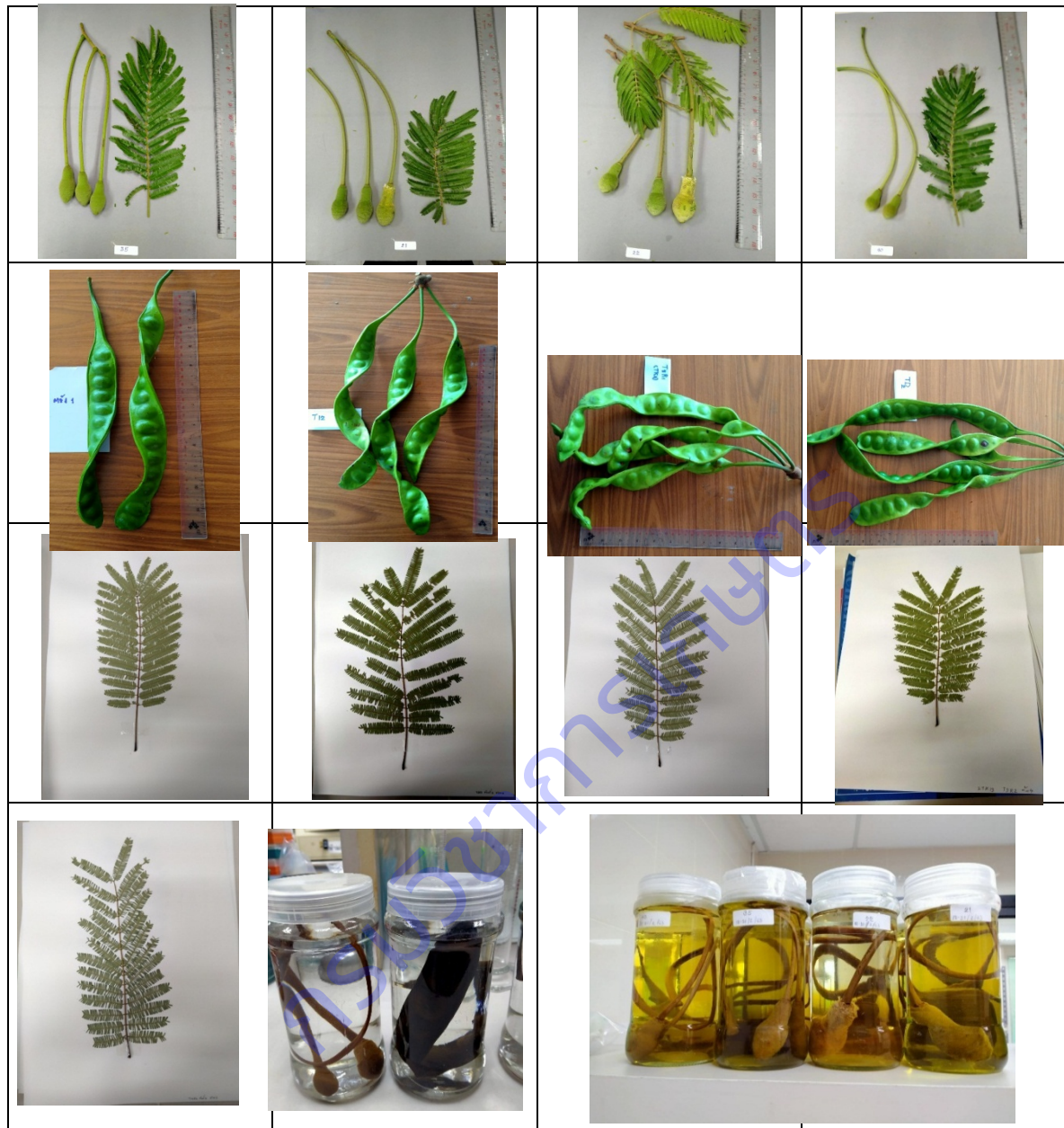
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การเก็บตัวอย่างสะต่อและการเก็บตัวอย่างอ้างอิง

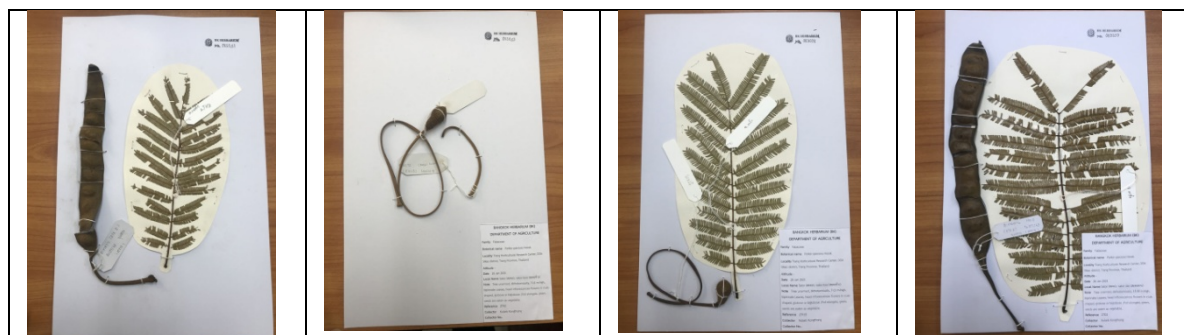
จากการเก็บตัวอย่างสะต่อ ที่ทำการปลูกรวบรวมพันธุ์สะต่อจากแหล่งปลูกต่างๆของภาคใต้ ในแปลงรวบรวมพันธุ์สะต่อ ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ต. ไม้ฝาด อ.สิเกา จ. ตรัง มาจัดทำพรรณไม้แห้ง ส่งเก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK)สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร โดยบันทึกข้อมูลชนิดพืชสถานที่เก็บตัวอย่างและเลขอ้างอิงตัวอย่างพืช (Voucher number)ตามมาตรฐานสากลได้ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของสะต่อ จำนวน 16 ตัวอย่าง ที่ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร (ตารางที่ 3.5.2) ตารางที่ 3.5.2 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของสะต่อ จำนวน 16 ตัวอย่าง ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง (Reference)	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพืช	หมายเลขลงทะเบียน
1	2TD1	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอดาน	083046
2	2TD2	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอดาน	083037
3	2TK1	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083054
4	2TK2	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083043
5	2TK3	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083056
6	2TK4	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083052
7	2TK5	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083048
8	2TK6	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083050
9	2TK7	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083045
10	2TK8	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083053
11	2TK9	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083051
12	2TK10	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083044
13	2TK11	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083047
14	2TK13	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083049
15	2TK14	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083055

16	2TK15	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	สะตอข้าว	083038
----	-------	-------------------------------	----------	--------



ภาพที่ 2.5.1 ตัวอย่างสะตอและการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง



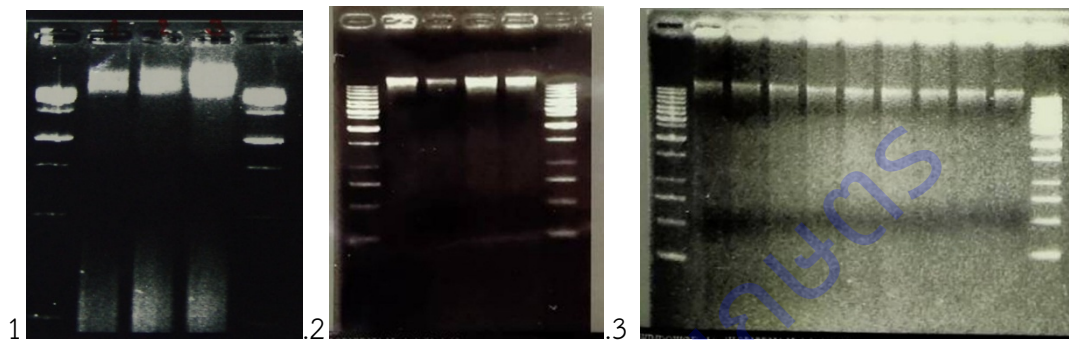


ภาพที่ 2.5.2 ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง สะตอ ที่ทำการปลูกรวบรวมพันธุ์ ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ต. ไม้ฝาด อ.สีกา จ. ตรัง นำมาลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

การหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับ DNA barcode ของสะตอ

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบสะตอข้าวและสะตอดาน โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับพืชนำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง Biodrops ที่ความยาวคลื่น A260/A280 และตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพและความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสามารถนำไปใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (ภาพที่ 3.5.3) เมื่อเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนการทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับ DNA barcode ของสะตอ ทำให้ได้ดีเอ็นเอความเข้มข้นที่เหมาะสม จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เอเสตด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับการจัดทำ DNA barcodeของสะตอสั่งเคราะห์ไพรเมอร์จากบริเวณยีน *rbcl*, *matK*, *ITS* และ *TrnH-psbA*, ดังตารางแสดงไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.5.1) ทำให้ได้ชิ้นส่วนยีน MatK-Pskt1 MatK-Pskt2 MatK-Pskt3 และ *rbcl*-Pskt มีขนาด 800 800 400 และ 600 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 3.5.4, 3.5.5) เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR purification ได้แถบดีเอ็นเอเป้าหมายเพียง 1 แถบ ซึ่งมีความบริสุทธิ์เหมาะสมในการนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 3.5.6) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rbcl* ITS และ MatK ทำให้ได้ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ITS และ MatK ในสะตอ ที่ผ่านการตรวจสอบและคัดเลือก มีขนาดความยาว 584 653 และ 1526 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 3.5.7) จากการทดสอบและคัดเลือกไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในขั้นตอนการจัดทำ DNA barcode ของสะตอคือไพรเมอร์จากบริเวณยีน *matK* และ *ITS* (ตารางที่ 3.5.1)

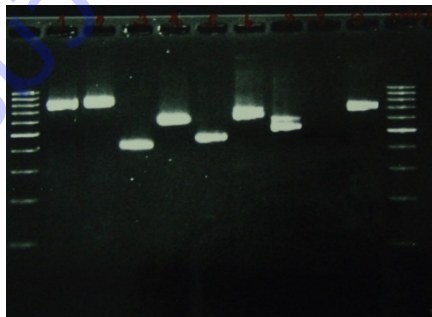


ภาพที่ 3.5.3 แสดงดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบสะตอ

3.5.3.1 ช่อง 2-4 = DNA สะตอช่อง 1,5 = 1 kb , DNA markers

3.5.3.2 ช่อง 2-5 = DNA สะตอช่อง 1,6 = 1 kb , DNA markers

3.5.3.3 ช่อง 2-10 = DNA สะตอช่อง 1,11 = 1 kb , DNA markers

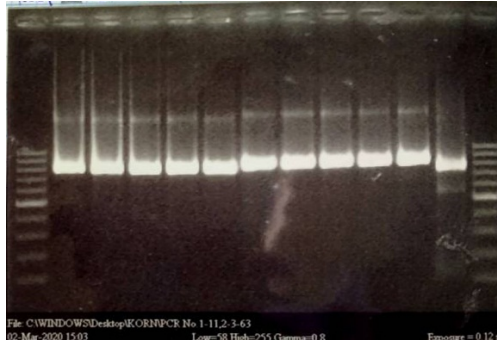


ภาพที่ 3.5.4 แสดงแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน ที่เพิ่มปริมาณได้จากสะตอ

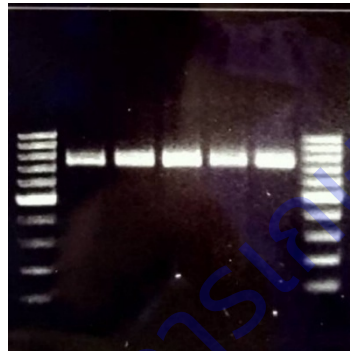
แถบที่ 1,11 = 100 base plus , DNA markers แถบที่ 2-10 = 2 ชิ้นส่วนของยีน MatK-Pskt1 3

MatK-Pskt2 4 MatK-Pskt3 5 *rbcl*-Pskt 6 PSbA-trnHPsKt 7 PSbA-trnHPsKt18 PSbA-trnHPsKt

2 9 trnQ-Pbs 1bPSKt1 และ 10 ชิ้นส่วนของยีน ITS-Ps5-f, ITS-E4 -R ตามลำดับ



ภาพที่ 3.5.5 แสดงแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน ที่เพิ่มปริมาณได้จากสะท้อนพันธุ์ต่างๆ แถบที่ 1,13 = 100 base plus , DNA markers แถบที่ 2-6 = ชิ้นส่วนของยีน MatK-Pskt1 แถบที่ 7-11 MatK-Pskt2 และ แถบที่ 12 = ชิ้นส่วนของยีน ITS-Ps5-f, ITS-E4 -R ตามลำดับ



ภาพที่ 3.5.6 ผลผลิตพีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณยีน ITS ที่ทำให้บริสุทธิ์ แถบที่ 1,7 = 100 base plus , DNA markers แถบที่ 2-6 = ชิ้นส่วนของยีน ITS ในสะท้อนพันธุ์ต่างๆ

ตัวอย่างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL ITS และ MatK ในสะท้อน ที่ผ่านการตรวจสอบและคัดเลือก

> rbcL

```
ACGTTGTAAGCTGGTGTAAAGATTATAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAACTAAAGATG
GTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCAGGAGTTCCGCCTGAAGAAGCGGGTGCCG
CGGTAGCTGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACCGATGGGCTTACCAGTCTTGA
TCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCCGTTCCTGGAGAAGAAAGTCAATTTATTGCTTAT
GTAGCTTATCCCTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTA
ATGTATTTGGGTTCAAGGCCCTGCGCGCTCTACGTCTGGAGGATTTGCGAATCCCTCCTTCTTATTC
TAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCACGGCATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAATACGGCCGT
CCCCTATTGGGATGTAATAAACCAAATTGGGGTTATCCGCTAAGAATTACGGTAGAGCGGTTT
ATGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGATTTTACGTCATACCTGTGTGAAAT
```

> ITS

```
TTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAACTCAGCGGGTAGCCCCGCTGACCTGGGGTCGCTTGCGGG
AGTCGGTGGCTCCGCCTCCGTGGGACGACCCGCGCACGTCCGGTCTCGAGCGCTCGTCGGTCACTC
ATCCACCGTGGATCGTGGCTGTCGTCACGTGCGGGCCGTCTTTTCGGCCGGCCGGGGGCGGGGGCCC
CCGGGAGGCCATCATCCGCCGCGCCCGGGGATCGGGCGGCGGACGTTGCGTGACACCCAGGCA
```

GACGTGCCCTCGGCCAATGGCTTCGGGCGCAACTTTCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATT
CTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTT
GCCGAGAGTCGTTTTGGATGCCGATGGCATTAGGCGCGGCGCTGGGTCGTGCGCGCCGTGACCGGG
CCGCCAGCGCCGTGCTTGCTTTGTTGCGCTTCCTTGGCGCCTGCGGCGCCGGGATTTGGTTCGTTT
GGGCGGGGGGGCGGC
TCCGCGCCCTCATATCCCCCCCACGCCCGGGCCTGTGCCAACCGGTTTCGCGGGTCGCTCTTTTCGG
TGGGTCATCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTTACCTACGGAAAC

>MatK

AAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAATCATTTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAAGAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGGCTTGCCGTCAAGTGT
GGAAATTCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCTTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATT
TACGATCAATTCACTCAATATTTCTTTTTTTGAGGAAAAATTTCCATATTTAAATTATGTGTGAGAT
GTACAAATACCCTACCCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATG
CCTCCTCCTTTCATTTATTAAGGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCA
AAAAAAGGATTTCTACTTTTTCAAAAAGTAATCCAAGATTTTCTGTTCTATATAATTTTTATGT
ATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCCGTAACAAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTG
GAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAATAGAACATTTTGTAGAAGTCTTTGATAAGGA
TTTTCCGTCCACCCTATGGTCTTCAAGGACCCTTTCAATCATTATGTTAGATATCAAGGAAAATCC
ATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAATACTATCTTATCCATTTATGGC
AATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATCCGAGCATTCAATTT
TACTTTTTGGGCTATTTTTCAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATGTTGGAAA
AGTCATTTATAATGGAAAATATTATGAAAAGCTTGATACAATAATTCCAATTATTCCTCTAATTAGA
TCATTGGCTAAAGCAAAATTTGTAATGTATTAGGACATCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATT
CATCCGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTGCAGATATGCAGAGATCTTTCTCATTATTACAACGGA
TCCTCAAAAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGTATTAACCTTTGGC
GCGTAAACACAAAAGTACTGTACGGGTTTTTTTTGAAAAGATTAGGTTCTGAATTATTGGAAGAATTC
TTTACAGAGGAAGAAGATATTTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTCTACTTTGCAGAAGTTATA
TAGAGGTCGGATTTGGTGTGGATATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACA
GGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCCTTAAATGAGGAAAAAAAAAAGAATTCATTTCGTTTC
TATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATGTAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTA
CTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAACTGAGG

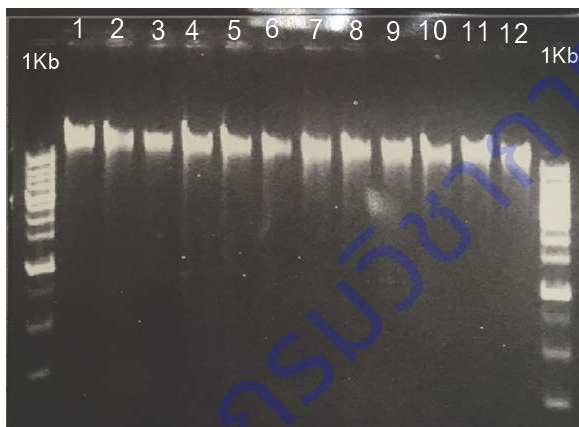
ภาพที่ 3.5.7 แสดงตัวอย่างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcl ITS และ MatK ในสะดอ ที่ผ่านการตรวจสอบ และคัดเลือก มีขนาดความยาว 584 653 และ1526 คู่เบส ตามลำดับ

การจัดทำ DNA barcode ของสะดอ

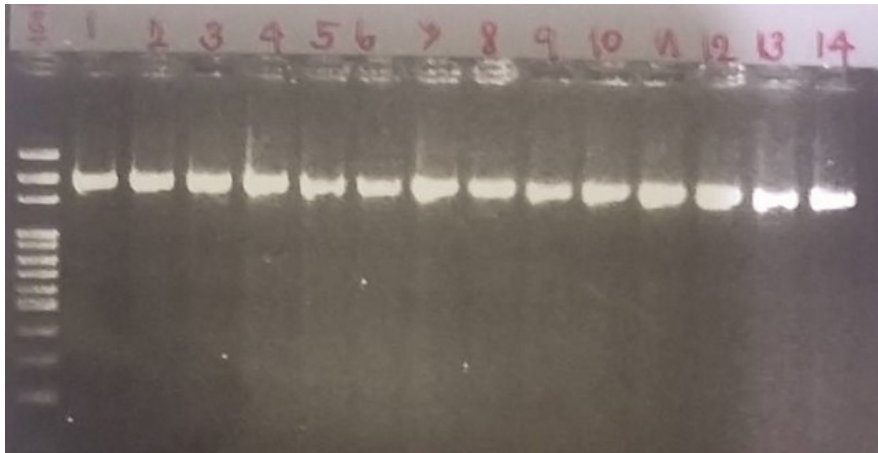
การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสะดอ จำนวน 16 ตัวอย่างโดย ได้คัดเลือกชิ้นส่วนยีนที่ศึกษาไว้ในขั้นตอน การทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์บาร์โค้ดสากลของพีชกับตัวอย่างสะดอ ได้แก่ ITS และ matK นำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสะดอ (ภาพที่ 3.5.8,3.5.9) พบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ MatKและ

ITS ของสะตอ พันธุ์ต่างๆ จำนวน 32 ตัวอย่างมาจัดเรียงเปรียบเทียบ พบว่า MatK ของสะตอทั้ง 16 พันธุ์ มีความยาว 1526 bp. (ภาพที่ 3.5.10) พบมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ G/C ของตัวอย่างบริเวณตำแหน่งที่ 64 A/G ของตัวอย่างบริเวณตำแหน่งที่ 192 และ 243 T/C บริเวณตำแหน่งที่ 587 และ A/C บริเวณตำแหน่งที่ 899 (ตารางที่ 3.5.4) ส่วน ITS ของสะตอทั้ง 16 พันธุ์ มีความยาว 714bp. (ภาพที่ 3.5.12) พบมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ C/Y ของตัวอย่างบริเวณตำแหน่งที่ 36 98 105 110 124 291 และ 374 G/R ของตัวอย่างบริเวณตำแหน่งที่ 6583 91 97 104 121 127 และ 348A/M บริเวณตำแหน่งที่ 84 93 และ 288 C/M บริเวณตำแหน่งที่ 89 103 และ 373 A/R บริเวณตำแหน่งที่ 92 และ 449 T/K บริเวณตำแหน่งที่ 132 A/G บริเวณตำแหน่งที่ 214 T/Y บริเวณตำแหน่งที่ 417 443 และ 636 (ตารางที่ 3.5.5)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ MatK และ ITS ของสะตอทั้ง 16 พันธุ์ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยสร้างแผนผังพันธุกรรม (phylogenetic tree) สามารถแบ่งกลุ่มสะตอได้เป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 2TD1 2TD2 2TK3 2TK14 2TK10 และ 2TK11 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 2TK7 2TK1 2TK13 2TK15 2TK2 และ 2TK4 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 2TK9 กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 2TK5 2TK6 และ 2TK8 (ภาพที่ 3.5.11 และ 3.5.13) ซึ่งในทั้ง MatK และ ITS สามารถจัดแบ่งกลุ่มได้สะตอ ได้เหมือนกัน อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากบริเวณยีน *matK* และ *ITS* ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ในระดับที่น้อยมาก อย่างไรก็ตามระดับความแตกต่างนี้ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสะตอข้าวและสะตอดานได้ จึงควรนำเทคนิคอื่นๆ เช่น เทคนิค GBS มาใช้ในการจัดจำแนกพันธุ์สะตอ ต่อไป



ภาพที่ 3.5.8 แสดงดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบสะตอ
หมายเลข 1-12 = DNA สะตอ



ภาพที่ 3.5.9 แสดงแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน MatK ขนาดประมาณ 1780 คู่เบส ที่เพิ่มปริมาณได้จากสะท้อน แถบที่ 1 = 100 base plus , DNA markers หมายเลข 1-14 = ชิ้นส่วนของยีน MatK-

ตัวอย่างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MatK ในสะท้อน 16 พันธุ์

>2TD1_MatK

```

AAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAATCATTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAACAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTTAGAGAAGGCAGAAATCATAAGATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCCTTTTTTTTGAGGAAAGATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCCTTTTCATTTATTAA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAAAGGATTTCTACTTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAT
AGAACATTTTGTAGAAGTCTTTGATAAGGATTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATTCAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAATACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCATTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGGAAAATCTTATGAAAAAGCTTGATACAATAATTCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAAATTTTGAATGTATTAGGACATCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTGCAGATATGCAGAGATCTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGATTTAAACTTTGGCGCGTAAACACAAAA
GTACTGTACGGTTTTTTTTGAAAAGATTAGTTCTGAATTATTGGAAGAATCTTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTCTACTTTGCAGAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTTTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAGAAATTCATTCGTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAACTGAGG

```

>2TD2_MatK

AAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAATCATTTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAACAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAGATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCCCTTTTTTTGAGGAAAAGATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCCTTTTCATTTATTAA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAAAGGATTTCTACTTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAAT
AGAACATTTTGTAGAAGTCTTTGATAAGGATTTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATTCAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAATACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCATTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGGAAAATCTTATGAAAAAGCTTGATAACAATAATCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAATTTTGAATGTATTAGGACATCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTGCAGATATGCAGAGATCTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGATTTAAACTTTGGCGCGTAAACACAAAA
GTACTGTACGGGTTTTTTTTGAAAAGATTAGTTCTGAATTATTGGAAGAATCTTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTACTTTGCAGAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTTTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAAAAAAAAGAATTCATTCGTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAAGTGAAG
>2TK1_MatK

AAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAATCATTTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAAGAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCCCTTTTTTTGAGGAAAAATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCCTTTTCATTTATTAA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAAAGGATTTCTACTTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAAT
AGAACATTTTGTAGAAGTCTTTGATAAGGATTTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATTCAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAATACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCATTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGGAAAATATTATGAAAAAGCTTGATAACAATAATCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAATTTTGAATGTATTAGGACATCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTGCAGATATGCAGAGATCTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGATTTAAACTTTGGCGCGTAAACACAAAA

GTACTGTACGGGTTTTTTTTGAAAAGATTAGGTTCTGAATTATTGGAAGAATTCTTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTCTACTTTGCAGAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTTTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAAAAAAAAGAATTCATTCGTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAACTGAGG
>2TK10_MatK

AAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAATCATTTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAACAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCTTTTTTTGAGGAAAGATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCTTTCATTTATTAA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAAAAGGATTTCTACTTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTATTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAT
AGAACATCTGTAGAAGCTTTGATAAGGATTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATTCAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAATACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCATTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGAAAAATATTATGAAAAGCTTGATAACAATAATCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAAATTTGTAATGTATTAGGACATCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTGCAGATATGCAGAGATCTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGATTA AAAACTTTGGCGCGTAAACACAAAA
GTACTGTACGGGTTTTTTTTGAAAAGATTAGGTTCTGAATTATTGGAAGAATTCTTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTCTACTTTGCAGAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTTTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAAAAAAAAGAATTCATTCGTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAACTGAGG
>2TK11_MatK

AAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAATCATTTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAACAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCTTTTTTTGAGGAAAGATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCTTTCATTTATTAA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAAAAGGATTTCTACTTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTATTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAT
AGAACATCTGTAGAAGCTTTGATAAGGATTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATTCAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAATACT

ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCATTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGGAAAATATTATGAAAAAGCTTGATACAATAATTCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAATTTTTGTAATGTATTAGGACATCCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTTGAGATATGCAGAGATCTTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGATTAAAACCTTTGGCGCGTAAACACAAAA
GTACTGTACGGGTTTTTTTTGAAAAGATTAGGTTCTGAATTATTGGAAGAATTCTTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTCTACTTTGCAGAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTTTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAAAAAAAAGAATTCATTCGTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAAGTACTGAGG
>2TK13_MatK

AAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAATCATTTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAACAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTTCTTCTTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCTTTTTTTGAGGAAAGATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCTTTCATTTATTAA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAAAAGGATTTCTACTTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTTATTACGATTAACATCTTCTGGAGTCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAAT
AGAACATCTTGAGAAGTCTTTGATAAGGATTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATTCAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAATACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCATTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGGAAAATATTATGAAAAAGCTTGATACAATAATTCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAATTTTTGTAATGTATTAGGACATCCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTTGAGATATGCAGAGATCTTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGATTAAAACCTTTGGCGCGTAAACACAAAA
GTACTGTACGGGTTTTTTTTGAAAAGATTAGGTTCTGAATTATTGGAAGAATTCTTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTCTACTTTGCAGAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTTTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAAAAAAAAGAATTCATTCGTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAAGTACTGAGG
>2TK14_MatK

CCTCAGTTCCTTCCCTAGAACAGGACTCTAAAAAGTTAAGTACTTAGTTTATCAATTCCTACTCTTA
CTACATGAGCATTTCATAATCCATTTTCATATTTTCATAATAGAAACGAATGAATTCTTTTTTTTTTTCTCATT
AAGGATAGTTTCCATTATCAAAGTATGATAACCTGTTATTCATGATTGACCAGATCATTGATGAAAATCAAAA
ATATCCAAACACCAAATCCGACCTCTATATAACTTCTGCAAAGTAGAAGAAGCTCTTGAGAAGATCAAAGAAA

AAATATCTTCTCCTCTGTAAAGAATTCTTCCAATAATTCAGAACCTAATCTTTTTCAAAAAAACCCGTACAGT
ACTTTTTGTGTTTACGCGCCAAAGTTTTAATACAAGAAAGCCGAAGTATATATTTGATTTCGATACAAACTCTTT
TTTTTTGAGGATCCGTTGTAATAATGAGAAAGATCTCTGCATATCTGCAAAAATCGGTCAATAATATCAAAT
CGGATGAATCGGCCAGACCGATTTACTAATGGGATGTCCTAATACATTACAAAATTTTGCTTTAGCCAATGA
TCTAATTAGAGGAATAATTGGAATTATTGTATCAAGCTTTTTTCATAATATTTTCCATTATAAATGACTTTTCCA
ACATTTGACTCCGTACCACTGAAGGATTTAGCCGCACATTTGAAAAATAGCCCAAAAAGTAAAATGAATGCT
CGGATAATTGGTTTATATGGATCTTTCCTGGTTGAGACCAAACAAAAAATGACATTGCCATAAATGGATAAG
ATAGTATTGCCATTTTTTTCATCAAAAAGGGCGTATTCTTTGAAGCCAGAATGGATTTTCCTTGATATCTAACA
TAATGAATGAAAGGGTCCTTGAAGAACCATAGGGTGGACGGAAAATCCTTATCAAAGACTTCTACAAGATGT
TCTATTTTTGCATAGAAATAGATTTCGCTCAAAAAGGACTCCAGAAGATGTTAATCGTAAATAAGAAGATTTGT
TACGGAGAAAAAGAAAGATGGATTCGTATTCACATACATAAAAAATTATATAGGAACAGGAAAAATCTTGGATT
ACTTTTTGAAAAAGTAGAAATCCTTTTTTTTTGGAGTAATAAGACTATTCCAATTACAATACTCATAAAGAAAG
AGCCTTAATAAATGAAAGGAGGAGGCATCTTTCACCCAGTATCGAAGGGTTTGAATCAAGATTTCCAGATGG
ATAGGGTAGGGTATTTGTACATCTGACACATAATTTAAATATGGAAATCTTTCCTCAAAAAAAGGAAATATTG
AGTGAATTGATCGTAAATTATAGGATTTTATGATTTCTGCCTTCTCTAAGGAAGAGATTAATTGTAGGGAAAA
TGGAAATTTCCCACTGACGGCAAGCCCTCTGATATTATTTGAGAATACAAATCTTGTGTACCCCAAAAT
GGATTTTTGTAGAAATTATTAGCAGAAATAATCAAATGATTCTGTTGATACATTGAGTAATTAACGTTTT
>2TK15_MatK

CCTCAGTTCCTTCCCTAGAACAGGACTCTAAAAAGTTAAGTACTTAGTTTATCAATTCCTACTCTTA
CTACATGAGCATTTTCATAATCCATTTTCATATTTTCATAATAGAAACGAATGAATTCTTTTTTTTTTCCTCATT
AAGGATAGTTTCCATTATCAAAGTATGATAACCTGTTATTCATGATTGACCAGATCATTGATGAAAATCAAAA
ATATCCAAACACCAAATCCGACCTCTATATAACTTCTGCAAAGTAGAAGAAGCTCTTGAGAAGATCAAAGAAA
AAATATCTTCTCCTCTGTAAAGAATTCTTCCAATAATTCAGAACCTAATCTTTTTCAAAAAAACCCGTACAGT
ACTTTTTGTGTTTACGCGCCAAAGTTTTAATACAAGAAAGCCGAAGTATATATTTGATTTCGATACAAACTCTTT
TTTTTTGAGGATCCGTTGTAATAATGAGAAAGATCTCTGCATATCTGCAAAAATCGGTCAATAATATCAAAT
CGGATGAATCGGCCAGACCGATTTACTAATGGGATGTCCTAATACATTACAAAATTTTGCTTTAGCCAATGA
TCTAATTAGAGGAATAATTGGAATTATTGTATCAAGCTTTTTTCATAATATTTTCCATTATAAATGACTTTTCCA
ACATTTGACTCCGTACCACTGAAGGATTTAGCCGCACATTTGAAAAATAGCCCAAAAAGTAAAATGAATGCT
CGGATAATTGGTTTATATGGATCTTTCCTGGTTGAGACCAAACAAAAAATGACATTGCCATAAATGGATAAG
ATAGTATTGCCATTTTTTTCATCAAAAAGGGCGTATTCTTTGAAGCCAGAATGGATTTTCCTTGATATCTAACA
TAATGAATGAAAGGGTCCTTGAAGAACCATAGGGTGGACGGAAAATCCTTATCAAAGACTTCTACAAAATGT
TCTATTTTTGCATAGAAATAGATTTCGCTCAAAAAGGACTCCAGAAGATGTTAATCGTAAATAAGAAGATTTGT
TACGGAGAAAAAGAAAGATGGATTCGTATTCACATACATAAAAAATTATATAGGAACAGGAAAAATCTTGGATT
ACTTTTTGAAAAAGTAGAAATCCTTTTTTTTTGGAGTAATAAGACTATTCCAATTACAATACTCATAAAGAAAG
AGCCTTAATAAATGAAAGGAGGAGGCATCTTTCACCCAGTATCGAAGGGTTTGAATCAAGATTTCCAGATGG
ATAGGGTAGGGTATTTGTACATCTGACACATAATTTAAATATGGAAATTTTTCTCAAAAAAAGGAAATATTG
AGTGAATTGATCGTAAATTATAGGATTTTATGATTTCTGCCTTCTCTAAGGAAGAGATTAATTGTAGGGAAAA

TGGAATTTCCCACTGACGGCAAGCCCCCTGATATTATTTGAGAATACAAATCTTGTTGTACCCCCAAAAT
GGATTTTTCTTAGAATTATTAGCAGAAATAATCAAATGATTCTGTTGATACATTTCGAGTAATTAACGTTTT
>2TK2_MatK

AAAACGTTTAATTAATCTCGAATGTATCAACAGAATCATTTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAAGAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCTTTTTTTGAGGAAAAATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCCTTTTCATTTATTA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAGGATTTCTACTTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAT
AGAACATTTTGTAGAAGTCTTTGATAAGGATTTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATTCAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCATTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGAAAAATATTATGAAAAAGCTTGATAACAATAATCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAAATTTGTAATGTATTAGGACATCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTGACAGATATGCAGAGATCTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGTATTAAACTTTGGCGCGTAAACACAAAA
GTACTGTACGGTTTTTTTTGAAAAGATTAGTTCTGAATTATTGGAAGAATCTTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTCTACTTTCAGAAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAAAAAGAATTCATTCGTTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAAGTGGG
>2TK3_MatK

AAAACGTTTAATTAATCTCGAATGTATCAACAGAATCATTTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAAGAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCTTTTTTTGAGGAAAAATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCCTTTTCATTTATTA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAGGATTTCTACTTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAT
AGAACATTTTGTAGAAGTCTTTGATAAGGATTTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATTCAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCATTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGAAAAATATTATGAAAAAGCTTGATAACAATAATCCAATTATTCCTCTAATTA

GATCATTGGCTAAAGCAAAATTTTGTAAATGTATTAGGACATCCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTGCAGATATGCAGAGATCTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGTATTAACCTTTGGCGCGTAAACACAAAA
GTAAGTACGGGTTTTTTGAAAAGATTAGGTTCTGAATTATTGGAAGAATTCTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTCTACTTTGCAGAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAAAAAGAATTCATTCGTTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAAGTGGG
>2TK4_MatK

AAAACGTTTAATTAATTAATCGAATGTATCAACAGAATCATTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAACAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCTTTTTTTGAGGAAAAGATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCCTTTTCATTTATTA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAGGATTTCTACTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGTCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAT
AGAACATCTGTAGAAGTCTTTGATAAGGATTTTCCGTCCACCCTATGGTTCTCAAGGACCCTTTCATTCAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAATGGCAACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTGGTCTCAACCAGGAAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCAATTTACTTTTTGGGCTATTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCAATTTATAATGAAAAATATTATGAAAAAGCTTGATAACAATAATCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAATTTTGTAAATGTATTAGGACATCCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTGCAGATATGCAGAGATCTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGTATTAACCTTTGGCGCGTAAACACAAAA
GTAAGTACGGGTTTTTTGAAAAGATTAGGTTCTGAATTATTGGAAGAATTCTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTCTACTTTGCAGAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAAAAAGAATTCATTCGTTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAAGTGGG
>2TK5_MatK

AAAACGTTTAATTAATTAATCGAATGTATCAACAGAATCATTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAAGAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCTTTTTTTGAGGAAAAATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCCTTTTCATTTATTA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAGGATTTCTACTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC

GTAACAAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAT
AGAACATTTTTGTAGAAGTCTTTGATAAGGATTTTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATT
TATGTTAGATATCAAGGAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCATTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGAAAAATATTATGAAAAAGCTTGATACAATAATCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAAATTTTGAATGTATTAGGACATCCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTGCAGATATGCAGAGATCTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGTATTA AAACTTTGGCGCGTAAACACAAAA
GTACTGTACGGTTTTTTTTGAAAAGATTAGTTCTGAATTATTGGAAGAATCCTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTCTACTTTGCAGAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAAAAAGAATTCATTCGTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAAGTGGG
>2TK6_MatK

AAAACGTTTAATTAATTAATCGAATGTATCAACAGAATCATTTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAACAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCTTTTTTTGAGGAAAGATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCCTTTCATTTATTA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAGGATTTCTACTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAT
AGAACATCTTGTAGAAGTCTTTGATAAGGATTTTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATT
TATGTTAGATATCAAGGAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCATTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGAAAAATATTATGAAAAAGCTTGATACAATAATCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAAATTTTGAATGTATTAGGACATCCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTGCAGATATGCAGAGATCTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGTATTA AAACTTTGGCGCGTAAACACAAAA
GTACTGTACGGTTTTTTTTGAAAAGATTAGTTCTGAATTATTGGAAGAATCCTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTCTACTTTGCAGAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAAAAAGAATTCATTCGTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAAGTGGG
>2TK7_MatK

AAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAATCATTTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAAGAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCCCTTTTTTTGAGGAAAAATTTCCATATTTAAATTTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCCTTTTCATTTATTAA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAAAGGATTTCTACTTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAT
AGAACATTTTGTAGAAGTCTTTGATAAGGATTTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATTCAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAATACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCATTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGGAAAATATTATGAAAAAGCTTGATAACAATAATCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAATTTTGAATGTATTAGGACATCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTGCAGATATGCAGAGATCTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGATTTAAACTTTGGCGCGTAAACACAAAA
GTACTGTACGGTTTTTTTTGAAAAGATTAGTTCTGAATTATTGGAAGAATCTTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTACTTTGCAGAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTTTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGTTATCATACTTTGATAATGGAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAAAAAAAAGAATTCATTCGTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAAGTGGG
>2TK8_MatK

AAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAATCATTTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAACA AAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCCCTTTTTTTGAGGAAAGATTTCCATATTTAAATTTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCCTTTTCATTTATTAA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAAAGGATTTCTACTTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAT
AGAACATCTTGTAGAAGTCTTTGATAAGGATTTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATTCAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAATACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCATTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGGAAAATATTATGAAAAAGCTTGATAACAATAATCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAATTTTGAATGTATTAGGACATCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTTCATC
CGATTTTGATATTATTGACCGATTTTTGCAGATATGCAGAGATCTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGATTTAAACTTTGGCGCGTAAACACAAAA

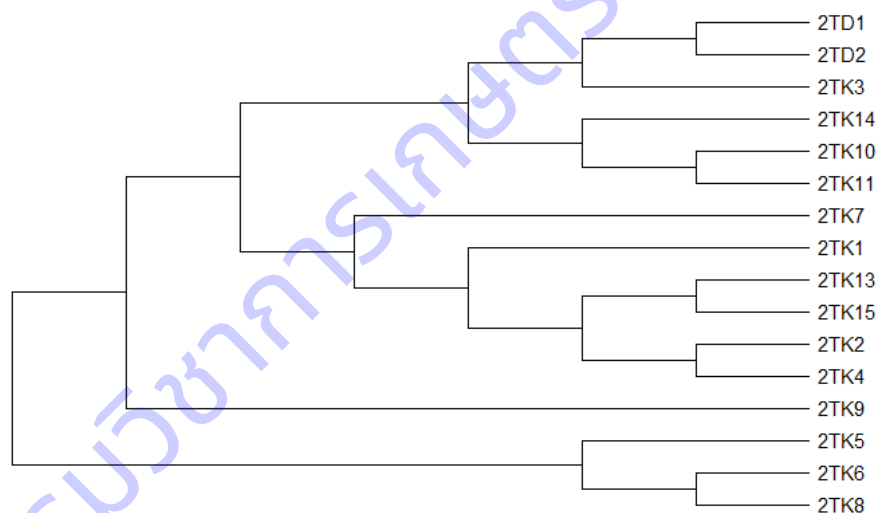
GTACTGTACGGGTTTTTTTTGAAAAGATTAGGTTCTGAATTATTGGAAGAATTCTTTACAGAGGAAGAAGATAT
TTTTTCTTTGATCTTCTCAAGAGCTTCTTCTACTTTGCAGAAGTTATATAGAGGTCGGATTTGGTGTTTGGAT
ATTTTTGATTTTCATCAATGATCTGGTCAATCATGAATAACAGGTTATCATACTTTGATAATGGAAACTATCC
TTAAATGAGGAAAAAAAAAAGAATTCATTCGTTTCTATTATGAAATATGAAATGGATTATGAAATGCTCATG
TAGTAAGAGTAGGAATTGATAAACTAAGTACTTAACTTTTTTAGAGTCCTGTTCTAGGGAAGGAACTGAGG
>2TK9_MatK

AAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAATCATTTGATTATTTCTGCTAATAATTCTAAGAAAA
ATCCATTTTGGGGGTACAACAAGAATTTGTATTCTCAAATAATATCAGAGGGGCTTGCCGTCAGTGTGGAAA
TTCCATTTTCCCTACAATTAATCTCTTCCCTTAGAGAAGGCAGAAATCATAAAATCCTATAATTTACGATCAAT
TCACTCAATATTTCTTTTTTTGAGGAAAAATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAGATGTACAAATACCCTAC
CCTATCCATCTGGAAATCTTGATTCAAACCCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCTTTCATTTATTAA
GGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAGGATTTCTACTTTTTTCAA
AAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCCCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTTTTTCTCC
GTAACAAATCTTCTATTACGATTAACATCTTCTGGAGTCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGCAAAAAAT
AGAACATTTTGTAGAAGCTTTGATAAGGATTTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATTCAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGCAATACT
ATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATC
CGAGCATTCTTTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATG
TTGGAAAAGTCATTTATAATGAAAAATATTATGAAAAAGCTTGATAACAATAATTCCAATTATTCCTCTAATTA
GATCATTGGCTAAAGCAAAATTTTGAATGTATTAGGACATCCATTAGTAAATCGGTCTGGGCCGATTTCATC
CGATTTTGTATTATTGACCGATTTTTGAGATATGCAGAGATCTTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAA
AAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGGCTTTCTTGATTA AAAACTTTGGCGCGTAAACACAAAA
ภาพที่ 3.5.10 แสดงตัวอย่างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MatK ในสโตน 16 พันธุ์

ตารางที่ 3.5.2 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ MatK ตำแหน่งลำดับเบส ที่ 64-899 เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ในสโตนพันธุ์ต่างๆ จำนวน 16 พันธุ์

พันธุ์	ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์				
	64	192	243	587	899
Consensus	G	A	A	T	A
2TD1	C	G	G	T	C
2TD2	C	G	G	T	C
2TK1	G	A	A	T	A
2TK10	C	A	G	C	A
2TK11	C	A	G	C	A
2TK13	C	A	G	C	A
2TK14	C	A	G	C	A
2TK15	G	A	A	T	A

2TK2	G	A	A	T	A
2TK3	G	A	A	T	A
2TK4	C	A	G	C	A
2TK5	G	A	A	T	A
2TK6	C	A	G	C	A
2TK7	G	A	A	T	A
2TK8	C	A	G	C	A
2TK9	G	A	A	T	A
	7G,9C	14A,2G	7A,9G	9T,7C	14A,2C



ภาพที่ 3.5.11 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างสะตอ จำนวน 16 ตัวอย่าง จากยีน MatK ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx

ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบนิวคลีโอไทด์ของสะตอพันธุ์ต่างๆ ของจีนส่วนยีน ITS

>2TD1 ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTYGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCRGAAGGAT
 CATTGTCGATGMCCCACCGAAAGAGCGACCCGCGAACCGGTTGGCACAGGCCCCGGCGTGGGGGGGGATA
 TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCGCCAAACGAACCAATCCCGGCGCCGAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
 AAGCAAGCACGGCGCTGGCGCCCCGTCACGGCGCCGACGACCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
 CAMAACGACTCTCGGAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCRATACTTGGT
 GTGAATTGCAGAATCMYGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGG
 CACGTCTGCCTGGGTGTCACRCAACGTGCGCGCCGCCCCGATCCCCGGGCGCGGCGGATGATGGCCTCCCGG
 GGGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTG

ACCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCCTAAGCG
ACCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGA
A

>2TD2_ ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTYGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCRGAAGGAT
CATTGTCGATGMCCCACCGAAAGAGCGACCCGCGAACC GGTTGGCACAGGCCCCGGGCGTGGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCGCCAAACGAACCAATCCC GGCGCCGCAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGTACGGCGCCGACGCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CAMAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCRATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCMYGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGG
CACGTCTGCCTGGGTGTCACGCAACGTCGCCGCCGCCGATCCCCGGGCGCGGCGGATGATGGCCTCCCGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTG
ACCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCCTAAGCG
ACCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGA
A

>2TK1_ ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTYGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCRGAAGGAT
CATTGTCGATGMCCCACCGAAAGAGYGACCMRYGAACYGGTTGGCACAGGCCCCGGGCGTGGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCGCCAAACGAACCAATCCC GGCGCCGCAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGTACGGCGCCGACGCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CACAATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCAATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCAYGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC
ACGTCTGCCTGGGTGTCACACAACGTCGCCGCCGCCGATCCCCGGGCGCGGCGGATGATGGCCTCCCGGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTGA
CCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGYAAGCGA
CCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGAA

>2TK10_ ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT
CATTGTCGATGACCCACCGAAAGAGCGACCCGCGAACC GGTTGGCACAGGCCCCGGGCGTGGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCGCCAAACGAACCAATCCC GGCGCCGCAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGTACGGCGCCGACGCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CAAAAYGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC
ACGTCTGCCTGGGTGTCACGCAACGTCGCCGCCGCCGATCCCCGGGCGCGGCGGATGATGGCCTCCCGGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTGA
CCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGYAAGCGA
CCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGAA

>2TK11_ ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTYGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCRGAAGGAT
CATTGTCGATGMCCCACCGAAAGAGYGACCMRYGAACYGGTTGGCACAGGCCCCGGGCGTGGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCGCCAAACGAACCAATCCCGGCGCCGCAGGCGCCAAGGAAGCGCAACG
AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGTACGGCGCCGACGACCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC
ACGTCTGCCTGGGTGTCACGCAACGTCGCCGCCGCCGATCCCGGGCGCGGGGATGATGGCCTCCCGGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTGA
CCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGCAAGCGA
CCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGAA
>2TK13_ ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTTGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCRGAAGGAT
CATTGTCGATGMCCCACCGAAAGAGTGACCAATGAACTGGTTGGCACAAAGCCCCAGGCGGGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCGCCAAACGAACCAATCCCGGCGCCGCAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGTACGGCGCCGACGACCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CACAAYGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCRATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCMYGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGG
CACGTCTGCCTGGGTGTCACACAACGTCGCCGCCGCCGATCCCGGGCGCGGGGATGATGGCCTCCCGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTG
ACCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGCAAGCG
ACCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGA
A

>2TK14_ ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT
CATTGTCGATGACCCACCGAAAGAGCGACCCGCGAACCGTTGGCACAGGCCCCGGGCGTGGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCGCCAAACGAACCAATCCCGGCGCCGCAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGTACGGCGCCGACGACCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CAMAAYGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCRATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCMYGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGG
CACGTCTGCCTGGGTGTCACRCAACGTCGCCGCCGCCGATCCCGGGCGCGGGGATGATGGCCTCCCGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTG
ACCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGYAAGCG
ACCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGA
A

>2TK15_ ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTYGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCRGAAGGAT
CATTGTCGATGCCCCACCGAAAGAGYGACCMRYGAACYGGTTGGCACARGCCCCRGGCGTGGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCGCCAAACGAACCAATCCCGGCGCCGCAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA

AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGGTACGGCGCCGACGACCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CAMAAYGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCRATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCMYGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGG
CACGTCTGCCTGGGTGTCACRCAACGTGCGCGCCGCCGATCCCCGGGCGCGGCGGATGATGGCCTCCCGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTG
ACCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGYAAGCG
ACCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGA
A

>2TK2_ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT
CATTGTCGATAACCCACCGAAAGAGTGACCAGCGAACTGGTTGGCACAAGCCCCGGGCGTGGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCGCCAAACGAACCAATCCCCGGCGCCGCAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGGTACGGCGCCGACGACCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CACAAYGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCRATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCATGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC
ACGTCTGCCTGGGTGTCACACAACGTGCGCGCCGCCGATCCCCGGGCGCGGCGGATGATGGCCTCCCGGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTGA
CCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGYAAGCGA
CCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGAA

>2TK3_ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTYGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT
CATTGTCGATGACCCACCGAAAGAGCGACCCGCGAACCAGTTGGCACAAGCCCCGGGCGTGGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCGCCAAACGAACCAATCCCCGGCGCCGCAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGGTACGGCGCCGACGACCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CAMAAYGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCRATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCMYGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGG
CACGTCTGCCTGGGTGTCACRCAACGTGCGCGCCGCCGATCCCCGGGCGCGGCGGATGATGGCCTCCCGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTG
ACCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGTAAGCG
ACCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGA
A

>2TK4_ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT
CATTGTCGATAACCCACCGAAAGAGTGACCAGCGAACTGGTTGGCACAAGCCCCRGGCGKGGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCGCCAAACGAACCAATCCCCGGCGCCGCAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGGTACGGCGCCGACGACCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CAMAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCCYGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC

ACGTCTGCCTGGGTGTCACGCAACGTCGCCGCCGCCGATCCCCGGGCGCGCGGATGATGGCCTCCCGGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTGA
CCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGTAAGCGA
CCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGAA
>2TK5_ ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTYGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCRGAAGGAT
CATTGTCGATRMCCCAMCRRMAGARYGACCMAYGAACYGGTTGGCACARGCYCCRGCGKGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCCCGCCAAACGAACCAATCCCCGGCGCCGAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGTACGGCGCCGACGACCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCAYTAGGCCGAGGGC
ACGTCTGCCTGGGYGTCACACAACGTCGCCGCCGCCGATCCCCGGGCGCGCGGATGATGGCCTCCCGGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTGA
CCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGYAAGCGA
CCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGAA
>2TK6_ ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT
CATTGTCGATAACCCAACAGCAGAACGACCCGTGAACCGTTGGCACAGGCCCGGGCGTGGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCCCGCCAAACGAACCAATCCCCGGCGCCGAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGTACGGCGCCGACGACCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCACTAGGCCGAGGGC
ACGTCTGCCTGGGCGTCACACAACGTCGCCGCCGCCGATCCCCGGGCGCGCGGATGATGGCCTCCCGGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTGA
CCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGYAAGCGA
CCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGAA
>2TK7_ ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT
CATTGTCGATGACCCACCGAAAGAGYGACCMRYGAACYGGTTGGCACARGCCCCRGGCGTGGGGGGGGATA
TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCCCGCCAAACGAACCAATCCCCGGCGCCGAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGTACGGCGCCGACGACCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
CAMAAYGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCRATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCMYGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGG
CACGTCTGCCTGGGTGTCACRCAACGTGCGCGCCGCCGATCCCCGGGCGCGGCGGATGATGGCCTCCCGG
GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTG
ACCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGYAAGCG
ACCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGA
A

>2TK8_ ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT
 CATTGTCGATAACCCAACAGCAGAACGACCCGTGAACCGTTGGCACAGGCCCCCGGGCGTGGGGGGGATA
 TGAGGGCGCGGAGCCGCCCCCGCCAAACGAACCAATCCCGGCGCCGCAGGCGCCAAGGAAGCGCAACA
 AAGCAAGCACGGCGCTGGCGGCCCGGTCACGGCGCCGACGACCCAGCGCCGCGCCTAATGCCATCGGCATC
 CAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGT
 GTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCACTAGGCCGAGGGC
 ACGTCTGCCTGGGCGTCACACAACGTCGCCGCCGCCGATCCCGGGCGCGCGGATGATGGCCTCCCGGG
 GGCCCCCGCCCCGGCCGGCCGAAAAGACGGCCCGACGTGACGACAGCCACGATCCACGGTGGATGAGTGA
 CCGACGAGCGCTCGAGACCGGACGTGCGCGGGTCGTCCACGGAGGCGGAGCCACCGACTCCCGCAAGCGA
 CCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCCTGTGTGAA

>2TK9_ ITS

GACGTTGTACCTTATCAYTTAGAGGAAGGAGAAGTYGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCRGAAGGAT
 CATTGTCGATGMCCCACCGAAAGAGYGACCMRYGAACYGGTTGGCACAGGCCCCGGGCGTGGGGGGG

ภาพที่ 3.5.12 ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน ITS ในระต่อพันธุ์ต่างๆจำนวน 16 พันธุ์

ตารางที่ 3.5.3 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ลำดับเบสตำแหน่งที่ 36-92 ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ในระต่อพันธุ์ต่างๆ จำนวน 16 พันธุ์

พันธุ์	ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์						
	36	65	83	84	89	91	92
Consensus	Position	G	G	A	C	G	A
2TD1	Y	R	G	M	C	G	A
2TD2	Y	R	G	M	C	G	A
2TK1	Y	R	G	M	C	G	A
2TK10	C	G	G	A	C	G	A
2TK11	Y	R	G	M	C	G	A
2TK13	T	R	G	M	C	G	A
2TK14	C	G	G	A	C	G	A
2TK15	Y	R	G	C	C	G	A
2TK2	Y	G	G	A	C	G	A
2TK3	Y	R	R	M	M	R	R
2TK4	C	G	A	A	A	A	G
2TK5	C	G	G	A	C	G	A
2TK6	C	G	A	A	A	A	G
2TK7	Y	R	G	M	C	G	A
2TK8	C	G	A	A	C	G	A

2TK9	C	G	A	A	C	G	A
	7C,1T,8Y	8G,8R	11G,4A,1R	8A,1C,7M	13C,2A,1M	13G,2A,1R	13A,2G,1R

พันธู์	ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์						
	93	97	98	103	104	105	110
Consensus	A	G	C	C	G	C	C
2TD1	A	G	C	C	G	C	C
2TD2	A	G	C	C	G	C	C
2TK1	A	G	Y	M	R	Y	Y
2TK10	A	G	C	C	G	C	C
2TK11	A	G	Y	M	R	Y	Y
2TK13	A	G	T	A	A	T	T
2TK14	A	G	C	C	G	C	C
2TK15	A	G	Y	M	R	Y	Y
2TK2	A	G	C	C	G	C	C
2TK3	M	R	Y	M	A	Y	Y
2TK4	C	A	C	C	G	T	C
2TK5	A	G	Y	M	R	Y	Y
2TK6	C	A	C	C	G	T	C
2TK7	A	G	Y	M	R	Y	Y
2TK8	A	G	T	A	G	C	T
2TK9	A	G	T	A	G	C	T
	13A,2C,1M	13G,2A,1R	7C,3T,6Y	7C,3A,6M	9G,2A,5R	7C,3T,6Y	7C,3T,6Y

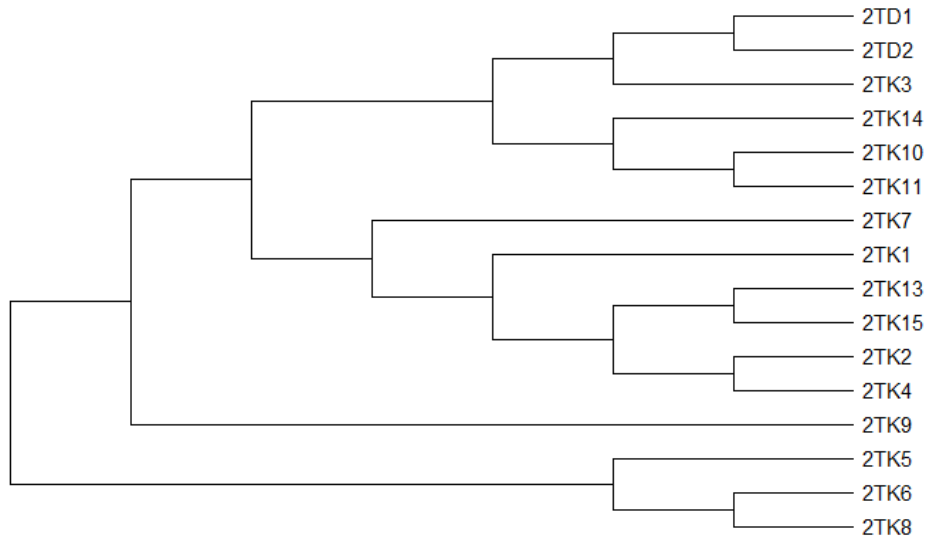
ตารางที่ 3.5.3(ต่อ)แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ลำดับเบสตำแหน่งที่ 93-110 ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ในระต่อพันธู์ต่างๆ จำนวน 16 พันธู์

พันธู์	ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์						
	121	124	127	132	214	288	291
Consensus	G	C	G	T	A	A	C
2TD1	G	C	G	T	A	M	C
2TD2	G	C	G	T	A	M	C
2TK1	G	C	G	T	A	C	T
2TK10	G	C	G	T	A	A	Y
2TK11	G	C	G	T	G	A	C
2TK13	A	C	A	G	A	C	Y
2TK14	G	C	G	T	A	M	Y

2TK15	R	C	R	T	A	M	Y
2TK2	G	C	G	T	A	M	Y
2TK3	R	Y	R	K	A	A	C
2TK4	G	C	G	T	A	A	C
2TK5	R	C	R	T	A	M	Y
2TK6	G	C	G	T	A	A	C
2TK7	G	C	G	T	A	M	Y
2TK8	A	C	R	K	A	M	C
2TK9	A	C	G	T	A	C	Y
	10G,3A,3R	15C,1Y	11G,1A,4R	13T,1G,2K	15A,1G	5A,3C,8M	7C,1T,8Y

ตารางที่ 3.5.3(ต่อ)แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ลำดับเบสตำแหน่งที่ 121-291 ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ในระต่อพันธุต่างๆ จำนวน 16 พันธุ์

พันธุ์	ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์						
	348	373	374	417	443	449	636
Consensus	G	C	C	T	T	A	T
2TD1	R	M	Y	T	T	R	T
2TD2	R	M	Y	T	T	G	T
2TK1	A	A	Y	T	T	A	Y
2TK10	G	C	C	T	T	G	Y
2TK11	G	C	C	T	T	G	C
2TK13	R	M	Y	T	T	A	C
2TK14	R	M	Y	T	T	R	Y
2TK15	R	M	Y	T	T	R	Y
2TK2	R	M	Y	T	T	R	T
2TK3	G	C	C	Y	Y	A	Y
2TK4	G	C	C	C	C	A	Y
2TK5	R	M	Y	T	T	R	Y
2TK6	G	C	C	C	C	A	C
2TK7	R	C	C	Y	T	R	C
2TK8	G	C	Y	T	T	G	T
2TK9	R	A	T	T	T	A	Y
	6G,1A,9R	7C,2A,7M	6C,1T,9Y	12T,2C,2Y	13T,2C,1Y	6A,4G,6R	4T,4C,8Y



ภาพที่ 3.5.13 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างสะตอ จำนวน 16 ตัวอย่าง จากยีน ITS ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสะตอ ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกต่างๆของภาคใต้มาปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ได้พบว่าไพรเมอร์บาร์โค้ดของพืช *rbcl, matK, ITS* และ *TrnH-psbA* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในตัวอย่างสะตอ 2 ชนิดคือ สะตอข้าว และ สะตอดานโดยพบว่ายีนใน *matK* และ *ITS* สามารถนำมาใช้จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจัดจำแนกสะตอ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสะตอ 2 ชนิดจำนวน 16 ต้น โดยสร้างแผนผังพันธุกรรมสามารถแบ่งกลุ่มสะตอได้เป็น 4 กลุ่มแต่ยังไม่สามารถแยกสะตอข้าวและสะตอดานออกจากกันได้ จึงควรนำเทคนิคอื่นๆ เช่น เทคนิค GBS มาใช้ในการจัดจำแนกพันธุ์สะตอ ต่อไป

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. เก็บรวบรวมความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชสวน จำนวน 5 พืช ได้แก่ ทุเรียน, เงาะ, บัว, กล้ายไม้สมุนไพรร และพริก ได้ตัวอย่างพันธุ์พืชจำนวน 169, 36, 34, 40 และ 84 ตัวอย่าง ตามลำดับ; พันธุ์พืชไร่ จำนวน 2 พืช ได้แก่ มันสำปะหลัง และถั่วเหลือง ได้ตัวอย่างพันธุ์พืชจำนวน 17 และ 40 ตัวอย่าง ตามลำดับ; และ พืชท้องถิ่น จำนวน 5 พืช ได้แก่ พืชวงศ์ศีลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ ได้ตัวอย่างพันธุ์

พืชจำนวน 19, 20, 63, 40 และ 16 ตัวอย่าง ตามลำดับ พร้อมจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของทุเรียน, เงาะ, บัว, พริก, มันสำปะหลัง, ถั่วเหลือง, พืชวงศ์สิลา, ปัญจขันธุ์, ปลาไหลเผือก, หนอนตายหยาก และสะตอ ได้จำนวน 120, 24, 20, 40, 84, 17, 73, 19, 20, 43, 40 และ 16 ตัวอย่าง ตามลำดับ

2. ยีนที่เหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ทุเรียนมี 2 ยีน คือ *DuBc04* และ *ITS2*; พันธุ์เงาะมี 6 ยีน คือ *matK1R*, *rbcL*, *rbclA*, *psbA*, *rpoC* และ *trnL*; พันธุ์บัวมี 4 ยีน คือ *ITS*, *rpoC1*, *matK* และ *rbcL*; พันธุ์กล้วยไม้สมุนไพรมี 4 ยีน คือ *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* และ *ITS*; พันธุ์พริกมี 3 ยีน คือ *ITS*, *rbcL* และ *trnH-psbA*; พันธุ์มันสำปะหลังมี 2 ยีน คือ *matK*, และ *ITS2*; พันธุ์ถั่วเหลืองมี 3 ยีน คือ *ITS*, *rbcL* และ *rpoC*; พืชวงศ์สิลามี 4 ยีน คือ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ *ITS*; พันธุ์ปัญจขันธุ์มี 4 ยีน คือ *accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3*; พืชสกุลปลาไหลเผือกมี *rbcL*, *rpoC* และ *ITS*; พืชสกุลหนอนตายหยากมี *psbA-trnH*, *matK* และ *rbcL*; และพันธุ์สะตอมี 2 ยีน คือ *matK* และ *ITS*

3. จัดเก็บเชื้อพันธุกรรมดีเอ็นเอได้ 674 ตัวอย่าง คือ ทุเรียนได้ 145 ตัวอย่าง, เงาะ 34 ตัวอย่าง, บัว 162 ตัวอย่าง, กล้วยไม้ 39 ตัวอย่าง, พริก 84 ตัวอย่าง, มันสำปะหลัง 17 ตัวอย่าง, ถั่วเหลือง 40 ตัวอย่าง, พืชวงศ์สิลา 19 ตัวอย่าง, พันธุ์ปัญจขันธุ์ 20 ตัวอย่าง, พืชสกุลปลาไหลเผือก 63 ตัวอย่าง, พืชสกุลหนอนตายหยาก 35 ตัวอย่าง และสะตอ 16 ตัวอย่าง และเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชได้ 143 ตัวอย่าง ได้แก่ พริก 84 ตัวอย่าง และถั่วเหลือง 59 ตัวอย่าง

4. จัดทำฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพได้ 424 ข้อมูล ได้แก่ ทุเรียนได้ 145 ข้อมูลพันธุ์พืช, เงาะได้ 34 ข้อมูลพันธุ์พืช, บัวได้ 34 ข้อมูลพันธุ์พืช, กล้วยไม้สมุนไพรมี 39 ข้อมูลพันธุ์พืช, พริกได้ 71 ข้อมูลพันธุ์พืช, มันสำปะหลังได้ 17 ข้อมูลพันธุ์พืช, ถั่วเหลืองได้ 40 ข้อมูลพันธุ์พืช, พืชวงศ์สิลาได้ 14 ข้อมูลชนิดพืช, ปัญจขันธุ์ได้ 20 ข้อมูลพันธุ์พืช, พืชสกุลปลาไหลเผือกได้ 2 ข้อมูลชนิดพืช, พืชสกุลหนอนตายหยากได้ 6 ข้อมูลชนิดพืช และสะตอได้ 2 ข้อมูลพันธุ์พืช; และฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของทุเรียนได้ 270 ข้อมูล, เงาะได้ 187 ข้อมูล, บัวได้ 392 ข้อมูล, กล้วยไม้สมุนไพรมี 80 ข้อมูล, พริกได้ 217 ข้อมูล, มันสำปะหลังได้ 68 ข้อมูล, ถั่วเหลืองได้ 120 ข้อมูล, พืชวงศ์สิลาได้ 54 ข้อมูล, ปัญจขันธุ์ได้ 78 ข้อมูล, พืชสกุลปลาไหลเผือกได้ 82 ข้อมูล, พืชสกุลหนอนตายหยากได้ 51 ข้อมูล และสะตอได้ 64 ข้อมูล

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยของโครงการวิจัยในภาพรวม การสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีศักยภาพในการจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานในพืชแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามแม้ว่าพันธุกรรมพืชจะมีผลโดยตรงต่อลักษณะการแสดงออกของพืช (phenotype) สภาพแวดล้อมในการเพาะปลูกก็เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญมีผลต่อการแสดงออกด้วยเช่นกัน การจำแนกพันธุ์พืชด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงบริเวณใดบริเวณหนึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการจำแนกพันธุ์พืช เนื่องจากตำแหน่งนั้นมีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ต่ำ และลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่งนั้นมีขนาดเล็กมาก (genome size) เมื่อเทียบกับขนาดของจีโนมพืช มีผลทำให้ตำแหน่งดังกล่าวไม่สามารถแยกความแตกต่างของพืชในระดับพันธุ์ได้ ดังนั้น การเพิ่มยีนที่มีความผันแปรสูง หรือศึกษาพืชทั้งจีโนม รวมทั้งการวิเคราะห์พืชด้วยเทคนิคใหม่ๆ จะสามารถช่วยยืนยันความแตกต่างของพันธุ์พืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจเหล่านี้ได้

บรรณานุกรม

- กนกวรรณ แดงสวัสดิ์วิภา หงษ์ตระกูลนิത്യศรี แสงเดือนและนิรันดร์ จันทวงศ์. 2551. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. หน้า 128-134.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2559. การจำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง. กรุงเทพฯ 96 หน้า.
- กฤตชญา อีสกุล. 2547. สมบัติและความคงฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดสารภี *Mammeasiamensis*(Miq.) T. And. และรากหนอนตายหยาก *Stemonacurtisii*Hk. f. ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชตระกูลกระหล่ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. สถานการณ์การผลิตและการตลาดรายสัปดาห์ 4-10 มกราคม 2564.
- เจนจิรา อรทัยวัฒนากุล พรชนก วรพันธ์โยธิน และ สุวิมล บุญสนอง. 2558. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ (*Nephelium lappaceum*) ด้วยเทคนิค SRAP. โครงการพิเศษ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 40 หน้า
- เจษฎาภรณ์ เรืองศักดิ์. 2554. ผลของเมทิลจัสโมเนทและซาลิไซลิกแอซิดต่อการผลิตสารอัลคาลอยด์ของต้นหนอนตายหยากในสภาพทดลอง. การค้นคว้าแบบอิสระ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- ฐิติพร ไท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์ . 2558. การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน matK และ rpoC1. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23(1).
- ฐิติพร ปิงยศ. 2561. บทความออนไลน์ “กล้วยไม้” สมุนไพรใช้เป็นยา .สืบค้นจาก:
http://www.qsbg.org/Database/Article/Art_Files/%BA%B7%A4%C7%D2%C1%A1%C5%E9%C7%C2%E4%C1%E9%2060%20ED%202.5.pdf [20 มิถุนายน]
- ณัฐชา แสงศรี จตุพร กุลอึ้ง และวิภา หงศ์ตระกูล. 2562. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ไรโบโซมอลไอทีเอสในบัวระดับสกุล *Nymphaea* ของประเทศไทย. วารสาร Thai Journal of Science and Technology 8(3): 258-270.
- ณริพร สุทธดุก. 2555. การระบุชนิดของต้นหนอนตายหยากโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- ณริพร สุทธดุก ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา และสิริพร โรจน์อารยานนท์. 2558. การใช้เทคนิค HAT-RAPD ในการระบุชนิดของหนอนตายหยากจากส่วนราก. Thai J. Genet. 8(2): 106-110.
- เดือนใจ ไก่สกุล และ ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤกษ์. 2556. รูปแบบการขยายพันธุ์เพื่อการค้ากับหลักฐานความแปรปรวนทางพันธุกรรมของทุเรียนการค้าของไทย. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 18. โรงแรมแอมบาสเดอร์ สุขุมวิท กรุงเทพฯ. 17-19 กรกฎาคม 2556.
- ธีระชัย ธนานันต์และจุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว. 2560. การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายหมู่ไนโครเซอร์ซูเอและลูกผสมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน matK และ rbcl. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 25(4).
- นิตยศรี แสงเดือน. 2551. พันธุศาสตร์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 432 หน้า.
- บุญชนะ วงศ์ชนะ และอาภรณ์ เข้มมสายใจ. 2543. การคัดเลือกพันธุ์สต่อข้าวที่ให้ผลผลิตนอกฤดู. ตีพิมพ์: รายงานการวิจัย ศูนย์วิจัยพืชสวนตรังกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- บุญชนะ วงศ์ชนะสมาลี ศรีแก้ว ชญานุช ตรีพันธ์และ ศุภลักษณ์ อริยัญชัย .2559. การเปรียบเทียบสายพันธุ์สต่อในและนอกฤดูปลูก. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ (III): M01/16-25.
- อาจารย์ อินทชูป. 2551. พืชสกุลหนอนตายหยาก (*Stemona*Lour.) บางชนิดในประเทศไทย. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. 22(2): 20-23.
- ปารณัฐ สุขสุทธิ. 2541. สต่อ. จุลสารข้อมูลสมุนไพร 2: 15.
- ปิยดา บุสดี ธีระชัย ธนานันท์ และนฤมล ธนานันต์. 2558. การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน rpoC1 และ rbcl. ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 23(6): 983-993.
- ปิยรัชฎ์ เจริญทรัพย์, ฐิตาภรณ์ ภูมิไชย์, อินทิรา จารุเพ็ง, อรชร โชติญาณวงษ์, ประไพ โมจรินทร์ และ พรชัย จุฑามาศ. 2552. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์. ใน : การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์ แห่งชาติ ครั้งที่ 16. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี. 25-27 มีนาคม 2552.
- ภทร รติวัฒน์. 2553. ชนิดของบัวในประเทศไทย. http://thailand-an-field.blogspot.com/2010/01/blog-post_820.html. สืบค้นวันที่ 28 เมษายน 2559.
- มณฑา วงศ์มณีโรจน์, รรรอง หอมหวล, ศิริวรรณ บุรีคำ และสุรันวดี จิระจินดา. 2551. การเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำรากหนอนตายหยาก (*Stemonacollinsae*Craib.) ในสภาพปลอดเชื้อและการนำต้นออกปลูก. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 6(1): 65-72.

- เมธี รุ่งโรจน์สกุล. 2544. ลักษณะสัณฐานวิทยา จำนวนโครโมโซม และการขยายพันธุ์ของต้นหนอนตายหยาก (*Stemonasp.*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 116 หน้า.
- พนมกร ชุนอ่อน. 2550. การใช้น้ำสกัดชีวภาพสมุนไพรหนอนตายหยากควบคุมหนอนแมลงวันบ้าน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. คณะพัฒนาสังคมและสิ่งแวดล้อม, สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์.
- พรรษา มนต์แข็ง อรุณรัตน์ ฉีราช ธวัชชัย ธาณี และ รุ่งลาวัลย์ สุดมูล. 2556. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุลขี้เหล็ก. วารสารวิจัย มข. 13(2): 18-30.
- พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ และอรุณรัตน์ ฉีราช. 2554. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต กรณีศึกษา: จิน Cytochrome c Oxidase I (COI) ในสัตว์. วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม; ว.มร. ปีที่ 5 ฉบับที่ 2: พฤษภาคม - สิงหาคม 2554. หน้า 205-210.
- ยุรนนท์ ทรวงทองกลาง และ ชูตา บุญภักดี. 2560. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ไม่มีความแปรปรวน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 22(ฉบับพิเศษ): 433-438.
- รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและเทคนิค. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.
- วีระพล จันท์สุวรรณ สถาพร จิตตपालพงศ์ และนงนุช จันทราช. 2536. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อเห็บโค. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย์.). 27:336-340.
- วิจิตรา สติถย์บุตร วิเชียร กิรตินิจกาล และสุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2559. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Eurycoma longifolia* Jack ในประเทศไทย จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 54. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 2-5 กุมภาพันธ์ 2559 หน้า 358-365.
- วชิรญา อิมสบาย. 2553. โครงการฉบับสมบูรณ์ เรื่อง บทบาทของความสัมพันธ์ของน้ำและเอทิลีนกับการเสื่อมสภาพและการเก็บรักษาดอกบัวหลวง. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 106 หน้า.
- วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2552. ย่อเกสรกรรมไทยและสรรพคุณสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 3. ศิลป์ขยายบรรจุภัณฑ์และการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 224 น.
- วุฒิพงค์ มหาคำ. 2554. DNA barcodes ของพืช: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 3(1): 1-30.
- ศุนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 2562a. ปัญจชั้น์ลูกผสมสายพันธุ์เชียงราย 2-20. 22 หน้า.
- ศุนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 2562b. ปัญจชั้น์ลูกผสมสายพันธุ์เชียงราย 7 ใบ. 21 หน้า.
- สรวง รุ่งประกายพรรณ, บุชบา เผ่าทองจีน, พีรยศ ภมรศิลปธรรม, วีรยุทธ์ เลิศนที, และสินธพ โฉมยา. 2554. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสมุนไพรไทย (DNA barcode of Thai medicinal plants). สืบค้นจาก: <http://www.pharm.su.ac.th/dna2/dna1.php> [10 พฤษภาคม 2561]
- สุรีย์ ภูมิอมร และอนันต์ ดาคง. 2540. ไม้สกุลสะตอ: ทิศทางวิจัยและพัฒนา. กรุงเทพฯ: บริษัท เพ็ญฟ้า พรินต์ติ้ง จำกัด.
- สมุนไพร http://samunpai2525.blogspot.com/2014/09/blog-post_1.html

- สุชาติสุขหระอง. 2553. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ :จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช. มปป. ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์พืชทุเรียน. กรมวิชาการเกษตร.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. สถานการณ์และแนวโน้มสินค้าเกษตรที่สำคัญ ปี 2558. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- หิรัญ หิรัญประดิษฐ์ และสมน อมรวิวัฒน์. 2547. ทุเรียน :สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 28. <http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK28/chapter4/t28-4-l2.htm#sect1a>
- อภิชา ไชยเหล็ก และสิริพร โรจน์อารยานนท์. 2558. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนตายหยากด้วยเทคนิค Sequence Related Amplified Polymorphism. ว.วิทย. มข. 43(3): 403-412.
- อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ศรีประไพ ธรรมแสง วรงค์ นัยวินิจ ภาคภูมิ สืบบุญการณ อารี วังมณิรัตน์ และนิธิตา สุทธิพันธ์. 2547. การศึกษาการผลิตและการขยายพันธุ์หนอนตายหยาก. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.
- อรุณทัย ซาววาสุภาวดี จ้อเหรียญอัญชลี ศรีสุวรรณประพิศ วองเทียม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-118.
- อารีย์ วรรณวุฒิก. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. อติสรรงค์, กรุงเทพฯ. 133 น.
- อ้อยทิน ผลพานิช และรัชณี โสภา. 2558. วิวัฒนาการในการพัฒนาพันธุ์และเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ เชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน
- อำนาจ อิศรางกูร ณ อยุธยา และอรรรณพ ต้นสกุล. 2535. เกษตรยั่งยืน เกษตรกรรมกับธรรมชาติเครือข่ายเกษตรกรรมทางเลือก. พระโขง, กรุงเทพฯ.
- Abid, S., P. Mohanan, L. Kaliraj, J.K. Park, J.C. Ahn and D.C. Yang. 2019. Development of species-specific chloroplast markers for the authentication of *Gynostemma pentaphyllum* and their distribution in the Korean peninsula. *Fitoterapia* 138: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104295>
- Ali, M.A., G. Gyulai, N. Hidvegi, B. Kerti, F.M. Al Hmaid, A.K. Pandey and J. Lee. 2013. The changing epitome of species identification DNA barcoding. *Saudi Journal of Biological Sciences* (2014) 21: 204-231.
- Andrews, S. 1998. Taxonomic notes on the Aquifoliaceae of Sabah and Sarawak. *Sandakania* 11: 1-33.
- Andrews, S. 2002. Aquifoliaceae. In: E. Soepadmo, L.G. Saw and R.C.K. Chung (eds), *Tree Fl. Sabah & Sarawak* Vol. 4. Ampang Press Sdn. Bhd., Kuala Lumpur. pp. 1-27.
- Bafeel, S.O., I.A. Arif, M.A. Bakir, H.A. Khan, A.H. Al-Farhan, A.A. Al-Homaidan, A. Ahamed and T. Jacob. 2011. Comparative evaluation of PCR success with universal primers of

- maturase K (matK) and Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (rbcL) for barcoding of some arid plants. *Plant Omics* 4: 195-198.
- Baird, M.C., S.G. Pyne, A.T. Ung, W. Lie, T. Sastraruji, A. Jatisatienr, C. Jatisatienr, S. Dheeranupattana, J. Lowlam and S. Boonchalermkit. 2009. Semisynthesis and biological activity of stemofoline alkaloids. *Journal of Natural Product*. 72: 679-684.
- Bashir, M.A., N.H. Mohdlzham, F. Mohd Salleh, M.S. Shamsir Omar and A. Wagiran. 2016. Assessing product adulteration in selected Malaysian herbal product using DNA barcoding. *International Conference on Agricultural and Food Engineering*, 23 – 25 August 2016, pp.98-104.
- Berger, A., Henderson, M., Nadoolman, W., Duffy, V., Cooper, D., Saberski, L., and L. Bartoshuk. 1995. Oral capsaicin provides temporary relief for oral mucositis pain secondary to chemotherapy/radiation therapy. *J. Pain Symptom Manag.* 10(3): 243-248.
- Bhat, R., and A. Karim. 2010. Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack): a review on its ethnobotany and pharmacological importance *Fitoterapia*. 81: 669-679.
- Bonatelli, I.A.S., D.C. Zappi, N.P. Taylor and E.M. Moraes. 2013. Usefulness of cpDNA markers for phylogenetic and phylogeographic analysis of closely related cactus species. *Genetics and Molecular Research* 12 (4): 4579-4585.
- Bosland, P.W. 1996. *Capsicums: Innovative uses of an ancient crop*. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press: Arlington, VA. pp. 479-487.
- Bridson, D. and L. Forman. 1998. *The Herbarium Handbook*. Royal Botanic Gardens, Kew. 346 p.
- Cabelin, V.L.D. and G.J.D. Alejandro. 2016. Efficiency of matK, rbcL, trnH-psbA, and trnL-F (cpDNA) to molecularly authenticate Philippine ethnomedicinal Apocynaceae through DNA barcoding *Pharmacognosy Magazine* 12(suppl. 3): S384-388.
- Casiraghi M., Labra M., Ferri E., Galimberti A. and Mattia DF. 2010. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics* 11: 440-453.
- 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.
- Cleeg, M.T. and G., Zurawski. 1992. Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny. In: *Present status and future procepects in molecular systematics of plant* Edited by Soltis, P.S. and J.J., Doyle. Published by Chapman and hall. New York.
- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., Van, B.C., Madrinan, S., Petersen, G. *et al.* 2007. New trends in plant systematics: a proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. *Taxon*. 56(2): 295-299.
- Chaveerach, A. 2009. *Plant molecular systematics*. Faculty of Science KhonKaenUniversity: KhonKaen.
- Chen, S.K. 1995. A classificatory system and geographical distribution of the genus *Gynostemma* Bl. (Cucurbitaceae). *Acta Phytotax. Sin.* 33(4): 403-410.

- Chen, S.K. and Y.X. Feng. 1999. Aquifoliaceae. Flora reipublicaepopularissinicae, 45. Beijing: Science Press. pp. 105–110.
- Chen, S.K., A. Lu and C. Jeffrey. 2011. *Gynostemma* Blume. In: Wu, Z. Y., P. H. Raven and D. Y. Hong (eds.), Flora of China vol. 19 (Cucurbitaceae through Valerianaceae, with Annonaceae and Berberidaceae). Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. pp. 11-15.
- Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, et al. 2010. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE* 5(1): e8613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- Collins and Cruickshank, 2013 genome size
- Cheng, T., C. Xu, L. Lei, C. Li, Y. Zhang and S. Zhou. 2016. "Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity." *Molecular Ecology Resources* 16(1): 138-149.
- Chotikadachanarong, K., S. Dheeranupattana, A. Jatisatienr, S. Wangkarn, P. Mungkornasawakul, S.G. Pyne, T.U. Alison and T. Sastraruji. 2011. Influence of salicylic acid on alkaloid production by root culture of *Stemonacurtisii* Hook. F. *Journal of Biological Sciences*. 3(4): 322-325.
- Colonna, V., D'Agostino, N., Garrison, E., Albrechtsen, A., Meisner, J., Facchiano, A., Cardi, T. and P. Tripodi. 2019. Genomic diversity and novel genome-wide association with fruit morphology in *Capsicum*, from 746k polymorphic sites. *Sci. Rep.* 9: 10067.
- Craib, W. G. 1931. *Florae Siamensis Enumeratio: a list of the plants known from Siam, with records of their occurrence 1*. Siam Society, Bangkok. pp. 277–278.
- Cubero, O.F., and A. Crespo. 2002. Isolation of nucleic acids from lichens. In: Kranner, I.C., Beckett, R.P., Varma, A.K. (eds.) *Protocols in Lichenology*. Springer Lab Manuals. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 381-391.
- Cuenound, P., V. Savolainen, L.W. Chatrou, M. Powell, R.J. Grayer and Chase M.W. 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcl*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American Journal Botany* 89(1): 132-144.
- De Wilde, W.J.J.O. and B.E.E. Duyfjes. 2007. *Gynostemma* (Cucurbitaceae) in Thailand and Malesia. *Blumea* 52(2): 263-280.
- De Wilde, W.J.J.O. and B.E.E. Duyfjes. 2008. *Gynostemma*. In: Santisuk, T. and K. Larsen (eds.), *Flora of Thailand* vol. 9 part 4, Cucurbitaceae. The Forest Herbarium, National Park, Wildlife and Plant Conservation Department, Bangkok. pp. 447-454.
- De Wilde, W.J.J.O. and B.E.E. Duyfjes. 2010. Cucurbitaceae. In: Nootboom, H.P. (ed.), *Flora of Malesiana*, Series I-Seed Plants vol. 19. Netherlands Centre for Biodiversity Naturalis, Leiden. pp. 78-86.
- Dunning, L. and V. Savolainen. 2010. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164(1): 1-9.

- Fan, L., S. Zhu, H. Chen, D. Yang, S. Cai and K. Komatsu. 2009. Molecular analysis of *Stemona* plants in China based on sequences of four chloroplast DNA regions. *Biol. Pharm. Bull.* 32(8) 1439-1446
- Farouk, A.E., and A. Benafri. 2007. Antibacterial activity of *Farouk and Benafri* Jack. A Malaysian medicinal plant. *Saudi medical journal*, 28: 1422-1424.
- Fazekas, A.J., K.S. Burgess, P.R. Kesanakurti, S.W. Graham, S.G. Newmaster, B.C. Husband, D.M. Percy, M. Hajibabaei and S.C.H. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3(7): e2802.
- Fazekas, A.J., M.L. Kuzmina, S.G. Newmaster and P.M. Hollingsworth. 2012. DNA barcoding methods for land plants. *Methods in Molecular Biology* 858: 223-252.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Flora of Thailand. 2011. *Stemonaceae*. 11(1): 74-99.
- Ford, C.S., K.L. Ayres, N. Toomey, N. Stahl, J.V.A. Kelly, L.J. Wikström, P.M. Hollingsworth, M.W. Chase and M.J. Wilkinson. 2009. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plant. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 1-11.
- Fukuda, W.M.G., C.L. Guevara, R. Kawuki and M.E. Ferguson. 1998. Selected morphological and agronomic descriptors for the characterization of cassava. International institute of tropical agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria. 19 pp.
- Galle, F. C. 1997. *Hollies: the genus Ilex*. Timber Press, Portland. 573 p.
- Gorzalczany, S., R. Filip, M.D.R. Alonso, J. Miño, G.E. Ferraro and C. Acevedo. 2001. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *Journal of Ethnopharmacology* 75: 291-4.
- Govaerts, R., E.N. Lughadha, N. Black, R. Turner and A. Paton. 2021. The World Checklist of Vascular Plants, a continuously updated resource for exploring global plant diversity. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-00997-6> *Scientific Data* 8: 215.
- Gu, J., L.J. Xu, Y. Peng, W. Xiao, Z.D. Chen and P.G. Xiao. 2011. Investigation of original plants of Kuding tea products and the character identification. *Journal of Chinese Medical Materials* 34: 196-199.
- Hajibabaei, M., G.A.C. Singer, P.D.N. Hebert, and D.A. Hickey. 2007. DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trend genet* 23: 167-172.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hamilton, M.B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 513-525.

- Hao, D.C.; X.J. Gu; P.G. Xiao; Z.G. Liang; L.J. Xu and Y. Peng. 2013. Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 3(1): 8-19.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., De, W.J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences. 270: 313-321.
- Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., Bank, M. *et al.* 2009. A DNA barcode for land plants. *PNAS*. 106(31): 12794- 12797.
- Hossain, S.M., Habiba, U., Bhuyan, S.I., Haque, M.S., Begum, S.N., and D.M. Hossain. 2014. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of chilli germplasm using microsatellite markers. *Biotechnology* 13(4): 174-180.
- Husen R., A. Hawariah, L. Pihie and M. Nallappan. 2004. Screening for antihyperglycaemic activity in several local herbs of Malaysia. *J. Ethnopharmacol.* 95: 205-208.
- Janzen, H. Daniel. 2009. A DNA barcode for land plants. *PNAS* vol.106 no.3: 12794-12797.
- Jarret, R. 2008. DNA barcoding in a crop genebank: the *Capsicum annuum* species complex. *Open Biol. J.* 1: 35-42.
- Jiang, H., Z. Xie and H.J. Koo. 2006. Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medical Zingiber species: Tools for authentication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) *Phytochemistry* 67: 1673-1685.
- Jiyavornant, T. 2001. Insecticides from *Stemonatuberosa* Lour. And *Acorus calamus* Linn. And their residues after application. Master's thesis, Chiangmai University, Thailand.
- Kaewdoungeedee, N. and T. Tanee. 2013. A molecular marker for in situ genetic resource conservation of *Capsicum annuum* var. *acuminatum* (Solanaceae). *Genet. Mol. Res.* 12(3): 3529-3539.
- Kavitha, N., Noordin, R., Chan, K.L., and S. Sasidharan. 2012. In vitro anti-Toxoplasma gondii activity of root extract/fractions of *Eurycoma longifolia* Jack. *BMC Complement. Altern. Med.* 12, 91.
- Kositrattana, W. 2009. DNABarcode. *AG-BIO.* 1(3): 14-15.
- Kress, J., and D.L. Erickson. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One*, 6: 1-10.
- Kress, W.J. and D.L. Erickson. 2008. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(8): 2761-2762.
- Kress W.J., D.J. Erickson, F.A. Jones, N.G. Swenson, R. Perez, O. Sanjur, and E. Bermingham. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(44): 18621-18626.
- Kumar, S.; G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.

- Kuo, P.C., A.G. Damu, K.H. Lee and T.S.Wu. 2004. Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Eurycoma longifolia*. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 537-544.
- Levin, R.A., Wagner, W.L., Hoch, P.C., et al. 2003. Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcl* and *ndhF* data. *Am. J. Bot.* 90: 107-115.
- Li, D-Z., Gao, L-M., Li, H-T., Wang, H., Ge, X-J., Liu, J-Q., et al. 2011. Comparative analysis of a largedataset indicates that internal transcribed spacer (*ITS*) should beincorporated into the core barcode for seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 19641–19646.
- Li, L., L.J. Xu, Y. Peng, R. Shi and P. Xiao. 2011. Comparison of greentea and four other kind of teas. *Journal of Chinese Medical Materials* 36:5–10.
- LI, M., H. CAO, P.P. BUT and P. SHAW, 2011. Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes. *Journal of Systematics and Evolution* 49 (3): 271–283.
- Lin, G., X.Z. Yang, C.P. Tang, C.Q. Ke, J.B. Zhang and Y. Ye. 2008. Antibacterial stilbenoids from the roots of *Stemonatuberosa*. *Phytochemistry* 69: 457-463.
- Liu, Y., W. Sun, C. Liu, Y. Zhang, Y. Chen, M. Song, G. Fan, X. Liu, L. Xiang and Y. Zhang. 2015. Identification of *Hippophae species* (Shaji) through DNA barcodes. *Biomed central* 10(28): 1-11.
- Malik, S. and S.B. Babbar. 2015. DNA barcode reference library for Indian medical plants of high trade volume. Retrieved June, 2016 from <https://dnabarcodes2015.org/site/wp-content/uploads/2015/09/SaloniMalik.pdf>.
- Manen, J.F., G. Barriera, P.A. Loizeau and Y. Naciri. 2010. The history of extant *Ilex* species (Aquifoliaceae): evidence of hybridization within a Miocene radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 961–977.
- Masuda, T., & Goldsmith, P. D. 2009. World Soybean Production: Area Harvested, Yield, andLong-Term Projections. *International Food and Agribusiness Management Review*, 12(4), 143-162.
- Mayer, M.S. and P.S. Soltis 1999. Intraspecific phylogeny analysis using ITS sequences: insights from studies of the *Streptanthus glandulosus* complex (Crudiferae). *Systematic Botany* 24(1): 47-61.
- Mishra, R.N. and D. Joshi. 2011. Jiao Gu Lan (*Gynostemma pentaphyllum*): The chinese-rasayan - current research scenio. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2(4): 1483-1502. www.ijrpbsonline.com
- Mohamed, A.N., J. Vejjayan and M.M. Yusoff. 2015. Review on *Eurycoma longifolia* Pharmacological and Phytochemical Properties. *J Appl Sci.* 15: 831-844.
- Nadeem, M., Muhammad, F., Anjum, Khan, A.M.R., Saed, M. and A. Riaz. 2011. Antioxidant potential of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Pak. j. food sci.* 21(14): 45-51.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

- Newmaster, S.G., M. Grguric, D. Shanmughanandhan, S. Ramalingam and S. Ragupathy. 2013. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. *BMC Med.* 11(222): 1-13.
- Qiao, C.F., Q.B. Han, Z.L. Zhao, Z.T. Wang, L.S. Xu and H.X. Xu. 2009. Sequence analysis based on ITS1 region nuclear ribosomal DNA of *Amomum villosum* and ten species of *Alpinia*. *Journal of Food and Drug Analysis* 17: 142-145.
- PajareeInthachub. 2008. Taxonomic revision on the family STEMONACEAE in Thailand. Master's Thesis, Kasetsart University, Thailand.
- Palmer, J.D. and D.B. Stein 1986. Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants. *Current Genetics* 10: 823-833.
- Palmer, J.D., Soltis, D. and Soltis, P. 1992. Large size and complex structure of mitochondria DNA in two nonflowering land plants. *Current Plant* 21: 125-129.
- Pang, X., C. Liu, L. Shi, R. Liu, D. Liang, H. Li and S.S. Cherny. 2012. Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and ITS combinations as plant DNA barcodes: A meta-analysis. *PloS One* 7(11): e48833.
- Parfitt, D.E. and M.L. Badenes, M.L. 1997. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(15): 7987-7992.
- Parveen, I., H.K. Signh., S. Raghuvanshi and U.C. Pradhan. 2011. DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species. *Molecular Ecology Resources*. Doi:10.1111/j.1775-0998.2011.03071.x. 9 pages.
- Petit, R., B. Demesure and S. Dumolin. 1998. cpDNA and mtDNA in plants. In: *Molecular tools for screening biodiversity plants and animals*. Edited by Karp, A., G. Peter and Ingram, D.S. Published by Chapman and hall, London.
- Pilli, R.A. and M.C.F. Ferreira de Oliveira. 2000. Recent progress in the chemistry of the *Stemona* alkaloids. *Natural Product Reports*. 17:117-127.
- Pilli, R.A., G.B. Rosso and M.C.F. Ferreira de Oliveira. 2005. The *Stemona* alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, (Elsevier, Amsterdam), 62: 77-173
- Pruesapan, K., S. Andrews and D.A. Simpson. 2014. An outline of Aquifoliaceae for the Flora of Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)* 42: 125.
- Pruesapan, K., S. Andrews and D.A. Simpson. 2017. *Ilex pubifructa* (Aquifoliaceae), a new species from northern Thailand. *Kew Bulletin* 72:21 DOI 10.1007/S12225-017-9692-7.
- Purukayastha, J., Alam, S.I., Gogoi, H.K. and L. Singh. 2012. *Capsicum assamicum* sp. nov. (Solanaceae), from Assam, northeastern India. *Ozean j. appl. sci.* 5: 55-66.
- Rehman S.U., K. Choe and H.H. Yoo. 2016. Review on a Traditional Herbal Medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its Traditional Uses, Chemistry, Evidence-Based Pharmacology and Toxicology. *Molecules*. 21(3): 1-31.

- Renner, S.S. and A.K. Pandey. 2013. The cucurbitaceae of India: Accepted names, synonyms, geographic distribution, and information on images and DNA sequences. *PhytoKeys* 20: 53-118.
- Ridzuan, M.A.R.M., A. Sow, A.n. Rain, A.M. Ilham and I.Zakiah. 2007. *Eurycoma longifolia* extract-artemisinin combination: parasitemia suppression of *Plasmodium yoelii* infected mice. *Trop. Biomed.* 24(1): 111-118.
- Ridley, H.N. 1922. Order XXXVIII. Ilicineae. *The Flora of Malay Peninsula* 1. Reeve & Co., Ltd. London. pp. 437-442.
- Ritland, C.E., K. Ritland and N.A. Straus. 1993. Variation in the ribosomal internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) among eight taxa of the *Mimulus guttatus* species complex. *Molecular biology and evolution* 10(6): 1273-1288.
- Rodd, T. and G. Bryant. 2007. *The Plant Finder: the right plants for every garden*. Firefly Books, NSW. 992 p.
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich. Heritability and variability in ribosome RNA genes of *Vicia faba*. *Genetics* 117: 287-295.
- Rodriguez, R., White, J.J.R., Arnold, A., and R. Redman. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182: 314–330.
- Rosa Martha and Pérez Gutiérrez. 2010. Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 4(8): 592-638.
- Rosario, L.H., Padilla, J.O.R., Martínez, D.R., Grajales, A.M., Reyes, J.A.M., Feliu, G.J.V., Van Ee, B., and D. Sirtunga. 2019. DNA barcoding of the Solanaceae family in Puerto Rico including endangered and endemic species. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 144 (5), 363–374.
- Sang, T., Crawford, D.J., and T.F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* 84: 1120–1136.
- Saunders, G.W. and H. Kucera. 2010. An evaluation of *rbcl*, *tufA*, *UPA*, *LSU* and *ITS* as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogam., Algol.* 31: 487–528.
- Seong, J.D., H.S. Suh and G.S. Chung. 1990. Characteristics, distribution and propagation methods of medicinal crop Dungkulcha (*Gynostemma pentaphyllum* M.) Characteristics, distribution and propagation methods of medicinal crop Dungkulcha (*Gynostemma pentaphyllum* M.) [1989]. The research reports of the Rural Development Administration - Upland and induced crops (Korea R.) 31(3): 57-61.
- Setoguchi, H. and I. Watanabe. 2000. International gene flow between insular endemics of *Ilex* (Aquifoliaceae) on the Bonin Islands and the Ryukyu Islands. *Am. J. Bot.* 87(6): 793-810.
- Shaw, J., E.B. Lickey, E.E. Schilling and R.L. Small. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am. J. Bot.*, 94(3): 275-288.

- Shi, L., N. Li, S. Wang, Y. Zhou, W. Huang, Y. Yang, Y. Ma and R. Zhou. 2016. Molecular Evidence for the Hybrid Origin of *Ilex dabieshanensis* (Aquifoliaceae). *PLoS ONE* 11(1): e0147825. DOI: 10.1371/journal.pone.0147825.
- Shuid, A.N., E. El-arabi, N.M. Effendy, H.S.A. Razak, N. Muhammad, N. Mohamed and I.N. Soelaiman. 2012. *Eurycoma longifolia* upregulates osteoprotegerin gene expression in androgen-deficient osteoporosis rat model. *BMC Complement Altern.Med.* 2012.12:152.
- Simonne, A.H., Simonne, E.H., Eitenmiller, R.R., Mills, H.A. and N.R. Green. 1997. Ascorbic acid and pro-vitamin A contents in unusually colored bell peppers (*Capsicum annum* L.). *J. Food Compos. Anal.* 10: 299-311.
- Sing, A., Duggal, S. 2009. Medicinal orchids: an overview, *Ethnobot Leaflets* 13: 351-363
- Siripiyasing, P., K. Kaenratana, P., Mokkamul, T. Taree, R. Sudmoon and A. Chaveeach. 2012. DNA barcoding of the *Cymbidium* species (Orchidaceae) in Thailand. *African Journal of Agriculture Research* 7(3): 393-404.
- Smitinand, T. 1958. The genus *Dipterocarpus* Gaertn.f. in Thailand. *Thai Forest Bull.* 4: 1-26.
- Solomon M.C., N. Erasmus and R.R. Henkel. 2014. In vivo Effects of *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali) Extract on Reproductive Functions in the Rat. *Andrologia.* 46: 339-348.
- Son, S.-W., J.-H. Kim, K.-J. Kim and S.-J. Park. 2009. Molecular evidence for the hybridity of *Ilex wandoensis* and the phylogenetic study of Korean *Ilex* based on ITS sequence data. *Genes and Genomics* 31(1): 53-63.
- Sosef, M.S.M, L.T. Hong and S. Prawirohatmodjo (Editors). 1998. Timber trees: Lesser-known timbers. *Plant Resources of South-East Asia* No. 5(3). Backhuys Publishers, Leiden. 859 p.
- Stuart, G.A. 1911. Chinese Materia Medica: Vegetable Kingdom. Shanghai. 588p.
- Sugiura, M., T. Hirose and M. Sugita. 1998. Evolution and mechanism of translation in chloroplast. *Annual review of genetics* 32: 437-457.
- Sun, Y-L., Choi, I-L., Lee, Y-B., Choi, K.Y., Hong, S-K., and H-M. Kang. 2014. Molecular diversity and phylogenetic analysis of *Capsicum annum* varieties using the nrDNA/ITS region. *Sci. Hortic.* 165, 336-343.
- Sun, Y., D.Z. Skinner, G.H. Liang and S.H. Hulbert. 1994. Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26-32.
- Sudmoon, R., T. Tanee, V. Wongpanich, N. Bletter and A. Chaveerach. 2012. Ethnobotany and species specific molecular markers of medicinal *sakhan* (*Piper*, Piperaceae). *Journal of Medicinal Plants Research* 6(7): 1168-1175).
- Tanee, T., Chadmuk, P., Sudmoon, R., Chaveerach, A., Noikotr, K. 2012. Genetic analysis for identification, genomic template stability in hybrids, and barcodes of the *Vanda* species (Orchidaceae) of Thailand. *J. Hort.* 11(55): 11772-11781.
- Tate, J.A., and B.B. Simpson. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Syst. Bot.* 28: 723-737.

- Tee, T.T., Y.H. Cheah and L.P.A. Hawariah. 2007. F16, A Fraction from *Eurycoma longifolia* Jack Extract, Induces Apoptosis via Caspase-9-independent Manner in MCF-7 Cells. *Anticancer Ses.* 27: 3425-3430.
- Thomson, J.D.; D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sentivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap panalties and weight metix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-80.
- Thul, S.T., Darokar, M.P., Shasany, A.K. and S.P.S. Khanuja. 2012. Molecular Profiling for Genetic Variability in *Capsicum Species* Based on ISSR and RAPD Markers. *Mol. Biotechnol.* 51: 137-147.
- USDA-ARS. 2011. Grin species records of Capsicum. National Germplasm Resources Laboratory. Beltsville, Maryland.
- Varghese, C.P., C. Ambrose, S.C. Jin, Y.J. Lim and T. Keisaban. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Eurycoma longifolia* Jack, a traditional medicinal plant in Malaysia. *Int. J. Pharm. Sc.i Nanotech.* 5(4) : 1875-1878.
- Wang, W., Y. Wu, Y. Yan, M. Ermakova, R. Kerstetter and J. Messing. 2010. DNA barcoding of the *Lemnaceae*, a family of aquatic monocots. *BMC Plant Biology* 10(205): 1-11.
- Wei Lun Ng, ShiouYih Lee & SweeKeongYeap. 2019. Characterization of the complete chloroplast genome of an important Southeast Asian medicinal plant, *Eurycoma longifolia* (Simaroubaceae), Mitochondrial DNA Part B, 4:1, 128-129, DOI: 10.1080/23802359.2018.1540263.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.) PCR Protocols: a guide to methods and applications.* Academic Press: New York, USA. pp. 315–322.
- Wiriyakarun, S., W. Yodpetch, K. Komatsu, S. Zhu, N. Ruangrunsi, and S. Sukrong. 2013. Discrimination of the Thai rejuvenating herbs *Pueraria candollei* (White Kwao Khrua), *Butea superba* (Red KwaoKhrua), and *Mucuna collettii* (Black Kwao Khrua) using PCR-RFLP. *Journal of natural medicines* 67(3): 562-570.
- Xu, S., Li, D., Li, J., Xiang, X., Jin, W., Huang, W., Jin, X., Huang, L., Liu, Z.J. 2015. Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia. *PLOS ONE.* 10(1).
- Xu, S., D. Li, J. Li, X. Xiang, W. Jin, W. Huang, X. Jin and L. Huang. 2015. Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia. *PLOS ONE*, DOI:10.1371/Journal.pone.0115168. 12 pages.
- Yang H.Q., Y.R. Dong, Z.J. Gu, N. Liang and J.B. Yang. 2012. A preliminary assessment of *matK*, *rbCL* and *trnH-psbA* as DNA barcodes for *Calamus* (Arecaceae) species in China with a note on ITS. *Annales botaniciFennici* 49(5-6): 319-330.

- Yang, M., F. Liu, Y. Han, L. Xu, N. Juntawongc and Y. Liu. 2013. Genetic diversity and structure in populations of *Nelumbo* from America, Thailand and China: Implications for conservation and breeding. *Aquatic Botany* 107: 1–7.
- Yao, P.C., H.Y. Gao, Y.N. Wei, J.H. Zhang, X.Y. Chen and H.-Q. Li. 2017. Evaluating sampling strategy for DNA barcoding study of coastal and inland halo-tolerant poaceae and chenopodiaceae: A case study for increased sample size. *PLOS ONE*. 12: e0185311. 14 pages.
- Yu, J., J. Xue and S. Zhou. 2011. New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematic and Evolution* 49(3): 176-181
- Zanolli, P., M. Zavatti, C. Montanari and M. Baraldi. 2009. Influence of *Eurycoma longifolia* on the copulatory activity of sexually sluggish and impotent male rats. *J. Ethnopharmacol.* 126: 308-313.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Tardieu-Blot, M.L. (1948). Aquifoliacées. In: H. Humbert & F. Gagnepain (eds). *Supplement a la Flore Générale de L'Indo-Chine* 6: 759–764, 7: 765–781.
- Thomson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-80.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White [eds.], *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315-322. Academic Press, Inc., New York.
- Wu, C.Y. and S.K. Chen. 1983. A study of the genus *Gynostemma* Bl. (Cucurbitaceae) from China. *Acta Phytotax. Sin.* 21: 355–369.
- Yang, Y., L. Chen and H. Peng. 2018. Clarification of the taxonomic confusion between *Ilex formosana* and *I. tetramera* (Aquifoliaceae), with the description of a new species *I. shukunii*. *Phytotaxa* 382(2): 182-192.
- Yang, X.Y., C.P. Tang and Y. Ye. 2006. Stilbenoids from *Stemona japonica*. *Journal of Asian Natural Products Research* 8: 47-3
- Yao, X., Y.-H. Tan, Y.-Y. Liu, Y. Song, J.-B. Yang and R.T. Corlett. 2016. Chloroplast genome structure in *Ilex* (Aquifoliaceae). *Scientific Reports* 6: 28559 DOI: 10.1038/srep28559.
- Yi, F., L. Sun, D.-C. Hao, Y. Peng, F.-M. Han and P.-G. Xiao. 2017. Complex phylogenetic placement of *Ilex* species (Aquifoliaceae): a case study of molecular phylogeny. *Pak. J. Bot.* 49(1): 215-225.

กรมวิชาการเกษตร