ระดับโครงการ

กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน(Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

ความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ

Biodiversity and DNA Barcoding of Economically Efficient Crops

อัญชลี แก้วดวง

Anchalee Kaewdoung

พ.ศ. 2565

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัย ความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ

Biodiversity and DNA Barcoding of Economically Efficient Crops

ชื่อคณะผู้วิจัย		
หัวหน้าโครงการ	1. นางอัญชลี แก้วดวง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมโครงการ	2. นางสาวกาญจนา พฤษพันธ์	สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช
	3. นายธีรวุฒิ ชุตินันทกุล	สถาบันวิจัยพืชสวน
	4. นางสาวอรุโณทัย ซาววา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	5. นายธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	6. นายธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์	ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น
	7. นางสาวจุฑามาส ฟักทองพรรณ	กองเมล็ดพันธุ์พืช
	8. นางสาวสุกัลยา ศิริฟองนุกูล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	9. นางสาวกุหลาบ คงทอง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	10. นางบุญเรือนรัตน์ เพียรงาน	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	11. นางกัญญาภรณ์ พิพิธแสงจันทร์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	12. นางสาวอภิญญา วงศ์เปี้ย	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	13. นางสาวพัฒน์นรี รักษ์คิด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	14. นายประสานสืบสุข	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	15. นายสมคิด ดำน้อย	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย
	16. นางวิลาวัณย์ ใคร่ครวญ	สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช
	17. นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	สถาบันวิจัยพืชสวน
	18. นางสาวอรวินทินี ชูศรี	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
	19. นางสาวปาจรีย์ อินทะชุบ	สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช
	20. นายอรรถพล รุกขพันธ์	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง
	21. นางสาวสุดใจ ล้อเจริญ	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ
	22. นางสุภาภรณ์ สาชาติ	สถาบันวิจัยพืชสวน
	23. นางสุวลักษณ์ อะมะวัลย์	ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
	24. นางประพิศ วองเทียม	สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน
	25. นางศศิธร วรปิติรังสี	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
	26. นางอ้อยทิน ผลพานิช	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่
	27.นายบุญชนะ วงศ์ชนะ	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
	28. นางชญานุช ตรีพันธ์	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง
	29. นางสาวมาลัยพร เชื้อบัณฑิต	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี

กรมวิชาการเกษตร

งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 จำนวน 1,597,553 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย ตั้งแต่ ตุลาคม 2560 ถึง ธันวาคม 2564

สรุปโครงการวิจัย

ความหลากหลายของพันธุ์พืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจของไทยมีสูงมาก เมื่อพิจารณาลำดับความสำคัญ พบว่า ความหลากหลายของพันธุ์พืชสวนที่ควรมีการศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในอันดับต้นๆ ประกอบด้วย ทุเรียน เงาะ บัว กล้วยไม้สมุนไพร และพริก พันธุ์พืชไร่ ประกอบด้วย มันสำปะหลัง และถั่วเหลือง ส่วนพันธุ์พืชท้องถิ่น ประกอบด้วย พืชวงศ์ศิลา (Aquifoliaceae) ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ กรมวิชาการเกษตรจึงได้จัดทำโครงการวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจขึ้นมา

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. สำรวจ รวบรวมความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชสวน (ทุเรียน เงาะ บัว พริก กล้วยไม้) พืชไร่ (มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง) และพืชท้องถิ่น (พืชวงศ์ศิลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ)

2. ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสวน (ทุเรียน เงาะ บัว พริก กล้วยไม้)พืชไร่(มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง) และพืชท้องถิ่น(พืชวงศ์ศิลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ)

3. จัดเก็บเชื้อพันธุกรรมของทุเรียน เงาะ บัว พริก กล้วยไม้ มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง พืชวงศ์ศิลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ เพื่ออนุรักษ์และเก็บรักษาในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชในสภาพ เมล็ดพันธุ์ (Seed bank) แปลงปลูก และธนาคารดีเอ็นเอ (DNA bank)

4. จัดทำฐานข้อมูล ประกอบด้วย ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด ข้อมูลพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย ข้อมูลเชิงวิชาการ (ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ประวัติพืชภูมิปัญญาพื้นบ้าน) และข้อมูลเชิงเศรษฐกิจ

ระเบียบวิธีวิจัย

จัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสวน (ทุเรียน เงาะ บัว พริก กล้วยไม้) พืชไร่ (มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง) และพืชท้องถิ่น (พืชวงศ์ศิลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ) โดยมีการจัดทำตัวอย่างอ้างอิงงานวิจัย (Voucher specimen) เพื่อเก็บรักษาไว้เป็นฐานข้อมูลในรูปพรรณไม้แห้งในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพและตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิงเก็บรักษาไว้ในธนาคารดีเอ็นเอของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะนำยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส มาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาความหลากหลายและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ศึกษาแนวทางการจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ รวมถึงทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะของดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อชนิดหรือสายพันธุ์พืช นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปลงทะเบียนในฐานข้อมูล NCBI เพื่อนำหมายเลข accession มาประกอบในการจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชต่อไป

ผลการวิจัย

1. เก็บรวบรวมความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชสวน จำนวน 5 พืช ได้แก่ ทุเรียน, เงาะ, บัว, กล้วยไม้สมุนไพร และพริก ได้ตัวอย่างพันธุ์พืชจำนวน 169, 36, 34, 40 และ 84 ตัวอย่าง ตามลำดับ;พันธุ์พืชไร่ จำนวน 2 พืช ได้แก่ มันสำปะหลัง และถั่วเหลือง ได้ตัวอย่างพันธุ์พืชจำนวน 17 และ 40 ตัวอย่าง ตามลำดับ; และพืชท้องถิ่น จำนวน 5 พืช ได้แก่ พืชวงศ์ศิลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ ได้ตัวอย่างพันธุ์พืชจำนวน 19, 20, 63, 40 และ 16ตัวอย่าง ตามลำดับ พร้อม

กรมวิชาการเกษตร

จัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของทุเรียน, เงาะ, บัว, พริก, มันสำปะหลัง, ถั่วเหลือง, พืชวงศ์ศิลา, ปัญจขันธ์, 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 *rpocL*; พืชวงศ์ศิลามี 4 ยีน คือ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*และ ITS;พันธุ์ปัญจขันธ์มี 4 ยีน คือ *accD*, *petD*, *psbB*และ *ycf3*; พืชสกุลปลาไหลเผือกมี *rbcL*, *rpoC* และ ITS; พืชสกุลหนอนตายหยากมี *psb*A-*trnH*,*mat*K และ *rbcL*; และพันธุ์สะตอมี 2 ยีน คือ *matK* และ *ITS*

3. จัดเก็บเชื้อพันธุกรรมดีเอ็นเอของทุเรียนได้ 145 ตัวอย่าง, เงาะ 34 ตัวอย่าง, บัว 162 ตัวอย่าง, กล้วยไม้ 39 ตัวอย่าง, พริก 84 ตัวอย่าง, มันสำปะหลัง 17 ตัวอย่าง, ถั่วเหลือง 40 ตัวอย่าง, พืชวงศ์ศิลา 19 ตัวอย่าง,พันธุ์ปัญจขันธ์ 20 ตัวอย่าง, พืชสกุลปลาไหลเผือก 63 ตัวอย่าง, พืชสกุลหนอนตายหยาก 35 ตัวอย่าง และสะตอ 16 ตัวอย่าง และเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชได้ 2 พืช คือ พริก 84 ตัวอย่าง และถั่วเหลือง 59 ตัวอย่าง

4. จัดทำฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของทุเรียนได้ 145 ข้อมูลพันธุ์พืช, เงาะได้ 34 ข้อมูลพันธุ์พืช, บัวได้ 34 ข้อมูลพันธุ์พืช, กล้วยไม้สมุนไพรได้ 39 ข้อมูลพันธุ์พืช, พริกได้ 71 ข้อมูลพันธุ์พืช, มันสำปะหลังได้17 ข้อมูลพันธุ์พืช, ถั่วเหลืองได้ 40 ข้อมูลพันธุ์พืช, พืชวงศ์ศิลาได้ 14 ข้อมูลชนิดพืช, ปัญจขันธ์ได้ 20 ข้อมูลพันธุ์พืช, พืชสกุลปลาไหลเผือกได้ 2 ข้อมูลชนิดพืช, พืชสกุลหนอนตายหยากได้ 6 ข้อมูลชนิดพืช และสะตอได้ 2 ข้อมูลพันธุ์พืช;และฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของทุเรียนได้ 270 ข้อมูล, เงาะได้ 187 ข้อมูล, บัวได้ 392 ข้อมูล, กล้วยไม้สมุนไพรได้ 80 ข้อมูล, พริกได้ 217 ข้อมูล, มันสำปะหลังได้68 ข้อมูล, ถั่วเหลืองได้ 120 ข้อมูล, พืชวงศ์ศิลาได้ 54 ข้อมูล, ปัญจขันธ์ได้ 78 ข้อมูล, พืชสกุลปลาไหลเผือกได้ 82 ข้อมูล, พืชสกุลหนอนตาย หยากได้ 51 ข้อมูล และสะตอได้ 64 ข้อมูล

ประโยชน์ที่ได้รับจากผลงานวิจัย

1. สามารถนำข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืช ไปใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์และคุ้มครองพันธุ์พืชไทย

2. นำผลงานวิจัยด้านวิชาการไปใช้ประโยชน์โดยการนำผลงานวิจัยไปเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการ และตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสาร

กลุ่มเป้าหมายที่นำผลงานไปใช้ประโยชน์

นักวิชาการเกษตร นักวิจัย นักปรับปรุงพันธุ์พืช เกษตรกร

ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

จากการศึกษาวิจัยของโครงการวิจัยในภาพรวม การสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีศักยภาพในการจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานในพืชแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามแม้ว่าพันธุกรรมพืชจะมีผลโดยตรงต่อลักษณะการแสดงออกของพืช (phenotype) สภาพแวดล้อมในการเพาะปลูกก็เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญมีผลต่อการแสดงออกด้วยเช่นกัน การจำแนกพันธุ์พืชด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงบริเวณใดบริเวณหนึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการจำแนกพันธุ์พืช เนื่องจากตำแหน่งนั้นมีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ต่ำ และลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่งนั้นมีขนาดเล็กมาก

กรมวิชาการเกษตร

(genome size) เมื่อเทียบกับขนาดของจีโนมพืช มีผลทำให้ตำแหน่งดังกล่าวไม่สามารถแยกความแตกต่างของพืชในระดับพันธุ์ได้ ดังนั้น การเพิ่มยีนที่มีความผันแปรสูง หรือศึกษาพืชทั้งจีโนม รวมทั้งการวิเคราะห์พืชด้วยเทคนิคใหม่ๆ จะสามารถช่วยยืนยันความแตกต่างของพันธุ์พืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจเหล่านี้ได้

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 พืชวงศ์ศิลา 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 สามารถเก็บรวมรวมตัวอย่างพันธุกรรมของพืชทั้ง 12 กลุ่มพืช ไว้ในรูปดีเอ็นเออ้างอิงได้จำนวน 578 ตัวอย่าง โดยพบว่า ยีนตำแหน่ง ITS เหมาะสมจะใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกกลุ่มพันธุ์ของพันธุ์พืชได้มากที่สุดถึง 9 กลุ่มพืช รองลงมา คือ *rbcL*, *matK* และ *trnH-psbA* ได้ 7, 6 และ 4 กลุ่มพืช ตามลำดับ ส่วน *DuBc04*, *rpoC*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF, accD*, *petD*, *psbB* และ *ycf3* แสดงผลการจำแนกทางพันธุกรรมได้เฉพาะบางพืช ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพันธุ์พืชทั้ง 12 กลุ่มพืช จำนวน 1,663 ข้อมูลนี้ ถือเป็นข้อมูลพันธุกรรมใหม่ของพืชมีศักยภาพทางเศรษฐกิจของไทยที่ได้บันทึกไว้บนระบบข้อมูลสากลของ NCBI และสามารถสืบค้นข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของพืชเชื่อมโยงไปยังตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชระดับชาติ จำนวน 516 ตัวอย่าง รวมถึงสามารถทดสอบเชื้อพันธุกรรมเมล็ดของพริกและถั่วเหลืองที่เก็บรวบรวมไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชอีก 143 ตัวอย่าง ซึ่งข้อมูลพันธุ์พืชเหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของพันธุ์ในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์พืชของไทยต่อไป โดยได้บันทึกข้อมูล ความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชทั้ง 12 พืชที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ไว้ จำนวน 424 ข้อมูลพืช เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับสนับสนุนการบังคับใช้กฎหมาย การเข้าถึงและการแบ่งปันผลประโยชน์จากการใช้ทรัพยากรพันธุกรรมพืชของประเทศไทยต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

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 *Parkiaspeciosa*. 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 andUnweighted 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.

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ขอขอบคุณนักวิจัยทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือด้วยดีเสมอมา ขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่ให้การสนับสนุนห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการทดลองวิจัย ขอขอบคุณสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บรักษาตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งอ้างอิง ขอขอบคุณศูนย์วิจัยสวนจันทบุรี ศูนย์วิจัยสวนตรัง ศูนย์วิจัยสวนศรีสะเกษ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงราย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกระบี่ กรมวิชาการเกษตร ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างทุเรียน เงาะ สะตอ บัวมันสำปะหลัง ถั่วเหลือง และปลาไหลเผือก ขอขอบคุณในความอนุเคราะห์ของ ดร. สมราน สุดดี, ดร. วรดลต์แจ่มจำรูญ, นายวิโรจน์ ตันธนาภินันท์, นายมีศักดิ์ แก้วกูล, นางสาวจิราภรณ์ มีวาสนา, นางสาวนันท์นภัส ภัทรหิรัญไตรสิน, นายสุคิด เรืองเรื่อ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ดร. สรายุทธบุณยะเวชชีวิน หัวหน้าโครงการวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ระยะยาว, นายพรหมพิริยะ คีรีวงศ์ ในการการเก็บข้อมูลพืชวงศ์ศิลา ขอขอบคุณนายวัชรพล บำเพ็ญอยู่ และนางแจ่มนภา คุ้มฝัน ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย กรมวิชาการเกษตร ในการเก็บข้อมูลพืชปัญจขันธ์ ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย นายฉลาด ไหวติง และนางสาวศุภรัสมิ์ พูลพัฒนสุวรรณ ที่ช่วยดำเนินงานวิจัยทั้งในส่วนของห้องปฏิบัติการและภาคสนาม เป็นอย่างดี และสุดท้ายขอขอบคุณนางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษ์พันธุกรรม ที่ให้คำปรึกษาข้อมูลวิจัยและช่วยตรวจแก้ไขจนงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	6
Abstract	7
กิตติกรรมประกาศ	8
สารบัญ	9
สารบัญภาพ	10
สารบัญตาราง	14
บทที่ 1 บทนำ	15
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	19
บทที่ 3 ผลการศึกษา	21
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	116
เอกสารอ้างอิง	120
ภาคผนวก	122

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
กิจกรรมที่ 1		
1.1.1	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีน matK413 และ rbcLA ในการเป็น DNA barcode ของทุเรียนต่างชนิด	22
1.1.2	แผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเทคนิค GBS จากการวิเคราะห์ทุเรียน จำนวน 13 พันธุ์	22
1.1.3	ผลผลิตของพีซีอาร์ของทุเรียน 120 ตัวอย่าง ที่ทำให้บริสุทธิ์ ก่อนทำการส่งวิเคราะห์จากการใช้ไพรเมอร์ของยีน DuBc04	25
1.1.4	ผลผลิตของพีซีอาร์ของทุเรียน 150 ตัวอย่าง ที่ทำให้บริสุทธิ์ ก่อนทำการส่งวิเคราะห์จากการใช้ไพรเมอร์ของยีน ITS2-S2F	26
1.1.5	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างทุเรียน จำนวน 120 ตัวอย่าง จากยีน *DuBC04*	27
1.1.6	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างทุเรียน จำนวน 150 ตัวอย่าง จากยีน *ITS2*	28
1.1.7	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DuBC04*ตัวอย่างทุเรียนด้วยโปรแกรม MEGAx	29
1.1.8	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2*ตัวอย่างทุเรียนด้วยโปรแกรม MEGAx	29
1.2.1	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน MatK1R ในการเป็น DNA barcode ของเงาะ	31
1.2.2	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน rbcLA ในการเป็น DNA barcode ของเงาะ	32
1.2.3	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน rbcL ในการเป็น DNA barcode ของเงาะ	33
1.2.4	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน psbA ในการเป็น DNA barcode ของเงาะ	34
1.2.5	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน rpoC ในการเป็น DNA barcode ของเงาะ	35
1.2.6	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน trnL ในการเป็น DNA barcode ของเงาะ	36
1.3.1	ดีเอ็นเอจากใบบัวจำนวน 34 ตัวอย่าง ที่สกัดโดยวิธี CTAB บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์	37
1.3.2	ผลผลิตพีซีอาร์ก่อนการทำบริสุทธิ์ จากคู่ไพรเมอร์ ITSu1+ITSu4 rpoC1F+rpoC1R rbcL_F+ rbcL_R rpo2 และ matK_1F+ matK_1R บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์	37
1.3.3	แถบดีเอ็นเอจากยีน *ITS, matK, rpoC1*และ *RbcL* ที่ผ่านการทำบริสุทธ์ก่อนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์	38
1.3.4	ภาพลักษณะ Chromatogram ที่นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด	39
1.3.5	ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของบัวสาย (*Nymphaea lotus*) จากยีน *ITS matK RbcL* และ *rpoC1* ที่ผ่านการตรวจสอบและคัดเลือก มีขนาดความยาว 503 600 615 และ 391 คู่เบส ตามลำดับ	40
1.3.6	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 34 ตัวอย่าง จากยีน *ITS* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ	41
1.3.7	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 34 ตัวอย่างจากยีน *MatK* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ	43
1.3.8	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 34 ตัวอย่างจากยีน *RbcL* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ	45

ศูนย์วิทยทรัพยากร

1.3.9 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 34 ตัวอย่างจากยีน *RpoC1* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ 47
1.3.10 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 162 ตัวอย่าง จากยีน *ITS* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ 51
1.3.11 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*ตัวอย่างบัวหลวงด้วยโปรแกรม MEGAx 52
1.3.12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*ตัวอย่างบัวสายด้วยโปรแกรม MEGAx 52
1.3.13 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของตัวอย่างบัว จำนวน 162 ตัวอย่าง จากยีน*RpoC1*ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ 53
1.3.14 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*ตัวอย่างบัวหลวงด้วยโปรแกรม MEGAx 54
1.3.15 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*ตัวอย่างบัวหลวงด้วยโปรแกรม MEGAx 54
1.5.1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพริกในประเทศไทยที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *ITS* 57
1.5.2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพริกในประเทศไทยที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *rbcL* 58
1.5.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพริกในประเทศไทยที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *trnH-psbA* 59
1.5.4 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม (haplotype diversity) ของยีนตำแหน่ง*ITS* ของพริกในประเทศไทย 60

กิจกรรมที่ 2

2.1.1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจำนวน 120 พันธุ์และยางพาราเป็นตัวอย่างนอกกลุ่มจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2*วิเคราะห์โดยโปรแกรม MEGA ด้วยวิธีNeighbor-joining โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 ซ้ำ 64
2.2.1 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งถั่วเหลืองที่ดำเนินการจัดทำ จำนวน 40 สายพันธุ์/พันธุ์ โดยเก็บรักษา ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ 65
2.2.2 ตัวอย่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน ITS, rbcLaของถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่าง ๆ 66
2.2.3 ตัวอย่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของrbcLและ trnHf+psbA3 ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่าง ๆ 67

กิจกรรมที่ 3

3.1.1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* 70
3.1.2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* 71
3.1.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF* 72
3.1.4 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดร่วมกันของบริเวณคลอโรพลาสต์ (*matK+ rpl32-trnL + trnL-trnF*) 73
3.1.5 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณนิวเคลียร์ ITS 74
3.2.1 ลักษณะสัณฐานร่วมของปัญจขันธ์ 78
3.2.2 ลักษณะสัณฐานของเมล็ดปัญจขันธ์ 79
3.2.3 แสดงประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ของปัญจขันธ์ 20 สายพันธุ์ด้วยยีน *accD*, *petD*, *psbB*และ *ycf3* 80
3.2.4 แผนภูมิ Maximum Likelihood (ML Phylogram) แสดงความสัมพันธ์ของ *Gynostemma* spp. ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอของยีน *accD* (A) และยีน *petD* (B) 81

กรมวิชาการเกษตร

3.2.5	แผนภูมิ Maximum Likelihood (ML Phylogram) แสดงความสัมพันธ์ของ *Gynostemma* spp. ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอของยีน *psbB* (A) และยีน *ycf3* (B)	82
3.2.6	แผนภูมิ Maximum Likelihood (ML concensus tree) แสดงความสัมพันธ์ของ *Gynostemma* spp. ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอร่วมของยีน *accD*, *petD*, *psb*และ*ycf3*	83
3.3.1	แสดงลักษณะต้น (ก, ข) ใบ (ค) ดอก (ง, จ, ฉ) ผลอ่อน (ช) ผลแก่ (ซ) และราก(ฌ) ของปลาไหลเผือก *Eurycoma longifolia* Jack	87
3.3.2	แสดงลักษณะต้น และ ใบ ของปลาไหลเผือกน้อย *Eurycoma harmandiana* Pierre	88
3.3.3	ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของปลาไหลเผือก *E. longifolia*ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	92
3.3.4	ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของปลาไหลเผือก *E. harmandiana*ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	93
3.3.5	แสดงความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาไหลเผือกบริเวณ *rbcL*	94
3.3.6	แสดงบริเวณที่ไม่มีความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาไหลเผือกบริเวณ *rpoC*	95
3.3.7	แสดงตัวอย่างตำแหน่งที่มีความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกบริเวณ ITS	96
3.3.8	UPGMA bootstrap consensus tree แสดงการการจัดกลุ่มของปลาไหลเผือกบริเวณ ITS: เส้นดำหนาแสดง clade ของ Ingroups และ clade ที่มีค่า bootstrap support มากกว่า 50%	99
3.4.1	พืชสมุนไพรหนอนตายหยากที่รวบรวมปลูกอนุรักษ์ไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช	100
3.4.2	ตัวอย่างพรรณไม้แห้งผ่านกระบวนการรักษาสภาพและทำเป็นพรรณไม้อ้างอิง (Voucher specimen) จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ	103
3.4.3	ภาพลักษณะโครมาโตแกรม (Chromatogram) ที่นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด	105
3.4.4	แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก จากยีนบริเวณ *psb*A-*trn*H วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA7 ด้วยวิธี Maximum Likelihood กำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates	106
3.4.5	แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก จากยีน *mat*Kวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA7 ด้วยวิธี Maximum Likelihood กำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates	107
3.4.6	แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างพืชสมุนไพรหนอนตายหยากจากยีน *rbc*Lวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA7 ด้วยวิธี Maximum Likelihood กำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates	108
3.5.1	ตัวอย่างสะตอและการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง	110
3.5.2	ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง สะตอ ที่ทำการปลูกรวบรวมพันธุ์ ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ต. ไม้ฝาด อ.สิเกา จ. ตรัง นำมาลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ	111
3.5.3	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างสะตอ จำนวน 16 ตัวอย่าง จากยีน MatK ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx	112
3.5.4	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างสะตอ จำนวน 16 ตัวอย่าง จากยีน ITS ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx	113

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
กิจกรรมที่ 1		
1.1.1	ค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากเทคนิค GBS จากการวิเคราะห์ทุเรียน จำนวน 13 พันธุ์	22
1.3.1	ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรม ของยีน ITS ในบัวจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx	42
1.3.2	ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรม ของยีน *RbcL* ในบัวจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx	44
1.3.3	ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรม ของยีน *RpoC1* ในบัวจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx	46
1.3.4	ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรม ของยีน *MatK* ในบัวจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx	48
1.3.5	รูปแบบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์	49
1.5.1	แสดงร้อยละความสำเร็จของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดแต่ละตำแหน่ง	55
กิจกรรมที่ 2		
2.1.1	หมายเลขอ้างอิงพรรณไม้แห้ง และหมายเลขเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK และ ITS2* ของมันสำปะหลัง 17 พันธุ์	61
กิจกรรมที่ 3		
3.1.1	ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	68
3.1.2	องค์ประกอบของสารเคมีในปฏิกริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส	69
3.1.3	สภาวะเริ่มต้นของปฏิกริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส	69
3.1.4	ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงและดีเอ็นเออ้างอิงของพืชวงศ์ศิลา (Aquifoliaceae) ที่ศึกษาใหม่	75
3.2.1	แสดงลักษณะสัณฐานส่วนใบของปัญจขันธ์ที่มีอายุ 4 เดือน จำนวน 20 พันธุ์	76
3.2.2	รายชื่อปัญจขันธ์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้และรายละเอียดของตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย	83
3.3.1	แสดงตัวอย่างปลาไหลเผือก ที่สำรวจและเก็บรวบรวมในเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณของประเทศไทย	85
3.3.2	ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของปลาไหลเผือก จำนวน 43 ตัวอย่าง ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร	89
3.3.3	แสดงรูปแบบการกลายที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกบริเวณ ITS	96
3.5.1	ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของสะตอ จำนวน 16 ตัวอย่าง ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ	109

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 1บทนำ

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

<u>วิสัยทัศน์</u>

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

<u>พันธกิจ</u>

1. สร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยด้านพืชและเครื่องจักรกลการเกษตร สู่กลุ่มเป้าหมาย
2. กำหนดและกำกับดูแลมาตรฐานระบบการผลิตและผลิตพันธุ์พืชและปัจจัยการผลิต พัฒนาระบบตรวจรับรองสินค้าการเกษตรด้านพืชให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล
3. อนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืช แมลง และจุลินทรีย์
4. กำกับ ดูแล และพัฒนากฎหมายที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ

2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคง
เพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ

☑ ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน
เน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์
คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษและภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคม
สร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคม เพิ่มโอกาสให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
คำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ
การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”

3.วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 และโปรดระบุแผนงาน/โครงการให้สอดคล้องกับโปรแกรมของแผน ววน.

โปรแกรมตามแผน ววน.	งบประมาณ(บาท)
โปรแกรม2.7 ใช้ความรู้ การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อจัดการกับปัญหาท้าทายเร่งด่วนสำคัญของประเทศในด้านทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม การเกษตรและบรรลุเป้าหมายการพัฒนาที่ยั่งยืน	1,597,553

กรมวิชาการเกษตร

4.รายละเอียดโครงการ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

ประเทศไทยมีความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมพืชสูงระดับต้นๆ ของโลก แต่ในยุคปัจจุบัน เกษตรกรส่วนมากได้ปรับเปลี่ยนวิถีการปลูกพืชโดยมุ่งเน้นการปลูกสายพันธุ์การค้าตามความต้องการของตลาด ทำให้พันธุ์พืชที่มีการหมุนเวียนใช้ประโยชน์ในประเทศมีความหลากหลายน้อยลง สายพันธุ์พืชที่มีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ไว้มากมาย หรือแม้แต่พันธุ์พืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจกลับถูกละเลยที่จะนำมาพัฒนาต่อยอด อีกทั้งไม่มีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจเหล่านี้อย่างต่อเนื่องเป็นระบบ ทำให้พันธุ์พืชบางสายพันธุ์สูญหายไป การคุ้มครองสายพันธุ์พืชที่มีลักษณะดีและให้ผลผลิตสูงยังไม่ครอบคลุมทำให้มีการปลอมสายพันธุ์ ซึ่งยากในการตรวจสอบเพราะการจำแนกสายพันธุ์ของพันธุ์พืชเหล่านั้นยังไม่ชัดเจน การตรวจสอบพันธุ์พืชของไทยด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดซึ่งสะดวก รวดเร็ว และมีความน่าเชื่อถือยังมีการศึกษาน้อยและเข้าถึงได้ยาก ในขณะที่ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพันธุกรรมพืชไทยมีความสำคัญอย่างยิ่งในการใช้จำแนกพันธุ์พืชเพื่อสนับสนุน การบังคับใช้กฎหมาย การเข้าถึงและการแบ่งปันผลประโยชน์จากการใช้ทรัพยากรพันธุกรรมพืชของประเทศไทย ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ของหน่วยงานในการบริหารจัดการทรัพยากรการเกษตรและสิ่งแวดล้อมอย่างสมดุลและยั่งยืน และการสร้างความเป็นเลิศในการเป็นศูนย์กลางความหลากหลายทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ในการพัฒนาเศรษฐกิจชีวภาพ

เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เป็นการใช้ลำดับเบสสายสั้น (400-800 คู่เบส)บริเวณหนึ่งๆ ในจีโนมที่มีลำดับเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดทำให้สามารถใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ เป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยใช้หลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในส่วนของดีเอ็นเอมาตรฐาน (standardized DNA) แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว (Casiraghi*et al*., 2010) วิธีนี้นอกจากจะใช้ตรวจพิสูจน์และยืนยันการระบุชนิดพืชได้ถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือแล้ว ยังสามารถศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชอีกด้วยซึ่งดีเอ็นเอของจีโนมคลอโรพลาสต์และนิวเคลียสถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจพิสูจน์และยืนยันการระบุพืชในระดับชนิดหรือแม้แต่ในระดับต่ำกว่าชนิดจนถึงระดับสายพันธุ์ (Kress and Erickson, 2008; Roger and Bendich, 1987; Ritland*et al*., 1993) สำหรับการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชนั้น นิยมใช้ยีนจากหลายตำแหน่งด้วยกันโดยสามารถคัดเลือกมาใช้ตามความจำเพาะของพืชที่ต้องการศึกษา

ความหลากหลายของพันธุ์พืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจของไทยมีสูงมาก เมื่อพิจารณาลำดับความสำคัญ พบว่า ความหลากหลายของพันธุ์พืชสวนที่ควรมีการศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในอันดับต้นๆ ประกอบด้วย ทุเรียน เงาะ บัว กล้วยไม้สมุนไพร และพริก พันธุ์พืชไร่ ประกอบด้วย มันสำปะหลัง และถั่วเหลือง ส่วนพันธุ์พืชท้องถิ่น ประกอบด้วย พืชวงศ์ศิลา (Aquifoliaceae) ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ โครงการวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจจึงได้ดำเนินการโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) สำรวจ รวบรวมความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชสวน พันธุ์พืชไร่ และพันธุ์พืชท้องถิ่นทั้ง 12 พืชข้างต้น; 2) ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์พืชสวน พันธุ์พืชไร่ และพันธุ์พืชท้องถิ่นทั้ง 12 พืช; 3) จัดเก็บเชื้อพันธุกรรมของพันธุ์พืชสวน พันธุ์พืชไร่ และพันธุ์พืชท้องถิ่นทั้ง 12 พืช เพื่ออนุรักษ์และเก็บรักษาในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชในสภาพ เมล็ดพันธุ์ (Seed bank) แปลงปลูก และธนาคารดีเอ็นเอ (DNA bank) และ 4) จัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดและข้อมูลพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัยของพันธุ์พืชสวน พันธุ์พืชไร่ และพันธุ์พืชท้องถิ่นทั้ง 12 พืช

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1)สำรวจ รวบรวมความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชสวน (ทุเรียน เงาะ บัว พริก กล้วยไม้) พืชไร่ (มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง) และพืชท้องถิ่น (พืชวงศ์ศิลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ)

กรมวิชาการเกษตร

2) ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสวน (ทุเรียน เงาะ บัว พริก กล้วยไม้) พืชไร่ (มันสำปะหลังถั่วเหลือง) และพืชท้องถิ่น (พืชวงศ์ศิลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ)

3) จัดเก็บเชื้อพันธุกรรมของ ทุเรียน เงาะ บัว พริก กล้วยไม้ มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง พืชวงศ์ศิลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือกหนอนตายหยาก และสะตอ เพื่ออนุรักษ์และเก็บรักษาในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชในสภาพ เมล็ดพันธุ์ (Seed bank) แปลงปลูก และธนาคารดีเอ็นเอ (DNA bank)

4) จัดทำฐานข้อมูล ประกอบด้วย ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด ข้อมูลพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย ข้อมูลเชิงวิชาการ (ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ประวัติพืช ภูมิปัญญาพื้นบ้าน) และข้อมูลเชิงเศรษฐกิจ

ขอบเขตการศึกษา

จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสวน (ทุเรียน เงาะ บัวพริก กล้วยไม้) พืชไร่ (มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง) และพืชท้องถิ่น (พืชวงศ์ศิลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือกหนอนตายหยากและสะตอ) โดยมีการจัดทำตัวอย่างอ้างอิงงานวิจัย (Voucher specimen) เพื่อเก็บรักษาไว้เป็นฐานข้อมูลในรูปพรรณไม้แห้งในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพและตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิงเก็บรักษาไว้ในธนาคารดีเอ็นเอของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะนำยีนในส่วนของคลอโรพลาสและนิวเคลียร์ มาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ศึกษาแนวทางการจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ รวมถึงทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะของดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อชนิดหรือสายพันธุ์พืช เพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์การปรับปรุงพันธุ์และการตรวจสอบพันธุ์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปลงทะเบียนในฐานข้อมูล NCBI เพื่อนำหมายเลข accession มาประกอบในการจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชต่อไป

นิยามศัพท์

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode)หมายถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้น ที่มีความจำเพาะกับพืชในระดับสกุลและชนิด

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

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) หมายถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สิ่งมีชีวิตแต่ละชีวิตได้รับการถ่ายทอดมาจากรุ่นพ่อแม่และส่งต่อไปยังรุ่นต่อไป เช่น ลักษณะความหลากหลายของลวดลายและสีของหอยทาก ลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายทอดนั้นผ่านทางยีน ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งส่งผลให้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันไปตามยีนที่ได้รับการถ่ายทอดมา

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

1.วิธีการดำเนินการวิจัย

โครงการความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ ได้ดำเนินการวิจัยตั้งแต่ปี 2561-2564 ประกอบด้วย 3 กิจกรรม 12 การทดลอง ดังนี้

กิจกรรมที่ 1ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสวน(Diversity and DNA Barcode of Horticultural Plants)

การทดลองที่ 1.1 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียน (ดำเนินการปี 2561-2564)

การทดลองที่ 1.2 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ (ดำเนินการปี 2562-2563)

การทดลองที่ 1.3 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัว (ดำเนินการปี 2561-2563)

การทดลองที่ 1.4 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของพืชวงศ์กล้วยไม้ที่มีศักยภาพเป็นพืชสมุนไพร (ดำเนินการปี 2563-2564)

การทดลองที่ 1.5 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริก (ดำเนินการปี 2563-2564)

กิจกรรมที่ 2ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชไร่(Diversity and DNA Barcode of Agronomic Plants)

การทดลองที่ 2.1 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายของพันธุกรรมของมันสำปะหลัง (ดำเนินการปี 2561-2563)

การทดลองที่ 2.2 การสร้างข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลือง (ดำเนินการปี 2561-2562)

กิจกรรมที่ 3ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชท้องถิ่น(Diversity and DNA Barcode of Indigenous Plants)

การทดลองที่ 3.1 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์ศิลา (Aquifoliaceae) (ดำเนินการปี 2561-2562)

การทดลองที่ 3.2 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปัญจขันธ์(*Gynostemmapentaphyllum* (Thunb.) Makino) พันธุ์พื้นเมืองและลูกผสม (ดำเนินการปี 2563-2564)

การทดลองที่ 3.3 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุลปลาไหลเผือก (ดำเนินการปี 2562-2563)

การทดลองที่ 3.4 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดสมุนไพรเพื่อการอนุรักษ์ : หนอนตายหยาก (ดำเนินการปี 2563-2564)

การทดลองที่ 3.5 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสะตอ (ดำเนินการปี 2563-2564)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างพืชและจัดทำตัวอย่างอ้างอิง

-สำรวจ รวบรวมความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทยของพันธุ์พืชสวนจำนวน5 พืช ประกอบด้วย ทุเรียน เงาะ บัว พริก กล้วยไม้ พันธุ์พืชไร่จำนวน 2 พืช ประกอบด้วย มันสำปะหลัง และถั่วเหลือง พันธุ์พืชท้องถิ่นจำนวน 5 พืช ประกอบด้วย พืชวงศ์ศิลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ จากแหล่งกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติ และแปลงรวบรวมพันธุกรรมพืช ได้แก่ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกระบี่

-ตัวอย่างพืชที่ได้จากการสำรวจนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐาน จัดทำพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัยเพื่อเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ และใช้ศึกษาดีเอ็นเอของพืชนั้นๆ และเก็บเป็นดีเอ็นเออ้างอิงไว้ในธนาคารดีเอ็นเอ ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

2. ศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืช

กรมวิชาการเกษตร

-สกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของพืชและคัดเลือกไพรเมอร์สากลที่จำเพาะสูงกับดีเอ็นเอมาตรฐานของบริเวณคลอโรพลาสและนิวเคลียส เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนเป้าหมายและหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

-เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

-ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยฟรีโปรแกรม Bioeditหรืออื่นๆ และวิเคราะห์ความเหมือนด้วยโปรแกรม Blast(Basic local alignment search tool) เพื่อตรวจสอบความปนเปื้อนของดีเอ็นเอ จากเว็บไซต์ https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

-วิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเรียงเทียบ (Alignment) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Bayesian inference, Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Neighbor Joining และ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

-ทดสอบประสิทธิภาพโดยใช้ความเหมือนของดีเอ็นเอของพืชในกลุ่มเดียวกันที่เก็บบันทึกไว้บนฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information)

-ลงทะเบียนเก็บรักษาข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่มีประสิทธิภาพไว้บนฐานข้อมูล NCBIเพื่อให้ได้หมายเลข GenBank accession มาประกอบอ้างอิงในการจัดทำฐานข้อมูลชีวโมเลกุลของพืชแต่ละชนิด

3. จัดทำฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพและข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืช

-บันทึกข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์พืชสวน พันธุ์พืชไร่ และพันธุ์พืชท้องถิ่น ทั้ง 12 พืช ตามรูปแบบการบันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืช ประกอบด้วย ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ ชื่อท้องถิ่น ชื่อวงศ์ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ การกระจายพันธุ์ แหล่งที่พบตัวอย่างในงานวิจัย ข้อมูลเชิงนิเวศวิทยา ลักษณะเด่นของพืช การขยายพันธุ์ ช่วงเวลาออกดอก-ติดผล การนำไปใช้ประโยชน์ ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์พืช ข้อมูลดีเอ็นเออ้างอิงบนฐานข้อมูลที่ตรวจสอบได้ (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) ภาพประกอบ และเอกสารอ้างอิง

3.การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

☑ไม่มี❑มี ได้รับอนุมัติเมื่อวันที่.....(โปรดแสดงหลักฐานในภาคผนวก)

❑เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

❑เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 3ผลการศึกษา

3.1ผลการดำเนินงานของโครงการ

กิจกรรมที่ 1 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสวน

การทดลองที่ 1.1 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียน

ความหลากหลายของทุเรียนได้มีการจัดฐานข้อมูลเชื้อพันธุกรรมพืชทุเรียน ของสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร โดยการจำแนกออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกบ กลุ่มกำปั่น กลุ่มลวง กลุ่มก้านยาว กลุ่มทองย้อย และกลุ่มเบ็ดเตล็ด ในการทดลองนี้ได้เก็บตัวอย่างพันธุ์ทุเรียนที่มีการเก็บรวบรวมไว้ของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จำนวน 3 พื้นที่ ประกอบด้วย แปลงรวบรวมพันธุ์ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจังหวัดจันทบุรี และศูนย์วิจัยพัฒนาไม้ผลเศรษฐกิจภาคตะวันออก(ห้วยสะพานหิน)

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานสำหรับทุเรียน

ในการดำเนินการทดลอง ได้เริ่มทำการศึกษาโดยการใช้ไพรเมอร์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐาน เพื่อหาความสัมพันธ์ของตัวอย่างพันธุ์ทุเรียน โดยไพรเมอร์ที่ใช้ประกอบด้วยยีน rbcL matK rpo และ ITS ซึ่งไม่พบความแตกต่างแต่ละพันธุ์ของทุเรียน ทั้งนี้อาจเนื่องจากทุเรียนที่ใช้ เป็นทุเรียนที่อยู่ใน *Durio zibethinus*ทั้งหมด และไพรเมอร์มาตรฐานที่ใช้ยังไม่เหมาะสมกับทุเรียน

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานในการจำแนกทุเรียนต่างชนิด

จากการที่ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานกับทุเรียนชนิดเดียวกัน (ทุเรียนบ้าน *Durio zibethinus* L.) แล้วไม่สามารถหาความสัมพันธ์ได้ จึงได้ทดลองโดยใช้ทุเรียนต่างชนิดจำนวน 3 พันธุ์ ประกอบด้วย ทุเรียนขั้วติด (*D. Graveolens* Becc.) ชาเรียน (*D. mansoni* Bakh.) และทุเรียนนก (*D. griffithii* Bakh.) เปรียบเทียบกับทุเรียนบ้าน จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ชะนีก้านยาว กำปั่นพวง กบเจ้าคุณ และ ลวงทอง โดยใช้ไพรเมอร์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานจำนวน 3 ยีน คือ rcbLA ITS2และ MatK-413

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

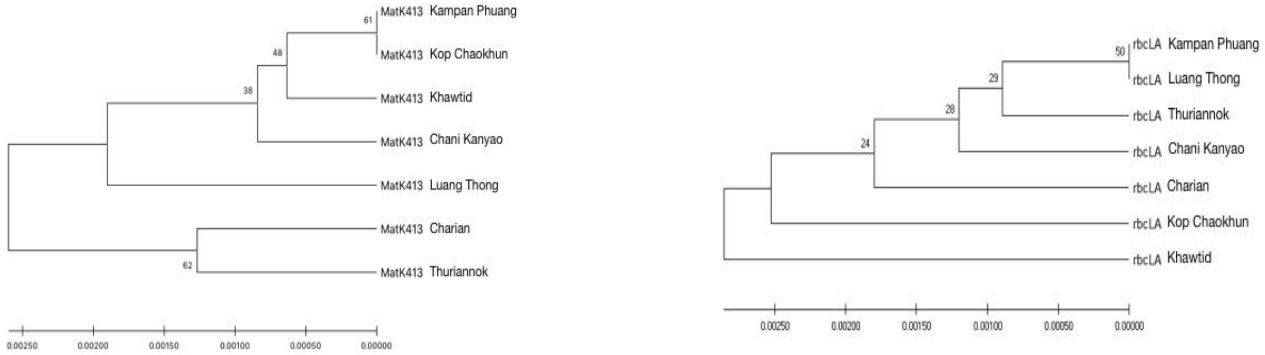
1) ยีนมาตรฐาน rbcLA มีการแยกทุเรียนขั้วติดออกนอกกลุ่ม โดยในกลุ่มใหญ่พบว่า กำปั่นพวงและลวงทองมีความใกล้ชิดกัน ถัดมาคือ ทุเรียนนก ชะนีก้านยาว ชาเรียน และ กบเจ้าคุณ

2) ยีนมาตรฐาน ITS2 มีการแยก ทุเรียนนก ออกนอกกลุ่ม โดยในกลุ่มใหญ่พบว่าทุเรียนขั้วติดมีความใกล้ชิดกับชะนีก้านยาว ถัดมาคือลวงทอง ชาเรียน และ กำปั่นพวง ตามลำดับ

3) ยีนมาตรฐาน matK413 แยกความแตกต่างได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มของชาเรียนและทุเรียนนก ส่วนอีก 5 พันธุ์อยู่ในกลุ่มใหญ่เดียวกัน โดยทุเรียนขั้วติด ค่อนข้างใกล้ชิดกับ กำปั่นพวง และ กบเจ้าคุณ

จากการหาความสัมพันธ์ด้วยยีนมาตรฐานจำนวน 3 ยีน พบว่า มีเฉพาะ matK-413 ที่มีการแยกทุเรียนต่างชนิดคือ ชาเรียน และ ทุเรียนนก ออกจากกลุ่ม ทุเรียนพันธุ์อื่น ทั้งนี้ถ้าดูจากลักษณะสัณฐานพบว่า ชาเรียนและทุเรียนนก เป็นทุเรียนที่มีดอกสีแดง ผลมีขนาดเล็ก มีเนื้อน้อยแทบไม่มีส่วนที่บริโภคได้ เมื่อเปรียบเทียบกันทุเรียนพันธุ์อื่นๆ รวมถึงทุเรียนขั้วติด ที่ดอกส่วนใหญ่มีสีขาวครีม ผมมีขนาดใหญ่มีเนื้อให้บริโภคได้ ในขณะที่ยีน rbcLA และ ITS2 ยังไม่มีการแยกทุเรียนต่างชนิด ออกมาอย่างชัดเจน

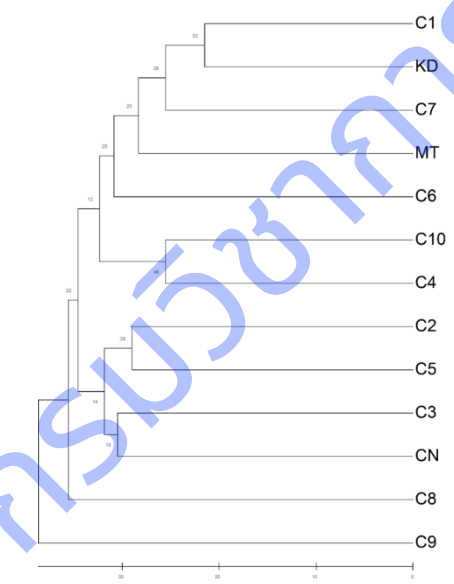
ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.1.1 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีน matK413 และ rbcLA ในการเป็น DNA barcode ของทุเรียนต่างชนิด

การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยใช้เทคนิค GBS

จากการใช้ไพรเมอร์มาตรฐานของดีเอ็นเอบาร์โค้ดหลายยีน 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



ภาพที่ 1.1.2 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=หมอนทอง, CN=ชะนี)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.1.1 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	

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 กระดุมทอง จันทบุรี7 หมอนทอง จันทบุรี6 จันทบุรี10 และจันทบุรี4 โดยพบว่า จันทบุรี1 มีความใกล้ชิดกับ กระดุมทอง มากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจาก ลักษณะผลมีรูปร่างกลมและอายุเก็บเกี่ยวสั้น และจันทบุรี4 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับจันทบุรี10 มากที่สุด สำหรับในกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย จันทบุรี2 จันทบุรี3 จันทบุรี5 และชะนี โดยพบว่า จันทบุรี2 และจันทบุรี5 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และจันทบุรี3 ใกล้ชิดกับชะนี (ตารางที่ 1.1.1)

จากค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากเทคนิค GBS ของทั้ง 13 พันธ์ พบว่า

1) จันทบุรี1 มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี9 และชะนีมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากทั้งจันทบุรี1และ จันทบุรี9 มีแม่เป็นชะนีเหมือนกัน

2) จันทบุรี2 มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี9 อาจเนื่องจากทั้งสองพันธุ์นอกจากมีแม่เป็นชะนี ยังมีรูปร่างผลกลมรีเหมือนกัน

3) จันทบุรี3 มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี7 และจันทบุรี8 อาจเนื่องมากจาจันทบุรี3 และจันทบุรี7 มีแม่และพ่อเป็น ก้านยาวxชะนี เหมือนกัน ส่วนจันทบุรี8 มีแม่เป็นชะนีและผลออกทรงกลมคล้ายจันทบุรี3

4) จันทบุรี4 มีดัชนีความเหมือนกับจันทบุรี9 มากที่สุด อาจเนื่องจากมีพ่อเป็น หมอนทองเหมือนกัน 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

กรมวิชาการเกษตร

12) กระดุมทอง 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

1 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’

2 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’

3 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’

4 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 1.1.3 และ 1.1.4 โดยผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยสร้างแผนผังพันธุกรรมด้วยวิธี ML (Maximum Likelihood) ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ ซึ่งการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน DuBc04 สามารถแยกความแตกต่างได้มากกว่า การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน ITS2-S2F (ภาพที่ 1.1.5 และ 1.1.6) จะเห็นได้จาก การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน DuBc04 บางส่วนมีการจัดกลุ่มตัวอย่างทุเรียนที่ใกล้ชิดกันภายในกลุ่มเดียวกันได้ เช่น กบตาโห้ และกบชายน้ำ ซึ่งอยู่ในกลุ่มกบ หรือ ฉัตรสีทองและทองย้อยเดิมซึ่งอยู่ในกลุ่มทองย้อย หรือ ฟักทองแดงและกระดุมทองซึ่งอยู่ในกลุ่มเบ็ดเตล็ด นอกจากนี้ยังมีการจัดกลุ่มใกล้ชิดของทุเรียนต่างกลุ่ม เช่น ชายมังคุดที่อยู่ในกลุ่มเบ็ดเตล็ดและกบรัศมีกลุ่มกบ หรือ สาวชมฟักทองกลุ่มเบ็ดเตล็ดและกำปั่นดำกลุ่มกำปั่น รวมถึงความสัมพันธ์ของกลุ่มเช่น จัดกลุ่มอีลีบและสีทองซึ่งอยู่กลุ่มเบ็ดเตล็ดอาจมีความสัมพันธ์กับกบสีนวล ที่อยู่ในกลุ่มกบ เป็นต้น ในขณะที่การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน ITS2-S2F มีรายละเอียดการจัดกลุ่มน้อยกว่า

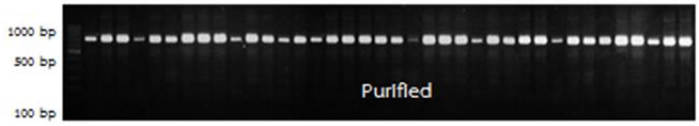
นอกจากนี้การทำ alignment ด้วย ClustalW ของโปรแกรม MEGAx แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอประเภทเดียวกัน (tansition mutation) และการเปลี่ยนแปลงลำคับคู่เบสในดีเอ็นเอต่างชนิดกัน (transversion mutation) (ภาพที่ 1.1.7 และ 1.1.8)

จะเห็นได้ว่า การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน DuBc04 สามารถเป็นแนวทางในการหาความสัมพันธ์ทุเรียนที่อยู่ในกลุ่มเบ็ดเตล็ดซึ่งยากต่อการจัดกลุ่มและเป็นทุเรียนส่วนใหญ่ กับทุเรียนที่มีการจำแนกกลุ่มแล้วบางส่วนได้ ตลอดจนอาจพัฒนาเป็นแนวทางในการพิจารณาพันธุ์ที่เป็นพันธุ์เดียวกัน แต่ที่มีชื่อต่างกันจากการตั้งชื่อของผู้ปลูก เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด ด้วยยีน DuBc04 ยังไม่สามารถจำแนกความสัมพันธ์ได้อย่างชัดเจนถูกต้องตามที่ได้มีการจัดกลุ่มตามลักษณะสัณฐาน ทั้งนี้อาจเนื่องจากทุเรียนเป็นพืชผสมข้ามตามธรรมชาติ จึงทำให้เกิดความหลากหลายทั้งทางลักษณะสัณฐานของใบและผลค่อนข้างมาก อีกทั้งการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดแยกความแตกต่างของพืชที่อยู่ในชนิดเดียวกันยังค่อนข้างมีข้อจำกัด ดังนั้นอาจต้องใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมากกว่าหนึ่งบริเวณร่วมกันเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการระบุชนิดพืชต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

No. 1 - 41

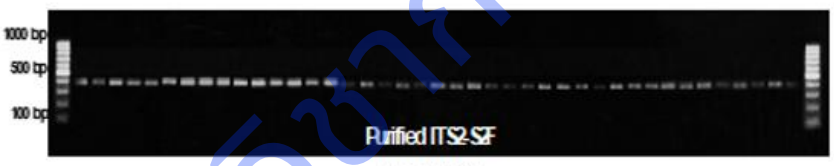
No. 42 - 82



No. 83 - 120

ภาพที่ 1.1.3 ผลผลิตของพีซีอาร์ของทุเรียน 120 ตัวอย่าง ทีทำให้บริสุทธิ์ ก่อนทำการส่งวิเคราะห์จากการใช้ไพรเมอร์ของยีน DuBc04

No. 1 - 41



No. 42 - 82

No. 83 - 123

No. 124 - 150

ภาพที่ 1.1.4 ผลผลตของพซอารของทุเรยน 150 ตวอยาง ทีทาเหบรสุทธ กอนทาการสงวเคราะหจากการใชไพรเมอรของยีน ITS2-S2F

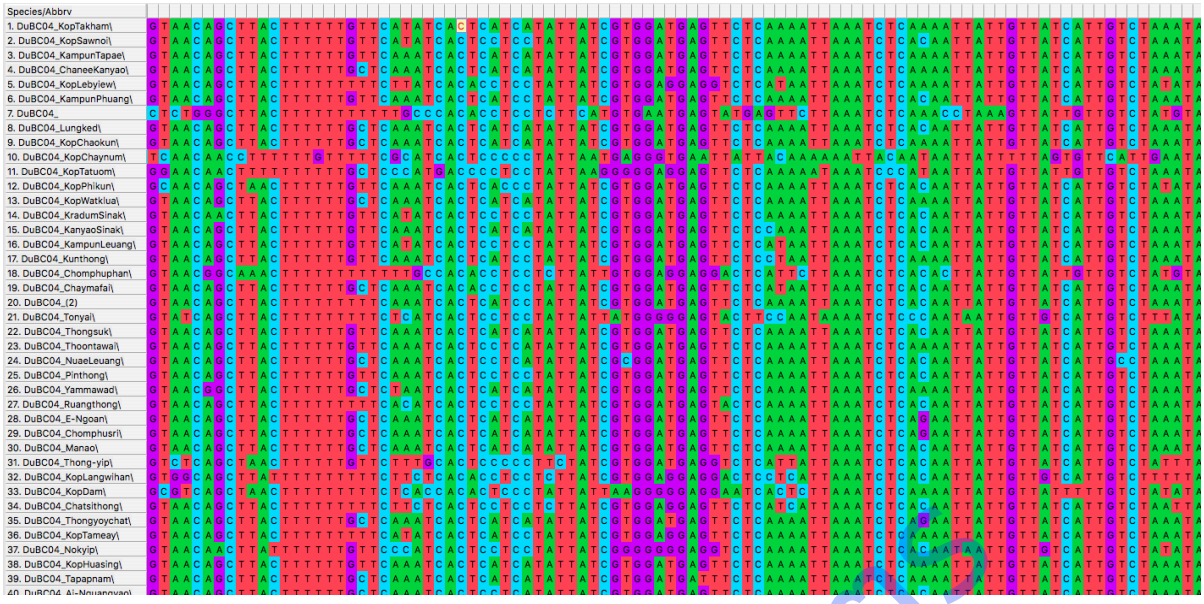
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.1.5 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างทุเรียน จำนวน 120 ตัวอย่าง จากยีน *DuBC04* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

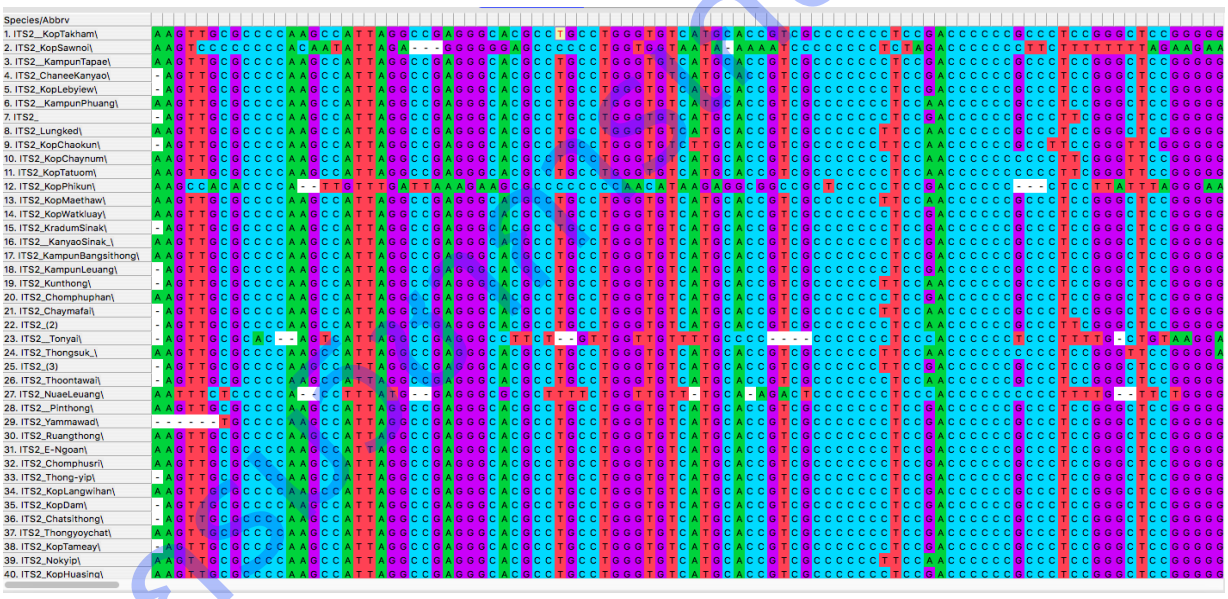
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.1.6 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างทุเรียน จำนวน 150 ตัวอย่าง จากยีน *ITS2* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.1.7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DuBC04*ตัวอย่างทุเรียนด้วยโปรแกรม MEGAx



ภาพที่ 1.1.8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2*ตัวอย่างทุเรียนด้วยโปรแกรม MEGAx

<u>การทดลองที่ 1.2 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ</u>

การทดลองนี้ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของเงาะที่มีการเก็บรวบรวมไว้อยู่เดิม จากแปลงรวบรวมพันธุ์ จำนวน 2 พื้นที่ คือ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จำนวน 17 ตัวอย่าง ประกอบด้วย โรงเรียน สีชมพู สีทอง บางยี่ขัน น้ำตาลกรวด เจ๊ะมง เงาะขนสั้น พลิ้ว1 พลิ้ว2 พลิ้ว3 พลิ้ว4 พลิ้ว5 พลิ้ว6 พลิ้ว7 พลิ้ว8 ปูลาซัน Unknown และ ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จำนวน 19 ตัวอย่าง ประกอบด้วย พรวนซี . เจ๊ะมง 3 ตัวอย่าง เงาะลูกเหลือง 4 ตัวอย่าง น้ำตาลกรวด เงาะลูกเหลืองขนสั้น เงาะลูกแดง 2

ตัวอย่าง เงาะแดง เงาะลูกพรวน เงาะขนสั้นลูกเล็ก เงาะพื้นเมืองลูกแดง เงาะป่าขนสั้นลูกใหญ่ เงาะป่า และคอแลนโดยทำการเก็บข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พร้อมกับ เก็บตัวอย่างพืชอ้างอิง และเก็บดีเอ็นเอ เพื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ด้วยไพรเมอร์มาตรฐานของดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK1R, MatK-413,rbcL, rbcLA, psbA, rpoC* และ*trnL* พบว่า ผลผลิตของ PCR ที่ได้ทำการส่งไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการของ First BASE (Apical Scientific SdnBhd, 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) ลูกพรวน แดง เล็กแดง เล็กแดง(2) เล็กแดง(3) น้ำตาลกรวด น้ำตาลกรวด(2) เจ๊ะมง เจ๊ะมง(2) พรวนชี พลิ้ว1 พลิ้ว3 พลิ้ว6 พลิ้ว7 พลิ้ว8 โรงเรียน สีชมพู บางยี่ขัน ขนสั้น กลุ่มย่อยที่สองคือ ลูกเหลือง(2) และพื้นเมืองลูกแดง โดยในกลุ่มลูกเหลืองพบว่า ลูกเหลือง(2) มีผลสีเหลืองออกแดง ในขณะที่ลูกเหลืองอื่นไม่มีสีแดง ส่วนปูลาซัน ไม่อยู่ในกลุ่ม ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ปูลาซัน เป็นเงาะต่างชนิดคือ *N. ramboutan-ake* (Labill) Leenh กลุ่มใหญ่ที่สอง ประกอบด้วย สีทอง เจ๊ะมง(3) และพลิ้ว2 ซึ่งในกลุ่มนี้พบว่า พลิ้ว2 เป็นลูกผสมของสีทองและเจ๊มง (ภาพที่ 1.2.1)

2) ยีนมาตรฐาน rbcLA พบว่า เงาะเกือบทุกพันธุ์อยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่มี 3 พันธุ์ที่อยู่นอกกลุ่ม คือ เงาะป่า เงาะขนสั้นลูกใหญ่ และเงาะพื้นเมืองลูกแดง โดยเงาะขนสั้นลูกใหญ่ เป็นเงาะต่างชนิด คือ *N. ramboutan-ake*Leenh. (ภาพที่ 1.2.2)

3) ยีนมาตรฐาน rbcL สามารถจัดกลุ่มออกได้ เป็น 2 กลุ่ม คือ เงาะส่วนใหญ่ อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนอีกกลุ่มประกอบด้วย เงาะป่า เงาะพื้นเมืองลูกแดง และ ขนสั้นลูกใหญ่ (ภาพที่ 1.2.3)

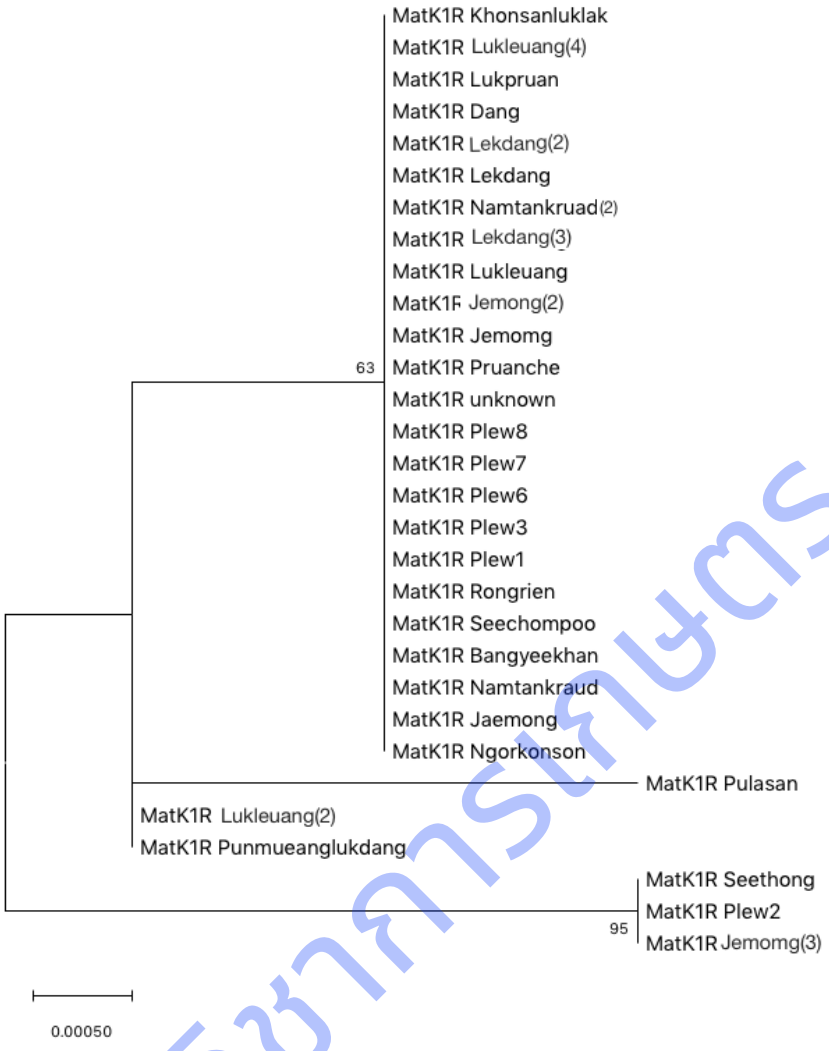
4) ยีนมาตรฐาน psbA สามารถจัดกลุ่มเป็นกลุ่มหลักได้ 3 กลุ่ม ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแรก กลุ่มที่สอง ประกอบด้วย ขนสั้นลูกใหญ่ และเงาะป่า กลุ่มที่สาม ได้แก่เงาะสีทอง พลิ้ว2 และเจ๊ะมง(3) ส่วน unknown จัดอยู่นอกกลุ่ม (ภาพที่ 1.2.4)

5) ยีนมาตรฐาน rpoC สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่มหลัก ซึ่งกลุ่มแรกประกอบด้วย โรงเรียน สีชมพู สีทอง บางยี่ขัน น้ำตาลกรวด เจ๊ะมง เงาะขนสั้น พลิ้ว1-8 ปูลาซัน unknown ซึ่งเป็นตัวอย่างเงาะที่เก็บมาจากศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีทั้งหมด ส่วนลูกพรวนไม่มีการจัดกลุ่ม กลุ่มที่สองประกอบด้วย ลูกเหลือง(3) และ น้ำตาลกรวด(2) กลุ่มที่สามได้แก่ เจ๊ะมง ลูกเหลือง ลูกเหลือง(2) เงาะแดง เล็กแดง เงาะป่า และขนสั้นลูกใหญ่ ส่วนพรวนชีจัดอยู่นอกกลุ่ม (ภาพที่ 1.2.5)

6) ยีนมาตรฐาน trnLแยกได้ 3 กลุ่มคือ กลุ่มแรกคือเงาะส่วนใหญ่ กลุ่มที่สองคือ พลิ้ว2 พลิ้ว3 และเจ๊ะมง(3) กลุ่มที่สามประกอบด้วย เงาะป่า และขนสั้นลูกใหญ่ (ภาพที่ 1.2.6)

จากการใช้ยีนมาตรฐานจะเห็นได้ว่า ยีนบริเวณrbcLArbcLpsbA และ trnL แยก ขนสั้นลูกใหญ่ และเงาะป่า ออกจากเงาะพันธุ์อื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากทั้งสองพันธุ์เป็นเงาะต่างชนิด กล่าวคือ เงาะขนสั้นลูกใหญ่ *N.rumboutan-ake*Leenh) และ เงาะป่า *Nephelium* sp.อย่างไรก็ตาม เงาะที่มีสปีชีส์แตกต่างจากพันธุ์อื่นคือ ขนสั้นลูกเล็ก (*Nepheliummutabile*) และ คอแลน (*Nepheliumhypoleucom*Kurz.) ยังไม่สามารถแยกกลุ่มออกมาได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับรายงานของ เจนจิรา และคณะ (2558) ที่พบว่า การใช้ยีนบริเวณ rcbLไม่สามารถศึกษาความหลากหลายของเงาะในระดับสปีชีส์ได้ ซึ่ง rcbL มักนิยมในการจำแนกพืชระดับวงศ์ และหากใช้ร่วมกับยีน matK จะทำให้สามารถจัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ชัดเจนขึ้น (สุชาดา, 2553) สำหรับในพืชอื่น เช่น มะม่วง พบว่าการใช้ยีน rbcLและ rpoC1 ไม่สามารถแยกพันธุ์มะม่วงได้ (ปิยดา และคณะ, 2558) ทั้งนี้ในส่วนของตัวอย่าง unknown พบว่า มีเพียง ยีนบริเวณ psbA ที่แยกออกมาอยู่นอกกลุ่ม ในขณะที่ยีนอื่นๆ จัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับพันธุ์ส่วนใหญ่ ซึ่งที่ผ่านมา ตัวอย่าง unknown ยังไม่มีลักษณะดอกหรือผลผลิต จึงยากต่อการจำแนก ดังนั้นอาจต้องติดตามลักษณะสัณฐานต่อไป

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.2.1 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน MatK1R ในการเป็น DNA barcode ของเงาะ

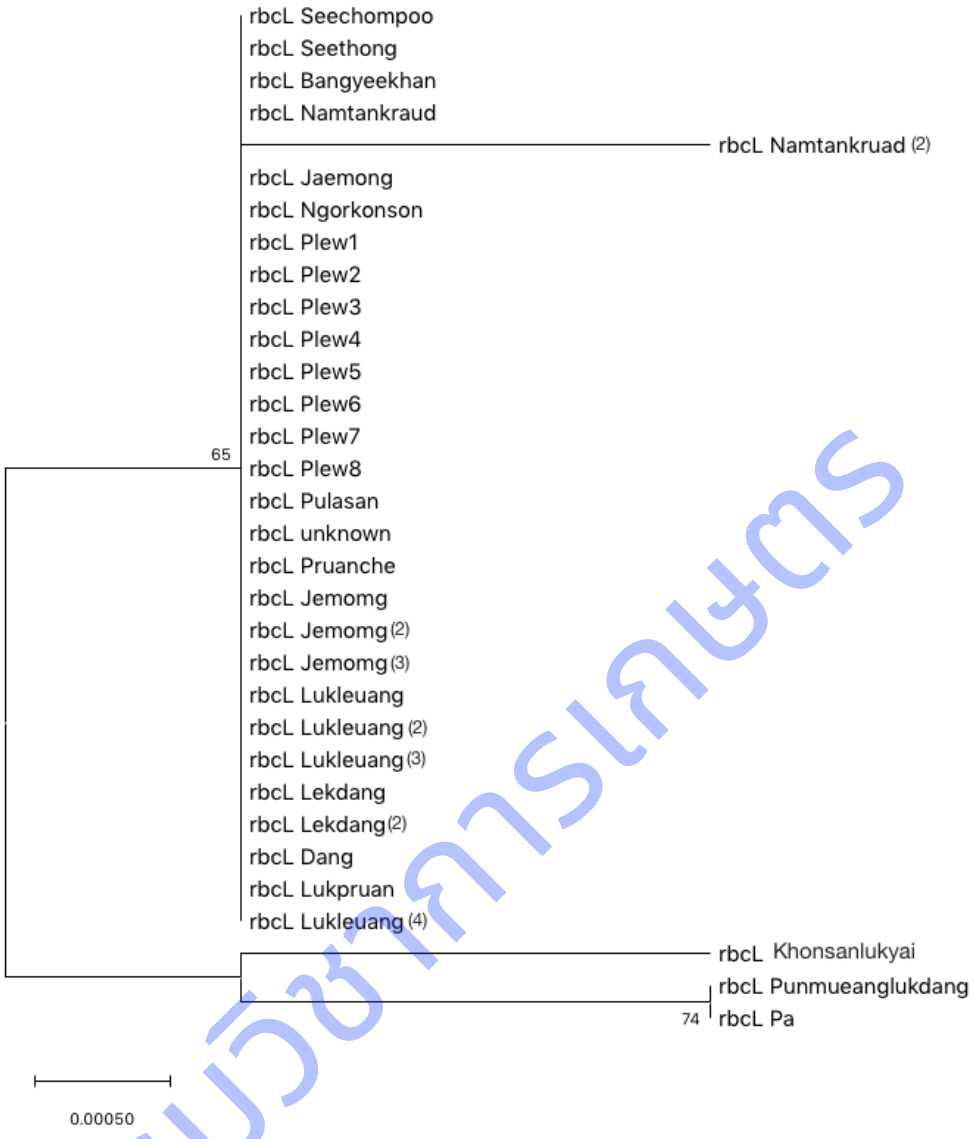
กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.2.2 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน rbcLAในการเป็น DNA barcode ของเงาะ

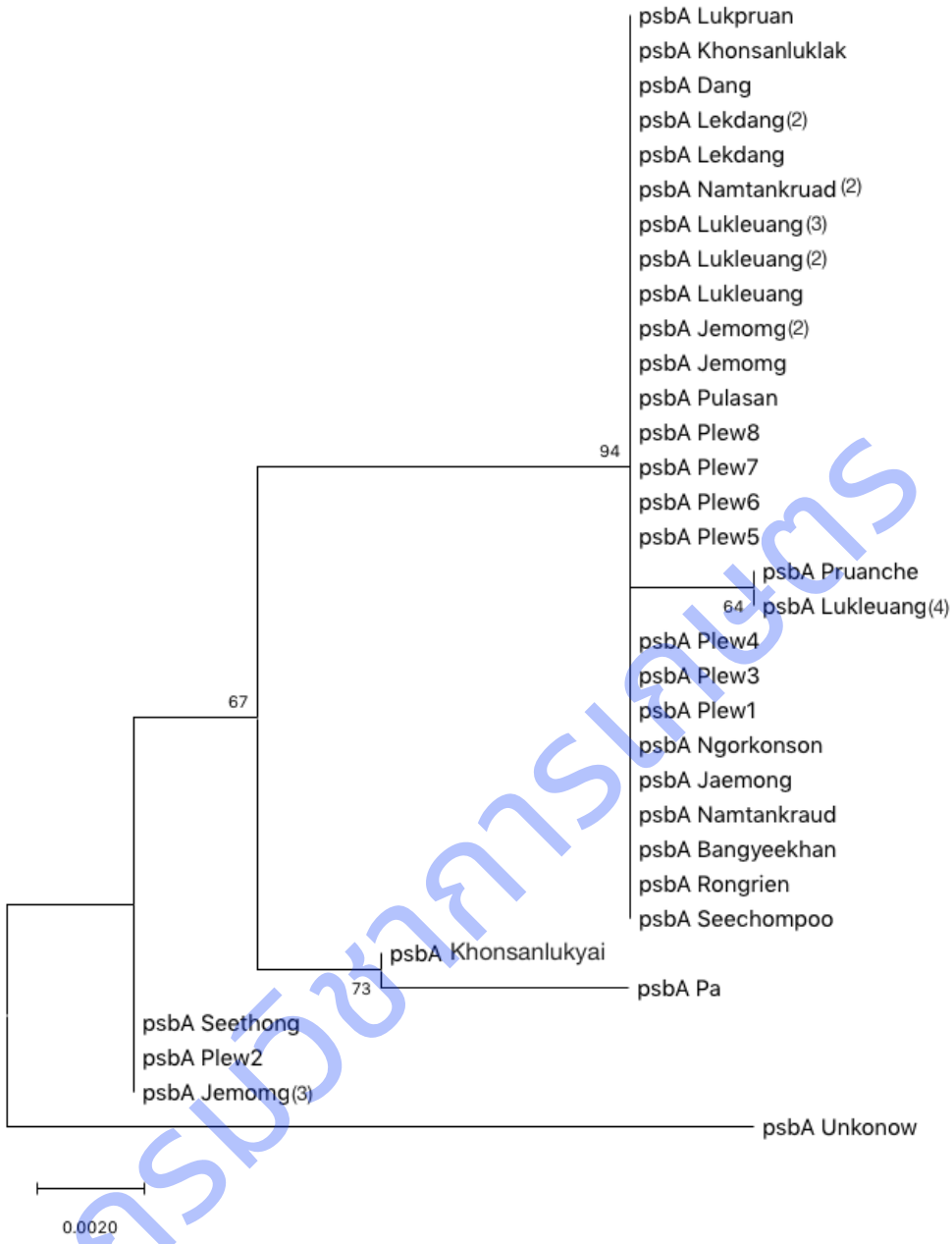
ภาพที่ 1.2.2 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน rbcLAในการเป็น DNA barcode ของเงาะ

กรมวิชาการเกษตร



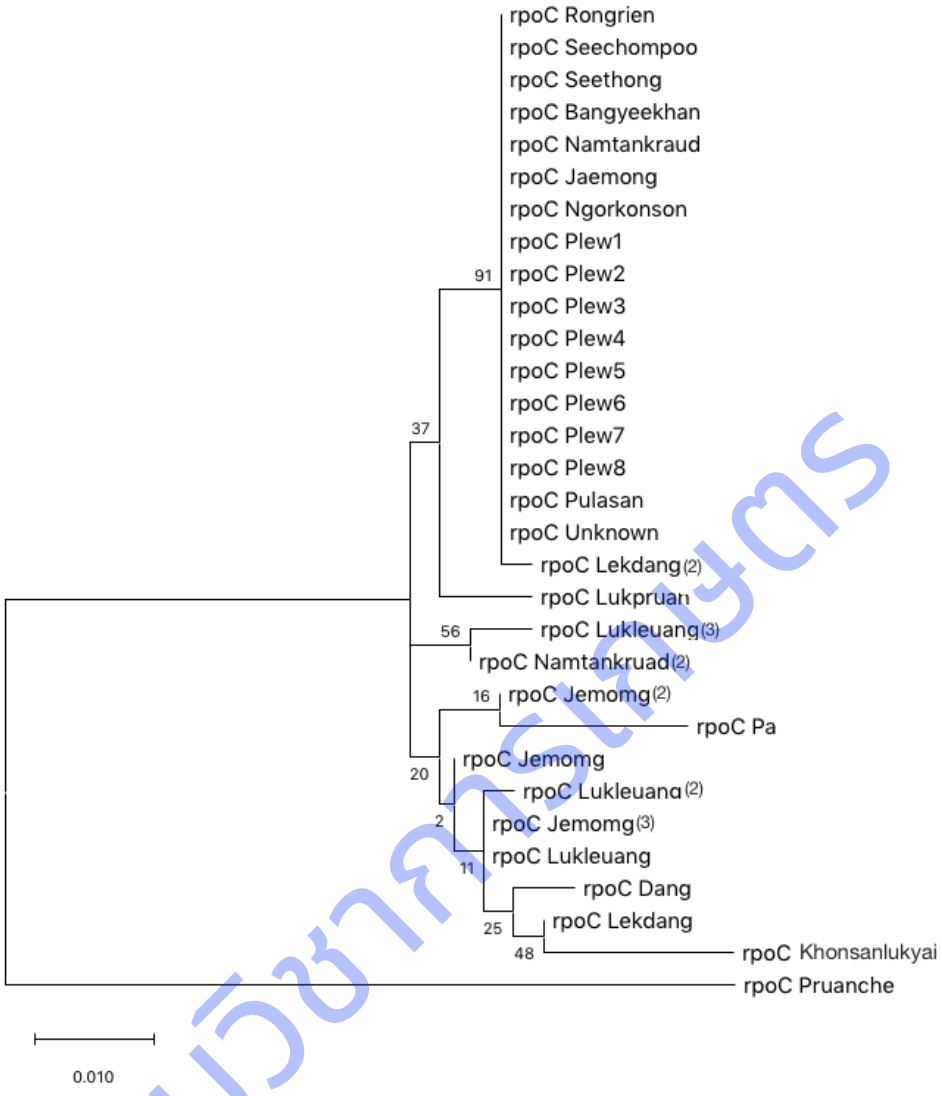
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.2.3 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน rbcLในการเป็น DNA barcode ของเงาะ



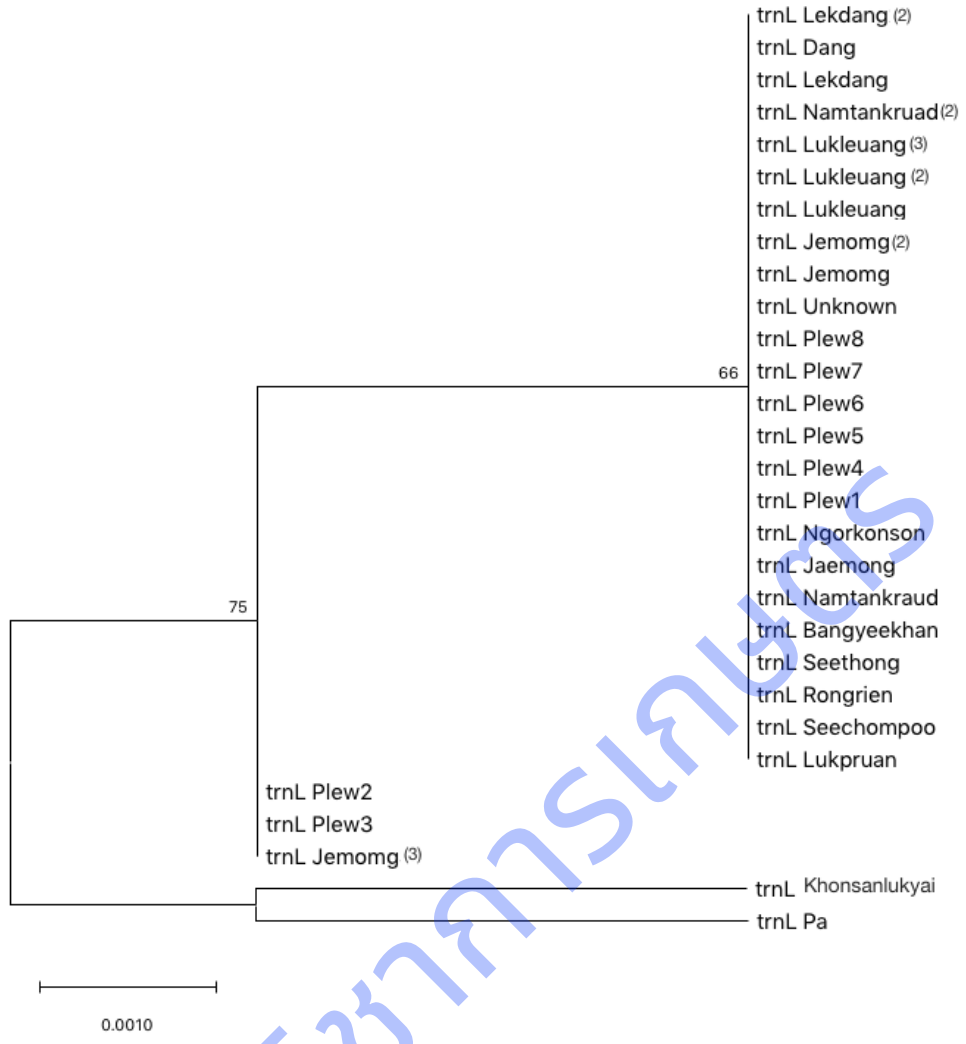
ภาพที 1.2.4 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน psbAในการเป็น DNA barcode ของเงาะ

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.2.5 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน rpoCในการเป็น DNA barcode ของเงาะ

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.2.6 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนมาตรฐาน trnLในการเป็น DNA barcode ของเงาะ

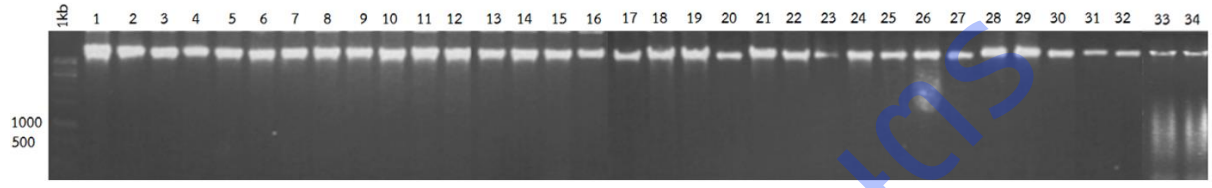
กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.3ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัว

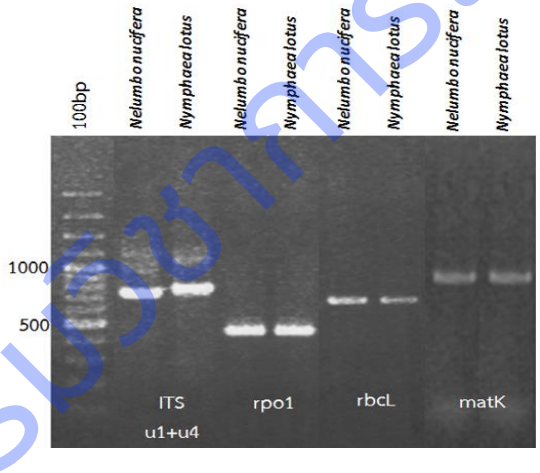
1. การทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์บาร์โค้ดสากลของพืชกับตัวอย่างบัว

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) ที่ความยาวคลื่นแสงที่A260/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; Paween *et al*., 2011 และ Cheng *et al*., 2016) ซึ่งการ

ทดลองนี้ทดสอบกับไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ คือ ITSu1+ITSu4 rpoC1F+rpoC1R rbcL_F+ rbcL_R rpo2 และ matK_1F+ matK_1Rจากการทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ดังกล่าว สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบัวทั้ง 2 ชนิด และได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีแถบดีเอ็นเอเป้าหมายชัดเจนจำนวนหนึ่งแถบ (ภาพที่ 1.3.2) จึงมีความเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างบัวเพื่อการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ ได้ผลผลิตพีซีอาร์หรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จากยีน *ITS matK rpoC1*และ *RbcL* ขนาดประมาณ 750950 650 และ 450 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปทำบริสุทธิ์ด้วยชุด PCR purification ได้แถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่บริสุทธิ์เพียง 1 แถบ (ภาพที่ 1.3.3) ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งหากผลผลิตพีซีอาร์มีแถบดีเอ็นเออื่นๆ ปะปน จะไม่สามารถทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ ต้องทำการตัดแถบดีเอ็นเอก่อนการทำบริสุทธิ์และการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นการเพิ่มขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในการปฏิบัติงาน

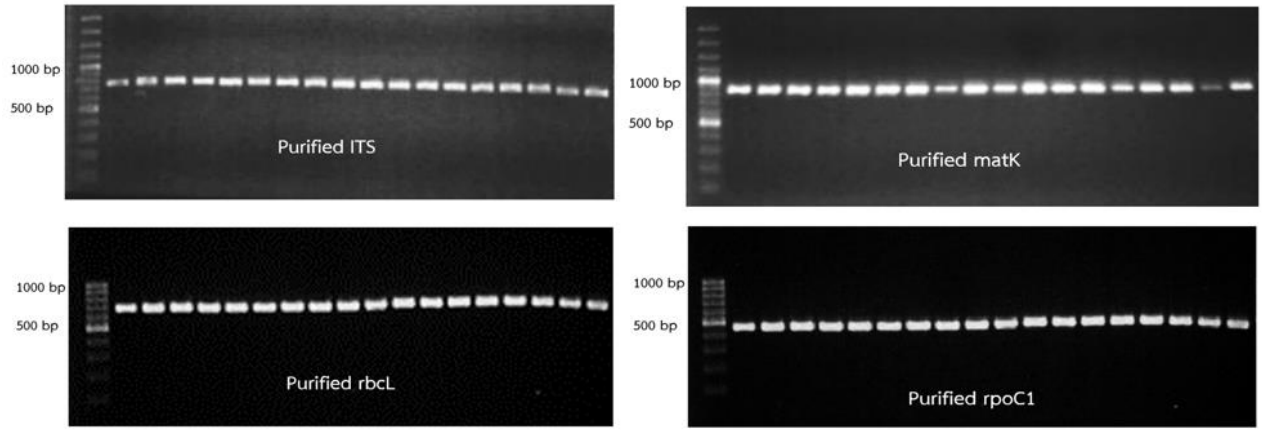


ภาพที่ 1.3.1ดีเอ็นเอจากใบบัวจำนวน34 ตัวอย่าง ที่สกัดโดยวิธี CTAB บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์



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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1.3.3 แถบดีเอ็นเอจากยีน *ITS, matK, rpoC1*และ *RbcL* ที่ผ่านการทำบริสุทธ์ก่อนการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งด้านปลาย 5’ และ 3’ ต้องมีภาพโครมาโตแกรม (Chromatogram) ที่ชัดเจนไม่มีพีคซ้อนทับกัน (ภาพที่ 1.3.4) จึงจะนำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal Omega เพื่อตรวจสอบและคัดเลือกส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการ โดยตัดส่วนนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5’ และ 3’ ที่ไม่ได้คุณภาพออกไปให้ได้ขนาดความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่เท่ากันในทุกตัวอย่าง 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. pubescensN. rubra* และ *N. nouchali* ที่ค่าความเหมือน 100 98.3 และ 98 ตามลำดับ ยีน *rpoC1* คล้ายกับ *N. pubescensN. nouchali* และ *N. rubra* ที่ค่าความเหมือน 99.68 99.5 และ 99.03 ตามลำดับ ส่วนยีน*rpoC1*คล้ายกับ *N.capensisN.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 จำนวน1,000 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)

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.3.4 ภาพลักษณะ Chromatogram ที่นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

กรมวิชาการเกษตร

>ITS

CTGGGGTCGCTTTAGCTGAACAAGAAGCCGAAGCCGCTTGCCTCAAGAGTCCCAATGGCCTTTCTCGATCAGGTGAGGCACA
ACTCACTGGGAAATCCACCGCTTGTTGTGCCGCACAACTGATCGGCTTAGGCCAAGACGTTTCAACCTACGGCGTGCTTAAA
AACAACACGCCGAAGGCCAGTCCTCCGCTCTCCCTCAGCCTTGGCTCGAAAGCACAAGGGCATGGGAAGGGCGATGCAAAGC
TTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTTGGCCGGATGGCCTTGGACGCAACTTGCGTTCAAAAACTCGATGATTCACGGGATTCT
GCAATTCACACCAAGTATCGCATTTCGCTACGTTCTTCATCGTGGCGGGAGCCAAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTATATT
GGAAGGGAAGAGGGACATCCCGCCACTCTTTCGTGTGGCGGCACGCCCTCTCCTTTCGATCAAAGGTTTTCCTTGGCACCTA
GAGGTGCCGA

>matK

ATGTTTTCTACACGAGCATCATAATTGGAATAGCCTTATTACTTCAAATAAATCCATTTCCATTTTTTCAAAGGAAAATCAAAG
ATTATTCTTGTTCTTGTATAATTCTCATGTATATGAATGCGAATCCGTATTAGTTTTCCTTCGTAAACAATCCTCTCATTTACG
GTCAATATCTTCTCTAGCCTTTCTTGAGAGAAGACATTTTTATGGAAAAATCAAACATCTTGTAGTGACGCCTCATAATGATT
CTCAAATGACCCTGCCCCTCTGGTTCTTCAAGGAACCTTTGATGCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCCATTATGGCTTCA
AGGTGTACTAATTTACTGATGAAGAAATGGAAATATTACCTTGTACATTTCTGGCAATGTCATTTCACTTATGGTCTCAACC
GGGTAGGATCCATATAAATGAATTATCCAATCATTCTTTCTATTTTCTGGGCTATCTTTCCGGTGTACGACTAACGCCTTGGG
TGATAAGGAGTCAAATGCTAGAGAATTCATTTATGATCGATACAGCTGTTAAGAGATTCGATACAATAGTCCCAATTTTTCCT
CTGATTGGATCGTTGGT

>RbcL

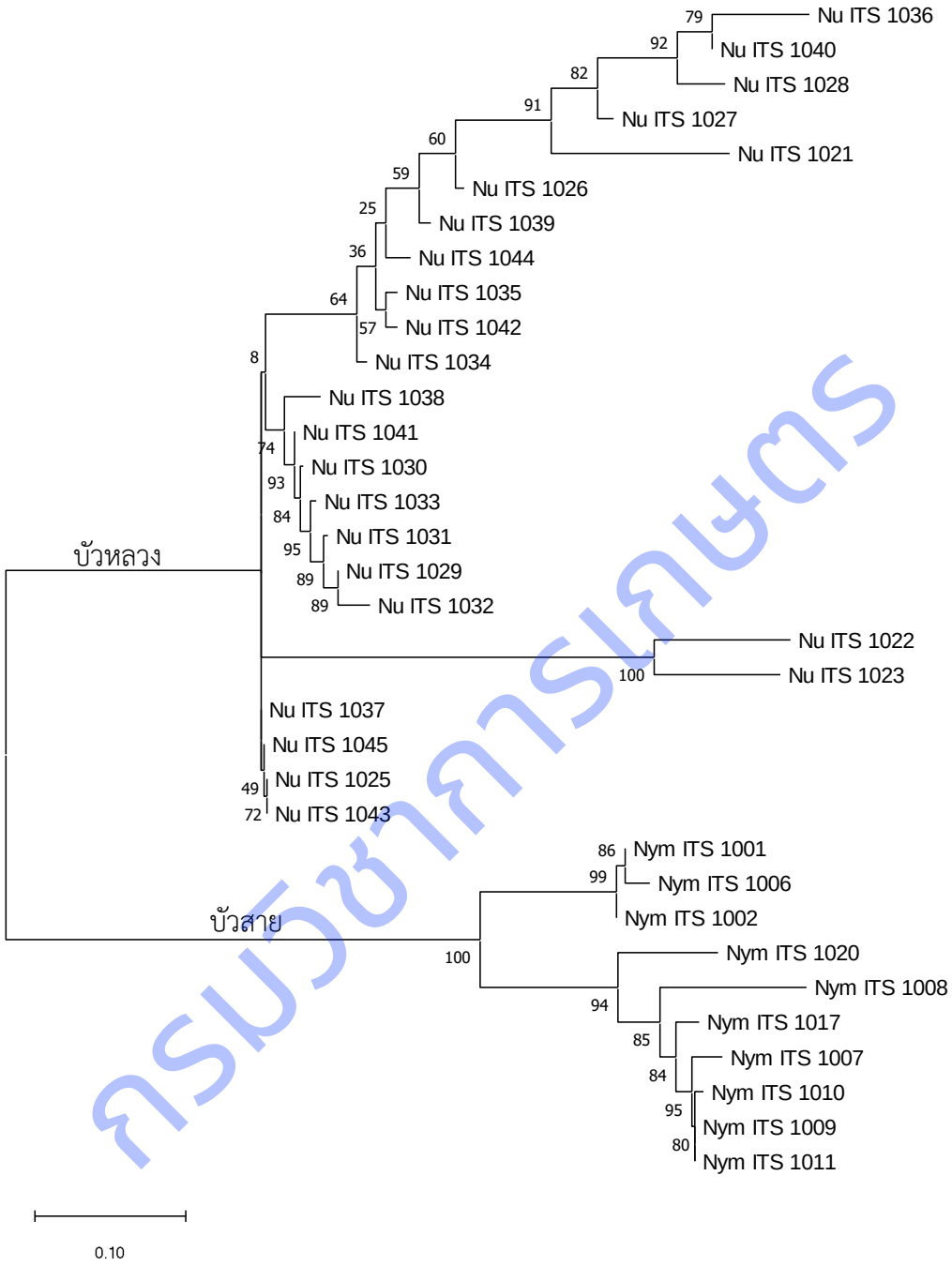
GCTGGTGTTAAGATTACAGATTGACTTATTACACTCCTGATTATGAAACCCTTGCTACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTA
ACTCCTCAACCTGGAGTTCCTCCTGAGGAAGCAGGAGCTGCGGTGGCTGCCGAATCTTCCACTGGTACATGGACAACTGTGT
GGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCTGTTGCTGGGGAGGAAAATCAATA
TATTGCTTATGTAGCTTACCCTTTGGACCTTTTTGAGGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATT
TGGGTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAGGATCTGAGAATTCCTCCTGCTTATTCTAAAACTTTCCAGGGCCCACCTC
ATGGAATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGGTTA
TCTGCAAAGAACTATGGGAGAGCGGTTTATGAGTGTCTCCGTGGTGGACTTGATTTTACCAAGGATGATGAAAACGTGAACTC
CCAACCGTTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTAT

>RpoC1

GTTCCGTCATTGTGGTAGGCCCTTCGCTTTCACTGCATCAATGTGGATTACCTCGAGAAATAGCAATAGAGCTTTTTCAGACA
TTTGTAATTCGTGGTCTAATCAGACAACATCTTGCTTCCAACATAGGACTTGCTAAAAGTAAAATTCGGGAAAAAGAACCCAT
TGTATGGGAAATACTGCAAGAAGTTATGCAGGGGCATCCTGTATTGCTAAATAGAGCACCCACTTTGCATAGATTAGGCATAC
AGGCGTTCCAACCTATTTTAGTGGAGGGACGAGCTATTTGTTTACATCCATTGGTTTGTAAGGGATTCAATGCGGACTTCGAT
GGAGATCAAATGGCTGTTCATGTACCTTTATCTTTGGAAGCTCAAGCAGAAGCTCGTTT

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

กรมวิชาการเกษตร



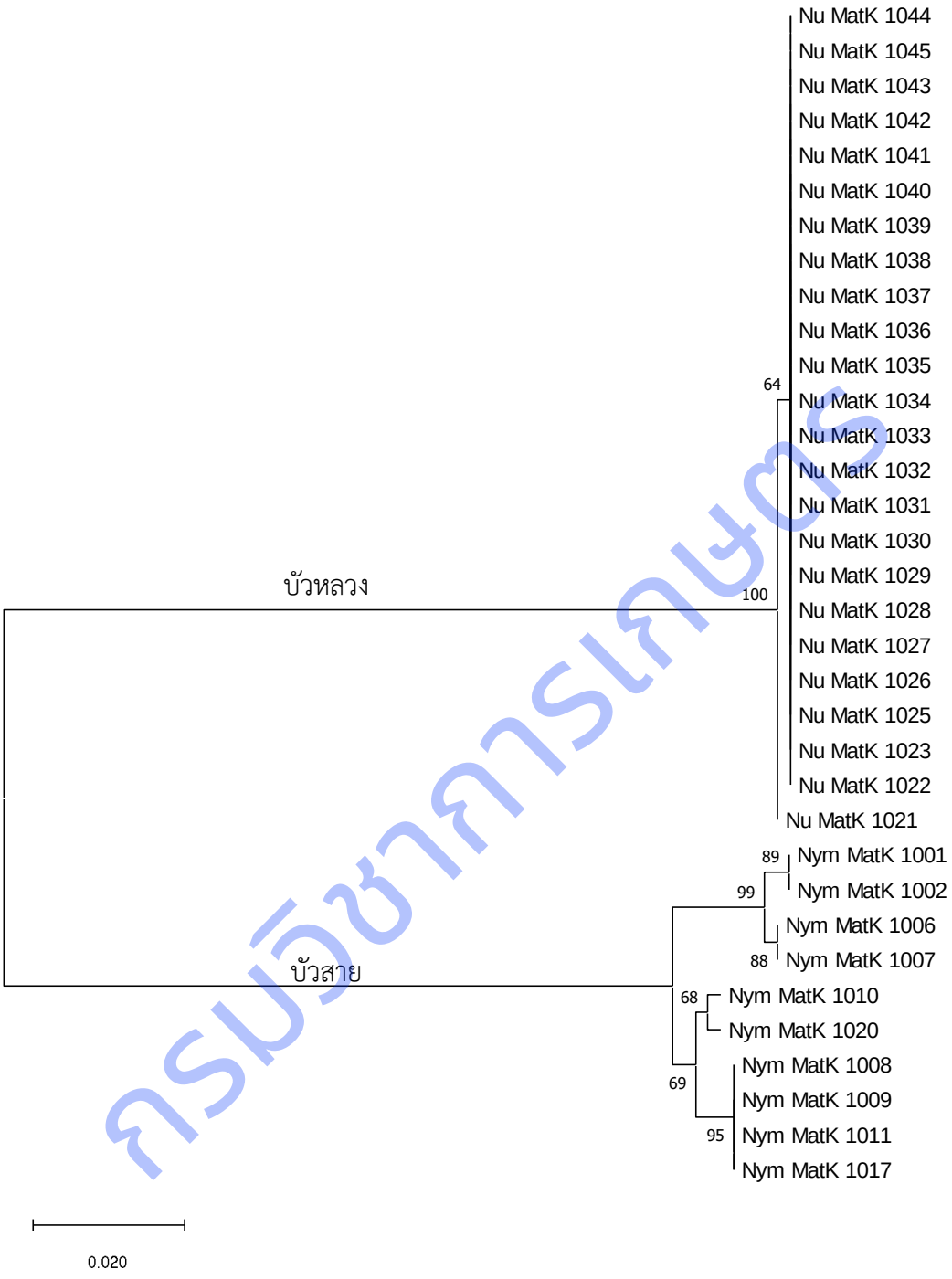
ภาพที่ 1.3.6 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 34 ตัวอย่าง จากยีน *ITS* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.3.1 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	

กรมวิชาการเกษตร



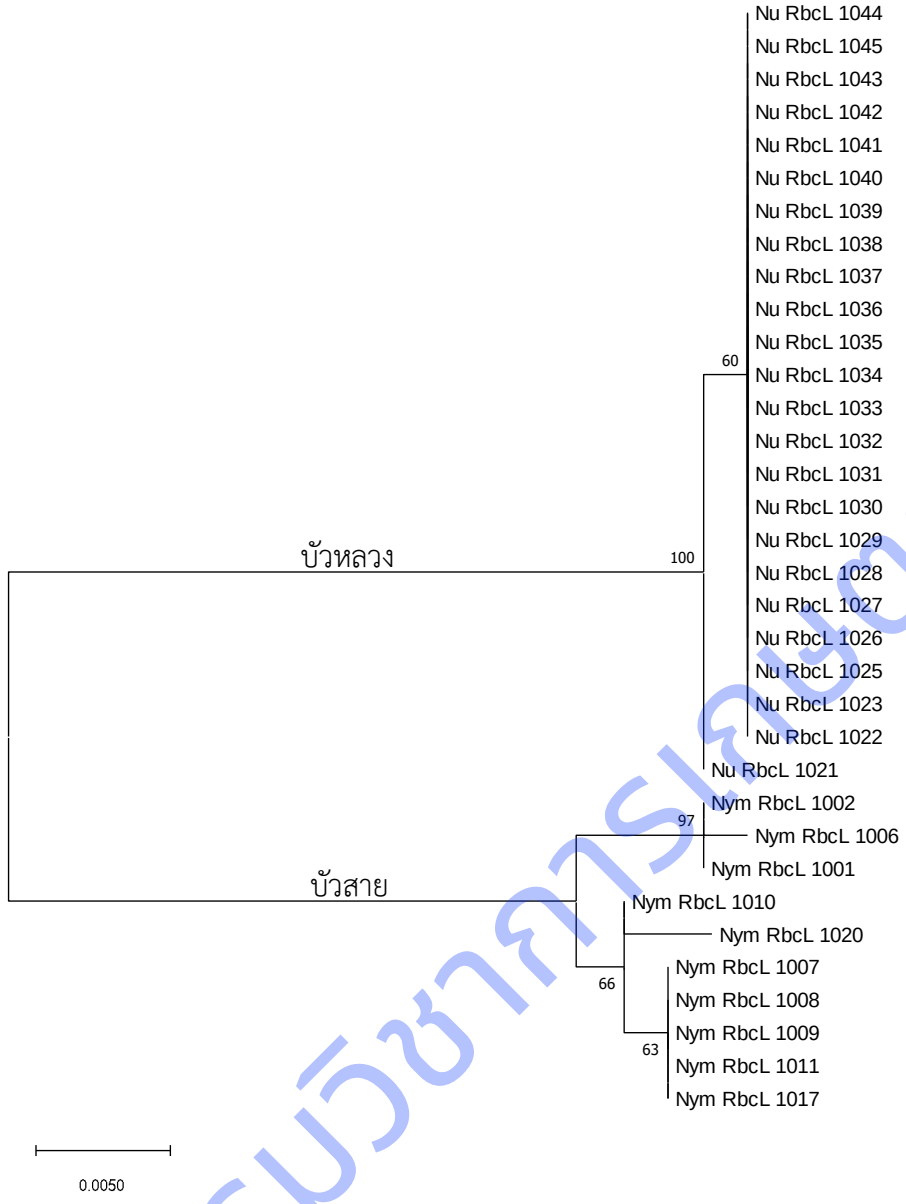
ภาพที่ 1.3.7 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 34 ตัวอย่าง จากยีน *MatK* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.3.2 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	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	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	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย



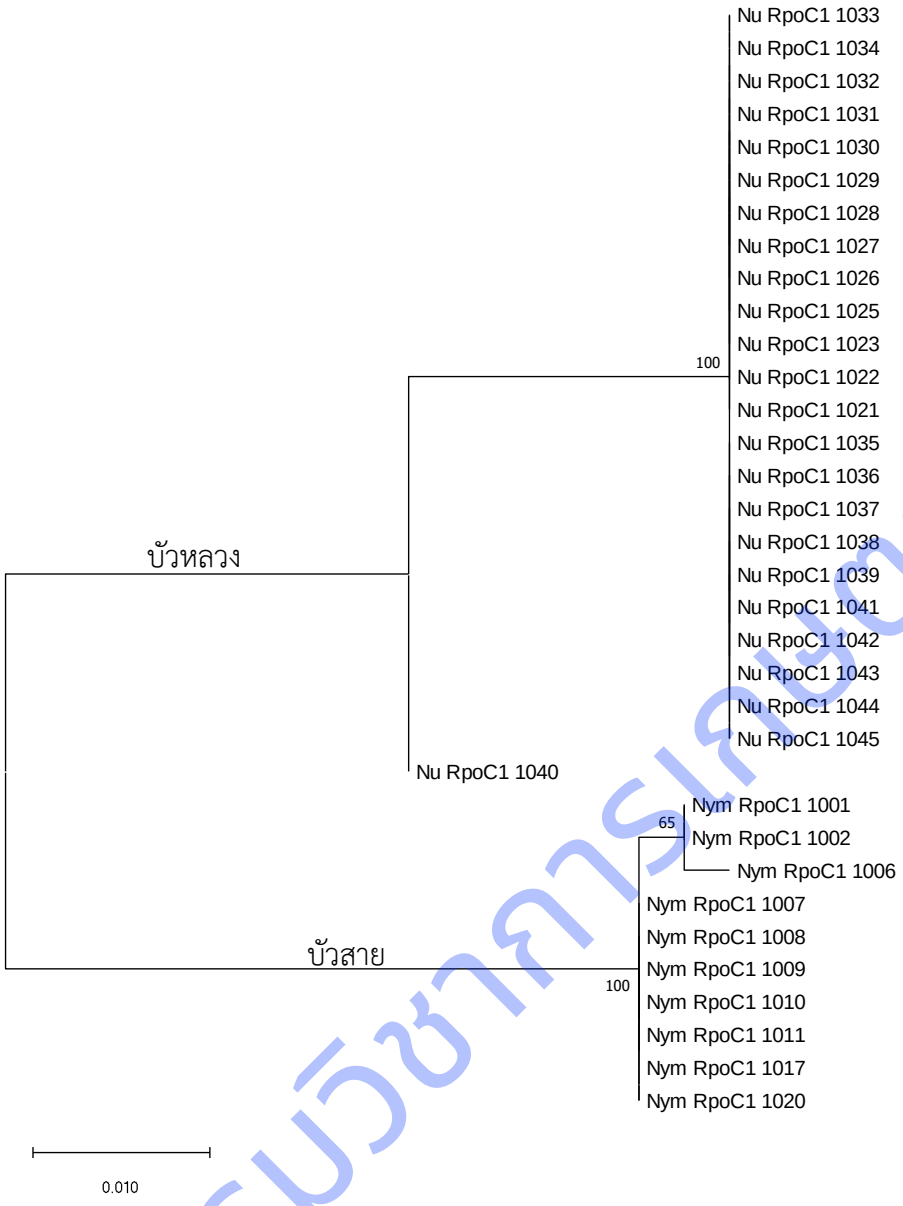
ภาพที่ 1.3.8 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 34 ตัวอย่าง จากยีน *RbcL* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.3.3 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	0.029	0.029	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	0.029	0.028	0.028	0.031	0.001																							
Nu_RbcL_1023	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.029	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	0.029	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	0.029	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	0.029	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	0.029	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	0.029	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	0.029	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	0.029	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	0.029	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	0.029	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	0.029	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	0.029	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	0.029	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										
Nu_RbcL_1037	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.029	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_1038	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.029	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								
Nu_RbcL_1039	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.029	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_1040	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.029	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_1041	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.029	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_1042	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.029	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_1043	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.029	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_1044	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.029	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_1045	0.030	0.030	0.031	0.028	0.028	0.028	0.029	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	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย



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

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.3.4 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	0.018					
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	0.018	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	0.018	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	0.018	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	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	

กรมวิชาการเกษตร

2. การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างบัว

การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างบัวได้คัดเลือกชิ้นส่วนยีนที่ศึกษาไว้ในขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์บาร์โค้ดสากลของพืชกับตัวอย่างบัว 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 แบ่งเป็นบัวหลวง 110 ตัวอย่าง และบัวสาย 52 ตัวอย่าง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างบัวทั้งหมดถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยยีน *ITS* ทำการวิเคราะห์ทางด้านปลาย 5’ และ 3’ ส่วนยีน *rpoC1* ทำการวิเคราะห์เฉพาะด้านปลาย ปลาย 5’ จากนั้นทำการตรวจสอบและคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีภาพโครมาโตแกรมที่สมบูรณ์ มาเปรียบเทียบกันทุกตัวอย่างด้วยโปรแกรม Clustal Omega เพื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เหมาะสม และได้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความยาวเท่ากัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGAx ตามรายงานของ Kumar *etal*., 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 (tansition mutation) และการเปลี่ยนแปลงลำคับคู่เบสในดีเอ็นเอต่างชนิดกัน (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) โดยมีค่าดัชนีระยะห่างพันธุกรรมสูงสุดอยู่ที่ 0.08 การทำ alignment ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับคู่เบสในบัวหลวง (ภาพที่ 1.3.14) แต่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอประเภทเดียวกัน และการเปลี่ยนแปลงลำคับคู่เบสในดีเอ็นเอต่างชนิดกันในบัวสาย (ภาพที่ 1.3.15) ทั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างบัวทั้งหมดจะนำไปลงทะเบียนในฐานข้อมูล NCBI ต่อไป อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงร่วมกับการลงทะเบียนจะช่วยความน่าเชื่อถือมากขึ้น การทดลองนี้ได้วิจัยไปควบคู่การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของบัวในการทดลองอื่นๆ ของทางสถาบันวิจัยพืชสวนและพืชสวนศรีสะเกษ นอกจากนี้การปลูกประสบกับปัญหาโรคและแมลงที่ทำลายต้นบัวที่เก็บอนุรักษ์ไว้ จึงทำให้ได้ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงเพียง 20 ตัวอย่าง และมีสภาพที่ไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 1.3.16)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.3.5 รูปแบบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์

รูปแบบ	รายละเอียด
Transition mutation	เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอประเภทเดียวกัน ได้แก่ - เปลี่ยนจากเบส Purine เป็นเบส Purine เช่น เปลี่ยนเบส Adenine เป็นเบส Guanine - เปลี่ยนจากเบส Pyrimidine เป็นเบส Pyrimidine เช่น เปลี่ยนเบส Cytosine เป็นเบส Thymine
Transversion mutation	เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอ็นเอต่างชนิดกัน ได้แก่ - เปลี่ยนจากเบส Purine เป็นเบส Pyrimidine เช่น เปลี่ยนเบส Adenine เป็นเบส Thymine - เปลี่ยนจากเบส Pyrimidine เป็นเบส Purine เช่น เปลี่ยนเบส Cytosine เป็นเบส Guanine

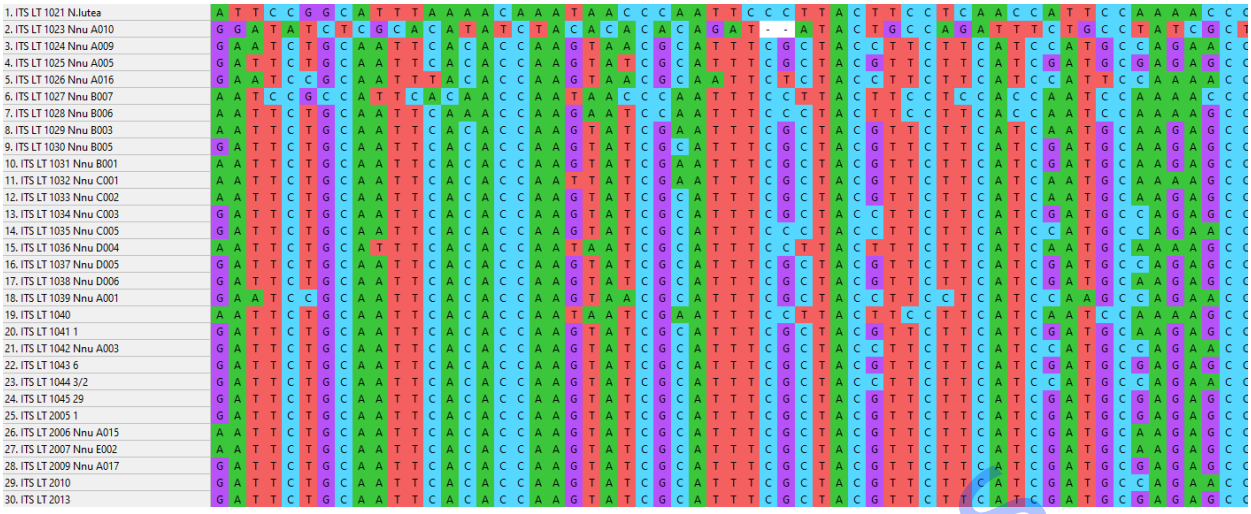
แหล่งที่มา: Yao *et al*., 2017

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชมีประโยชน์หลายด้านและได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในปัจจุบันแต่การนำมาประยุกต์ใช้จริงยังมีปัญหาและข้อจำกัดหลายประการและการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานเพียงบริเวณเดียวไม่สามารถระบุชนิดพืชได้แม่นยำเท่ากับการใช้มากกว่าหนึ่งบริเวณแม้ว่าจะมีรายงานการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานบริเวณอื่นเพิ่มเติมขึ้นมาแต่ยังไม่มีบริเวณใดที่เหมาะสมกับพืชทุกกลุ่มซึ่งทำให้การใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชยังไม่สมบูรณ์แบบพอที่จะนำไปใช้ได้กับพืชทุกกลุ่มได้ นอกจากนี้ข้อจำกัดในการใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดพืชละข้อพึงระวังหลายประการโดยเฉพาะขั้นตอนการสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดต้องอาศัยความรู้ทางด้านอนุกรมวิธานอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ดังนั้น การไปประยุกต์ใช้ในพืชต้องตระหนักถึงข้อจำกัดของดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งจะทำให้สามารถเลือกใช้ข้อมูลได้ถูกต้องและน่าเชื่อถือ ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะก้าวหน้ามากขึ้นอย่างไรก็ตามดีเอ็นเอบาร์โค้ดไม่สามารถมาทดแทนศาสตร์ทางด้านอนุกรมวิธาน แต่สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบการระบุชนิดหรือกลุ่มพืชได้

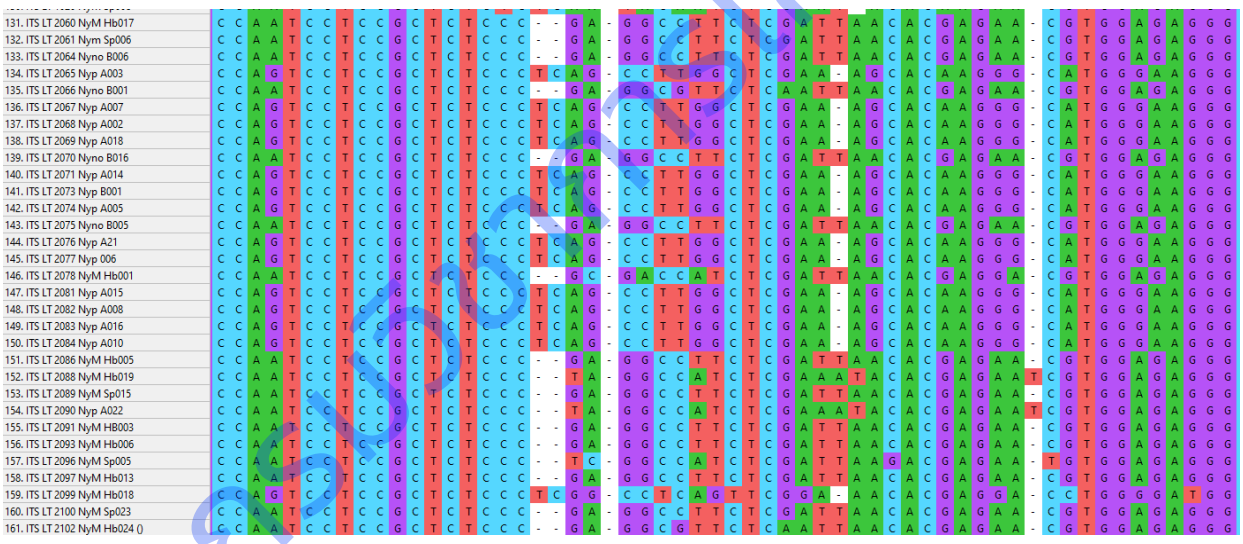
กรมวิชาการเกษตร

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

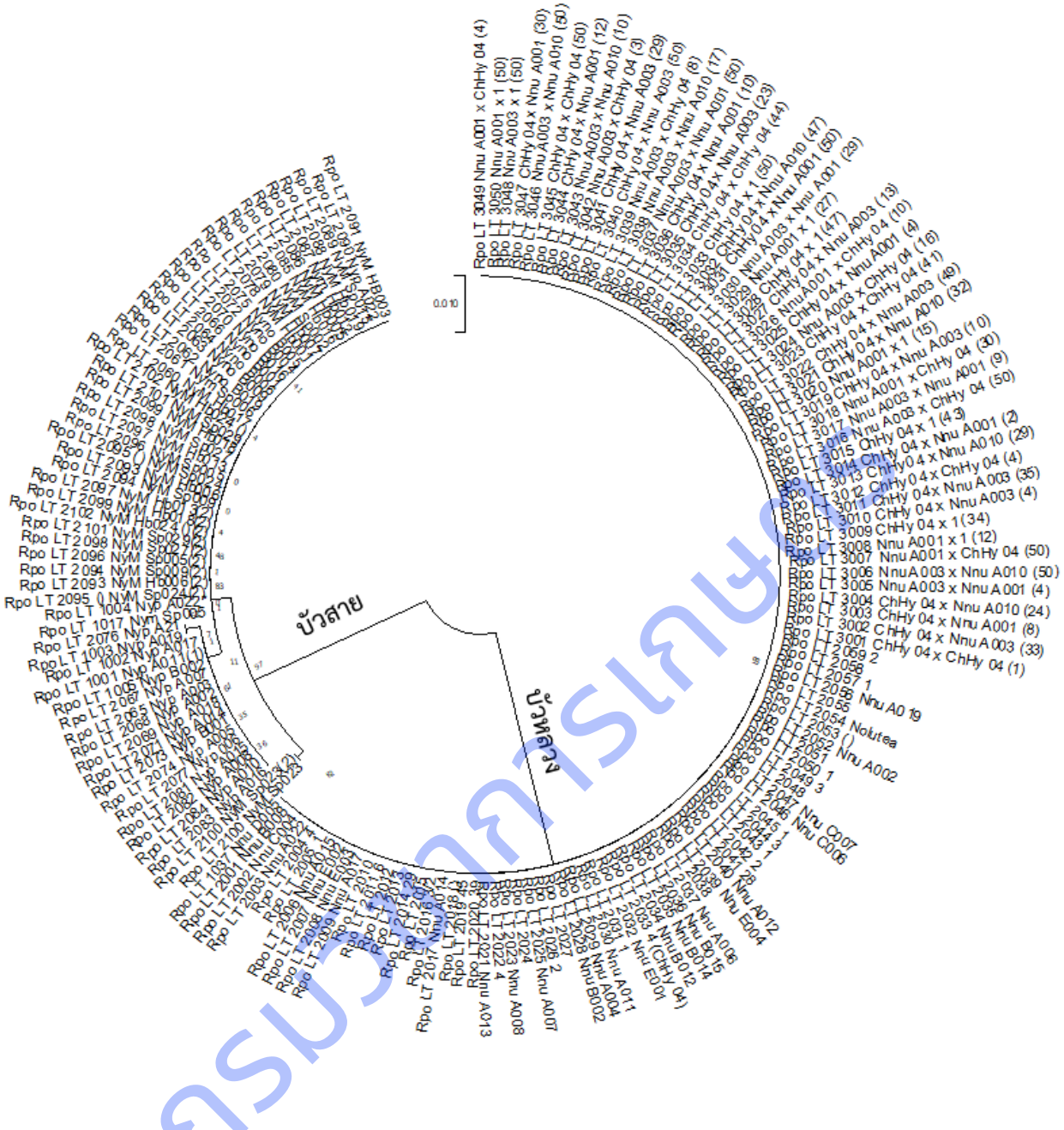
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.3.11 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*ตัวอย่างบัวหลวงด้วยโปรแกรม MEGAx

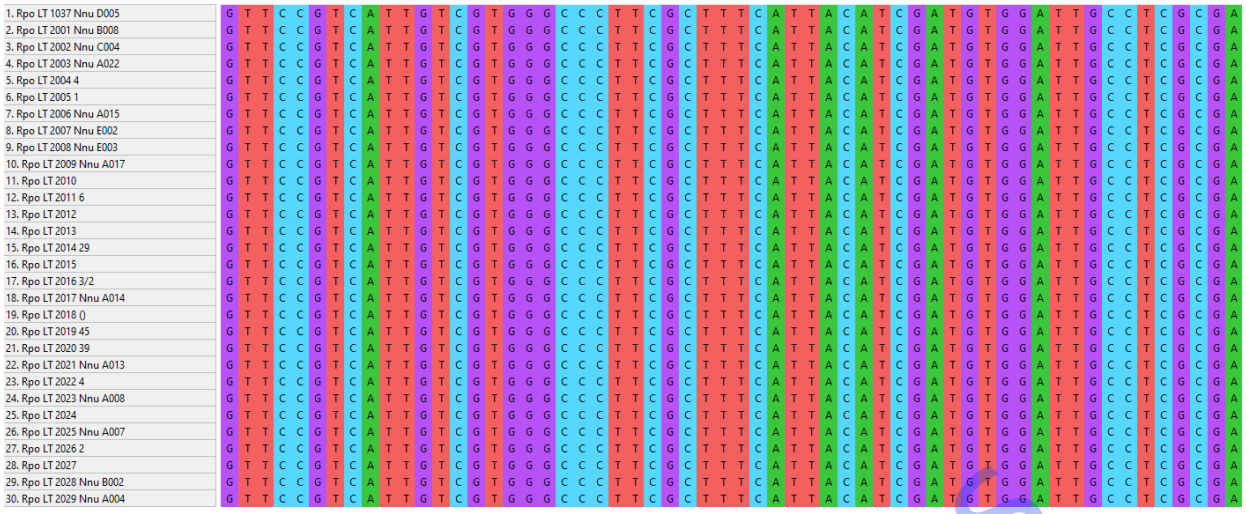


ภาพที่ 1.3.12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*ตัวอย่างบัวสายด้วยโปรแกรม MEGAx

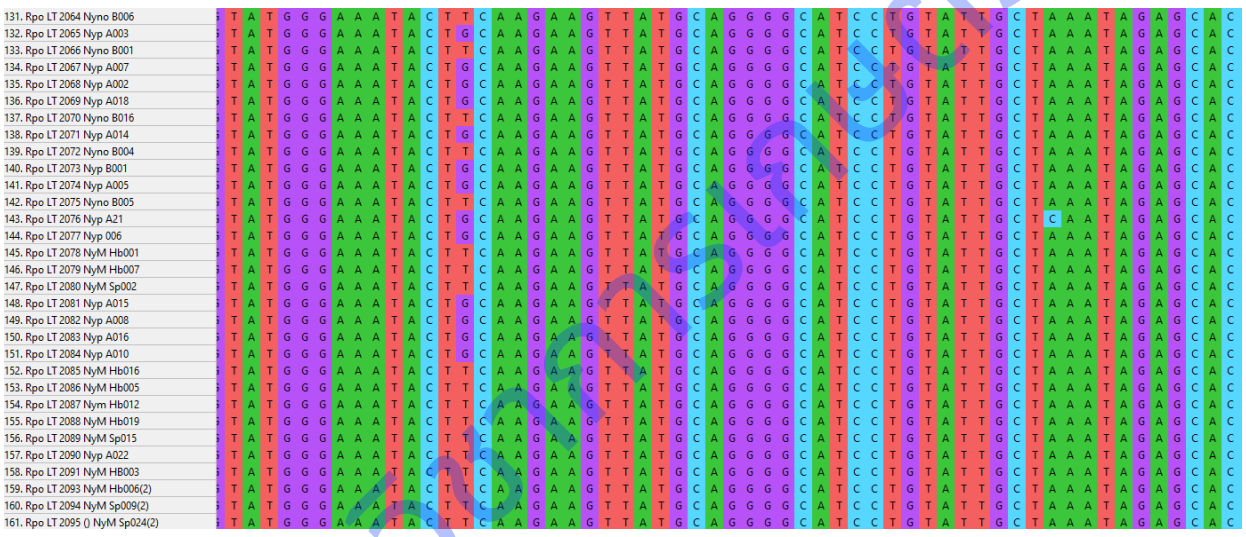


ภาพที่ 1.3.13 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างบัว จำนวน 162 ตัวอย่าง จากยีน *RpoC1* ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า Boot strap จำนวน 1,000 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษ



ภาพที่ 1.3.14 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*ตัวอย่างบัวหลวงด้วยโปรแกรม MEGAx



ภาพที่ 1.3.15 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*ตัวอย่างบัวหลวงด้วยโปรแกรม MEGAx

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

การทดลองที่ 1.4 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของพืชวงศ์กล้วยไม้ที่มีศักยภาพเป็นพืชสมุนไพร

1) เก็บรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้สมุนไพรได้ 40 พันธุ์ ประกอบด้วยมัจฉาชมพู, เก้ากิ่ว, เหลืองจันทบูร, เดลิไอขาว, เหลืองจันทบูร, มัจฉาขาว, หวายตะมอย, กระเรกระร่อน, เอื้องเงินแดง, เอื้องสายลาว, เอื้องช้างน้าว, เอื้องจำปา, เอื้องแปรงสีฟัน, เอื้องม่อนใช่, เอื้องสายไหม, เอื้องคำตาดำ, เอื้องสายน้ำผึ้ง, เอื้องสายม่วง, เอื้องสายมรกต, เอื้องสายนกกระจิบ, เอื้องสายแส้พระอินทร์, เอื้องสายคำปอน, เข็มแสด, สิงโตใบพัดแดง, เอื้องแซะ, เอื้องเทียน, ช้างดำ, กุหลาบกระบี่, สิงโตนักกล้าม, เอื้องเทียน, เอื้องเงินหลวง, ตอติเล, เข็มเหลือง, เข็มม่วง, เอื้องกุหลาบ (กระเป๋าเปิด), ช้างกระ, ไอยเรศ, กุหลาบแม่เมย, กุหลาบน่าน, หางกระรอกและจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงได้ 40 ตัวอย่าง

2) สกัดตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิงของพันธุ์กล้วยไม้สมุนไพรได้ 39 ตัวอย่าง วิเคราะห์ข้อมูลดีเอ็นเอด้วยยีนที่จำเพาะสูงกับดีเอ็นเอมาตรฐานได้ 4 ยีน คือ *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* และ *ITS* ได้ยีนละ 20 ตัวอย่าง รวมได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 80 ข้อมูล

3) จัดทำฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพและข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพันธุ์กล้วยไม้สมุนไพรได้ 39 ข้อมูลพันธุ์พืช

การทดลองที่ 1.5 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริก

1) เก็บรวบรวมพันธุ์พริกได้ 84 พันธุ์ ประกอบด้วย พิจิตร 05, พิจิตร 25-1-1-1, พิจิตร 27-2-1-1-1, พริก ศก. 13, พริกช่อ 1, พริกดอเรืองทรัพย์, พริกยอดสน #2, พริกยอดสน #3, พริกเหลืองน้ำส้ม, พริก #1, พริกกะเหรี่ยง, พริก #7, พริก #8 ขาว, พริก #8 เขียว, พริกบางช้าง 1, พริกบางช้าง 2, พริกบางช้าง 3, พริกบางช้าง 4, พริกบางช้าง 5, พริกบางช้าง 6, พริกจินดา (7 ตัวอย่าง), พริกเดือยไก่, พริกหยวกขาว, พริกหนุ่มเขียวมัน, พริกหนุ่มขาว, พริกเหลือง, พริกสร้อยไก่, พริกตุ้ม, พริกดำระยอง, พริกขี้หนูหัวเรือ ศก.13, พริกขี้หนูสวน (3 ตัวอย่าง), พริกขี้หนูสวน กจ. 8-6-10-1-2, พริกขี้หนูสวน กจ. 1, พริกขี้หนูขาว, พริกไส้เดือน, พริกฟักทอง, พริกจาราปิโน่, พริกหวานยักษ์ #1, พริกโจลอง, พริกยักษ์พันธุ์เขาวัว, พริกเลม่อนดรอป, พริกบุตโจโลเกีย, พริกเกาหลี, พริกเส้นยาว (2 ตัวอย่าง), พริกหวานเชอร์รี่, พริกเขาวัวยักษ์, พริกกะเหรี่ยงพัทลุง, พริกเหลืองพัทลุง, พริกขี้หนู(3 ตัวอย่าง), พริกแคโรไลนา รีพเปอร์, พริกบุตโจโลเกีย, พริกปีศาจ, พริกหยวก, พริกหวานยักษ์ #2, พริกหนุ่มยักษ์เขาแพะ, พริกยาว , พริกขี้หนูสวน ยะลา 1, พริกขี้หนูสวน ยะลา 2, พริกขี้หนูสวน ยะลา 3, พริกขี้หนูสวน ยะลา 5, พริกขี้หนูสวน ยะลา 13, พริกกะเหรี่ยง 1, พริกกะเหรี่ยง 3, พริกกะเหรี่ยง 4, พริกขี้หนูขาว, พริกจินดา 2, พริกจินดา 7, พริกจินดา 9, พริกจินดา 10, พริกกะเหรี่ยงยาว, พริกชี้ฟ้า(3 ตัวอย่าง) จัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงได้จำนวน 84 ตัวอย่าง และจัดเก็บเชื้อพันธุกรรมเมล็ดอ้างอิงได้ 84 ตัวอย่าง

2) สกัดตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิงของพันธุ์พริกได้ 84 ตัวอย่าง จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR กับไพรเมอร์จำเพาะของยีน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ คือ *ITS*, *rbcL*และ *trnH-psbA* และนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีนตำแหน่ง *rbcL*และ *trnH–psbA*มีโอกาสความสำเร็จมากที่สุดคิดเป็น 100% ส่วนตำแหน่ง *ITS* มีโอกาสความสำเร็จคิดเป็น 71% (ตารางที่ 1.5.1) โดยสามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ทั้งหมด จำนวน 228 เส้น ได้แก่ *ITS*จำนวน 60 เส้น *rbcL*จำนวน 84 เส้น และ*trnH–psbA* จำนวน 84 เส้น

3) วิเคราะห์ความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพริกจำนวน 84 ตัวอย่าง (3 ยีน) กับฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนตำแหน่ง*ITS rbcL*และ *trnH-psbA* สามารถจำแนกพริกในระดับสกุลได้ถูกต้อง คือ สกุล *Capsicum* โดยตำแหน่ง *ITS* สามารถระบุชนิดของพริกได้ 2 ชนิด คือ *C. baccatum*มีความเหมือนอยู่ที่ 92% และ *C. annuum* มีความเหมือนอยู่ที่ 92-99% ในขณะที่ไม่สามารถแยก *C. chinense*และ *C. frutescens*ออกจากกันได้ ในขณะที่ยีนตำแหน่ง *rbcL*และ *trnH-psbA* ใช้ในการจัดจำแนกพริก *C. annuum* ออกจาก *C. baccatumC. chinenseC. frutescenC. pubescens* และ *C. annuum C. chinense* และ *C. frutescens* ตามลำดับ

ตารางที่ 1.5.1แสดงร้อยละความสำเร็จของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดแต่ละตำแหน่ง

ตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ด	**จำนวนตัวอย่าง**	**จำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ (เส้น)**	**ความสำเร็จในการวิเคราะห์ (%)**
ITS	84	60	71
rbcL	84	84	100
trnH–psbA	84	84	100
รวม	ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 228 เส้น		

4) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ในแต่ละตำแหน่งยีนของพริกจำนวน 84 ตัวอย่างด้วยวิธี maximum likelihood พบว่ายีนตำแหน่ง *ITS* สามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่ม I ประกอบไปด้วยพริก *C. chinense*และ *C. frutescens* กลุ่มที่ II ประกอบด้วยพริกชนิด *C. annuum* ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสีดอกที่เป็นสีขาว ขาวอมม่วง และสีม่วง และกลุ่มที่ III เป็นกลุ่มของพริก *C. baccatum*(ภาพที่ 1.5.1) จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าตำแหน่ง *ITS*เป็นตำแหน่งที่ดีสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับพริก โดย

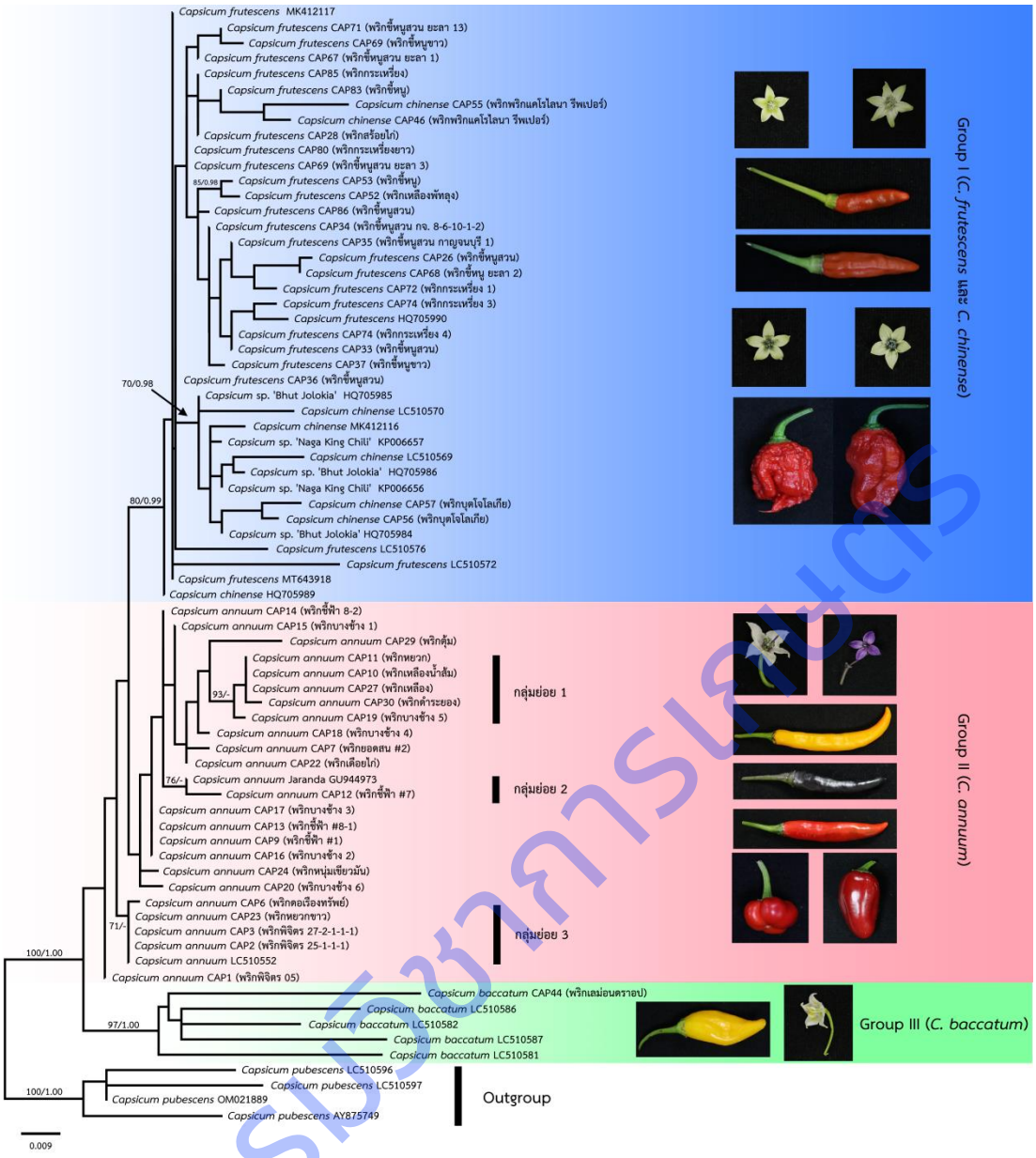
กรมวิชาการเกษตร

สามารถใช้จัดจำแนกพริก *C. annuum* และ *C. baccatum* ออกจากพริก *C. chinense*และ *C. frutescens*ในระดับชนิดได้ แต่ไม่สามารถจัดจำแนกระดับสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ซึ่งผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่ากลุ่ม *C. annuum*ในประเทศไทยอาจจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงในขณะที่ยีนตำแหน่ง*trnH-psbA*ไม่สามารถจัดจำแนกพริก *C. annuum C. chinense*และ *C. frutescens* ออกจากกันได้ ยกเว้น *C. baccatum* (ภาพที่ 1.5.2) และยีนตำแหน่ง *rbcL* นั้นพบว่าสามารถจัดจำแนกพริกในกลุ่ม *C. annuumC. baccatum* และ*C. pubescens* ออกจากกลุ่มพริก *C. chinense*และ *C. frutescens* ได้ แต่ไม่สามารถใช้จัดจำแนกในระดับชนิดภายในกลุ่มแต่ละกลุ่มได้ (ภาพที่ 1.5.3) โดยจากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่ายังไม่มีดีเอ็นเอบาร์โค้ด (*ITS rbcL*และ *trnH-psbA*) ที่สามารถใช้จำแนกชนิดพริก *C. chinense*และ *C. frutescens* ออกจากกันได้

5) จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าที่ตำแหน่ง *ITS*มีความแปรผันทางพันธุกรรมที่สูงกว่ายีนตำแหน่งอื่นๆ จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนของพริกจำนวน 49 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรม (haplotype diversity) ของพริกในประเทศไทย พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 20 haplotypes (h) (ภาพที่ 1.5.4) มีจำนวนความแปรผันของยีน 26 ตำแหน่ง (26 variation sites) โดยทั้ง 20 haplotypes ประกอบไปด้วย 3 กลุ่มประชากรที่มีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการก่อนหน้านี้ด้วยยีนตำแหน่ง *ITS* (ภาพที่ 1.5.1)

6) จัดทำฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพและข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพันธุ์พริกได้ 84 ข้อมูลพันธุ์พืช

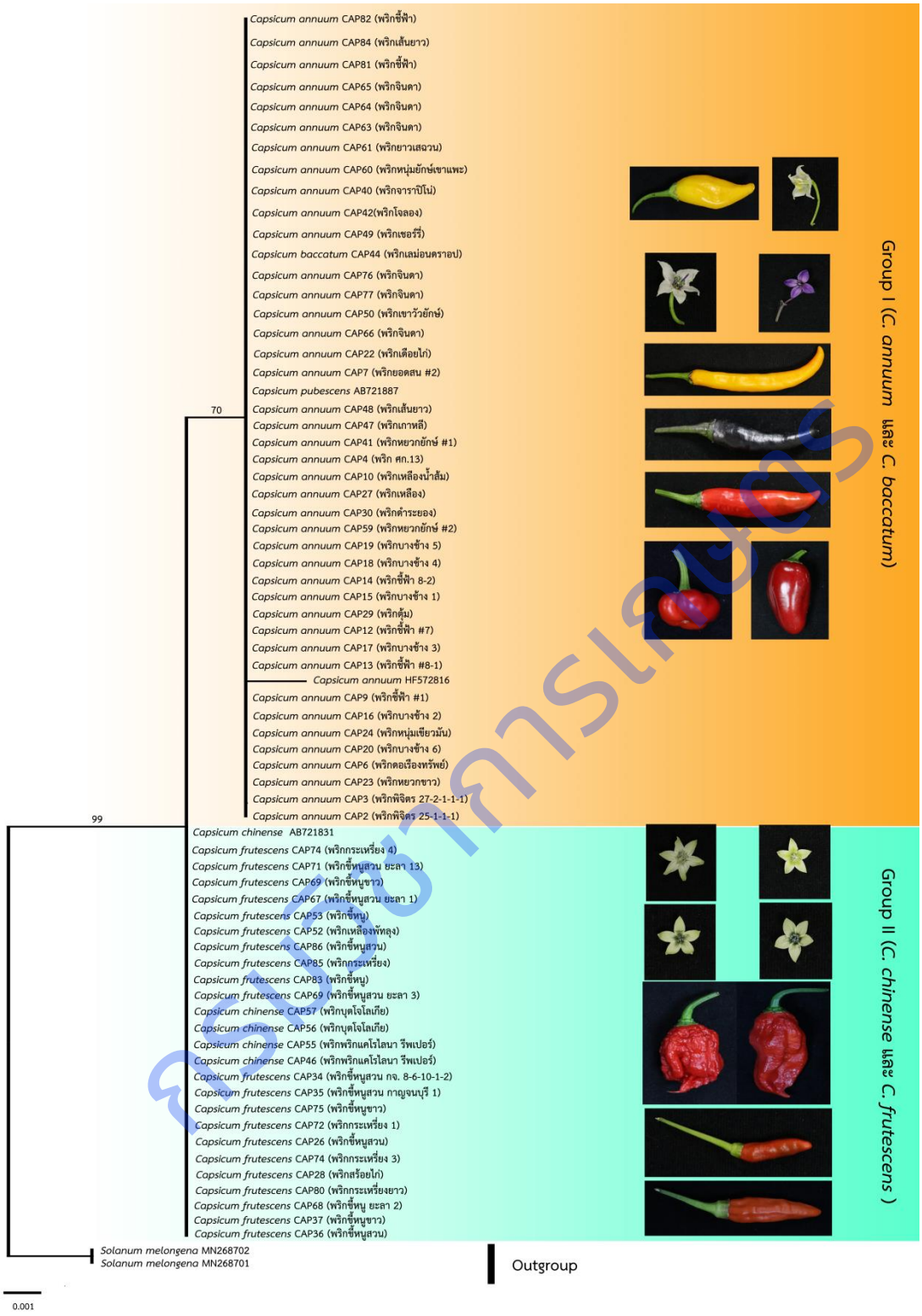
กรมวิชาการเกษตร



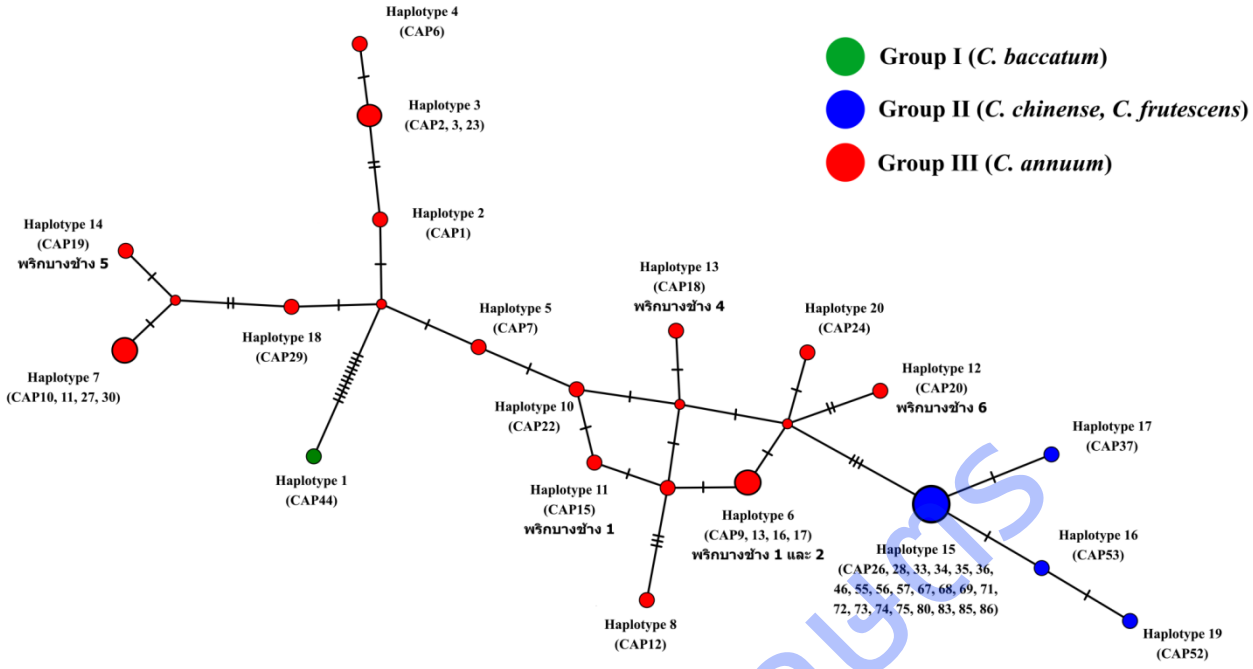
ภาพที่ 1.5.1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพริกในประเทศไทยที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *ITS*

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ภาพที่ 1.5.2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพริกในประเทศไทยที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *rbcL*



ภาพที่ 1.5.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพริกในประเทศไทยที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *trnH-psbA*



ภาพที่ 1.5.4 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม (haplotype diversity) ของยีนต าแหน่งITS ของพริกในประเทศไทย

กิจกรรมที่ 2 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชไร่

<u>การทดลองที่ 2.1ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายของพันธุกรรมของมันสำปะหลัง</u>

1.1 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง

การบันทึกลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังเพื่อตรวจสอบให้มั่นใจว่าตัวอย่างที่เก็บมาใช้ในงานวิจัยมีความถูกต้องตรงตามลักษณะประจำพันธุ์ ซึ่งจากการบันทึกข้อมูล พบว่า 1) สียอดอ่อน สามารถแบ่งออกได้เป็น 7 สี ดังนี้ สีเขียวอ่อน สีเขียว สีม่วงอมเขียว สีม่วงอมน้ำตาล สีม่วง สีเขียวอมม่วง สีน้ำตาลอมเขียว 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 สีน้ำตาลอมเหลือง สีน้ำตาลอมส้ม สีน้ำตาลอ่อน 7) การมีขั้วของหัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ ดังนี้ มีขั้วของหัว และไม่มีขั้วของหัว 8) สีผิวเปลือกชั้นนอกของหัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 สี ดังนี้ สีน้ำตาลอ่อน สีขาวครีม สีน้ำตาล สีน้ำตาลเข้ม9) สีเนื้อของหัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 สี ดังนี้ สีขาว สีขาวครีม และสีเหลืองอ่อนข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์ถูกต้องตรงตามลักษณะประจำพันธุ์ ตัวอย่างเหล่านี้ได้ถูกดำเนินการเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้งเพื่อใช้เป็นพันธุ์ไม้อ้างอิงงานวิจัยไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร ซึ่งมีหมายเลขอ้างอิง (voucher specimen) ดังตารางที่ 2.1.1

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2.1.1หมายเลขอ้างอิงพรรณไม้แห้ง และหมายเลขเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK และ ITS2* ของมันสำปะหลัง
17 พันธุ์

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

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 ซึ่งข้อมูลนี้ยืนยันได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์มีความถูกต้อง และแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณทั้ง 4 ยีน นี้ทำได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR

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* มีตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ผันแปรระหว่างพันธุ์ดังตารางที่ 2.2.1.4 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 ระยอง72 ตำแหน่งที่ 120

กรมวิชาการเกษตร

แสดงเอกลักษณ์จำเพาะของพันธุ์ Hanatee ตำแหน่งที่ 148 และ 249 แสดงเอกลักษณ์จำเพาะของพันธุ์ ระยอง3 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*และ*ITS2* ถูกจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูลสากล GenBank และได้รับหมายเลขเฉพาะ (accession number) ดังตารางที่ 2.1.1

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *ITS2* ของมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์ และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพาราเป็นตัวอย่างนอกกลุ่มมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี neighbor-joining โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 ซ้ำ พบว่า แผนภูมิของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK*แสดงให้เห็นว่ามันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 86-13 ถูกแยกออกมาจากมันสำปะหลังอื่น แต่ไม่สามารถพันธุ์มันสำปะหลังอีก 16 พันธุ์ได้ (ภาพที่ 2.2.1.1ก) ส่วนแผนภูมิของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *ITS2* (ภาพที่ 2.2.1.1ข) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มันสำปะหลังพันธุ์ห้านาทีซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองที่นิยมปลูกเพื่อรับประทานถูกแยกออกจากพันธุ์มันสำปะหลังอื่นๆ 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 เกษตรศาตร์ 50 ห้วยบง 60 พิรุณ 2 เมื่อพิจารณาภายในกลุ่มจะเห็นได้ว่าพันธุ์ระยอง 3 และระยอง 72 ถูกแยกออกจากกลุ่มได้

2. ผลของหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังจากแปลงการรักษาเชื้อพันธุกรรมแปลงพันธุ์ไทย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองจำนวน 120 พันธุ์ เก็บใบของแต่ละพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอ นำสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้ใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ universal primer ที่คัดเลือกแล้วจำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ rbcLFwd/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*สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะมีผลสำเร็จสูง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้ไพรเมอร์ matK_3F_KIM_A/1R_KIM ของบริเวณ *matK*และไพรเมอร์ ITS3/4 ของบริเวณ *ITS2* มีผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ 94 และ 91เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ หลังจากถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วถูกส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนที่ได้มาเรียงเทียบด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *rbcLTrnH-psbAและ matK* ไม่มีความผันแปรระหว่างพันธุ์ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *ITS2* มีความผันแปรระหว่างพันธุ์ 40 ตำแหน่งและได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด 26 รูปแบบ ดังนั้นจึงได้นำเอาเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *ITS2*มาใช้เป็นข้อมูลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า สามารถแบ่งกลุ่ม 6 กลุ่ม ดังภาพที่ 2.1.1 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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 ห้วยบง 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 ห้วยบง 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 MCOL22 CMR34-40-43 KM140 V1 YELLOWROOT CMR 31-42-20 CMR 25-221-384 CM3299-15 V11 CMR 23-149-117 CMR 23-4-8 CMR 23-281-141

จากการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังนี้ สามารถแยกยางพารา *Hevea brasiliensis*(KJ665775) ที่ใช้เป็น out group ได้

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.1.1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจำนวน 120พันธุ์และยางพาราเป็นตัวอย่างนอกกลุ่มจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* วิเคราะห์โดยโปรแกรม MEGA ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000ซ้ำ

3. ผลการทดสอบระบุพันธุ์มันสำปะหลัง

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่อายุประมาณ 4-5 เดือนจากแหล่งปลูกในพื้นที่อำเภอน้ำพอง และอำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 50 ตัวอย่าง (unknown 01-50) การบันทึกลักษณะประจำพันธุ์ พบว่า ลักษณะปรากฏที่บันทึกข้อมูลได้มีความคล้ายคลึงกันมาก ยกเว้นสีก้านใบ unknown 01-40 ก้านใบมีสีแดงเข้ม ส่วน unknown 41-50 ก้านใบมีสีแดง ซึ่งตรงกับลักษณะประจำพันธุ์ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50 ตามลำดับ เก็บใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS3/4 พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายมีผลสำเร็จสูง 100 เปอร์เซ็นต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ unknown 01-40 และ unknown 41-50 มีความเหมือนตรงกันกับหมายเลขเฉพาะ (GenBank accession number)MK809346และ MK809348 ในฐานข้อมูลสากล GenBank ดังตารางที่ 2.2.1.5 ซึ่งเป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50 ตามลำดับ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2การสร้างข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลือง

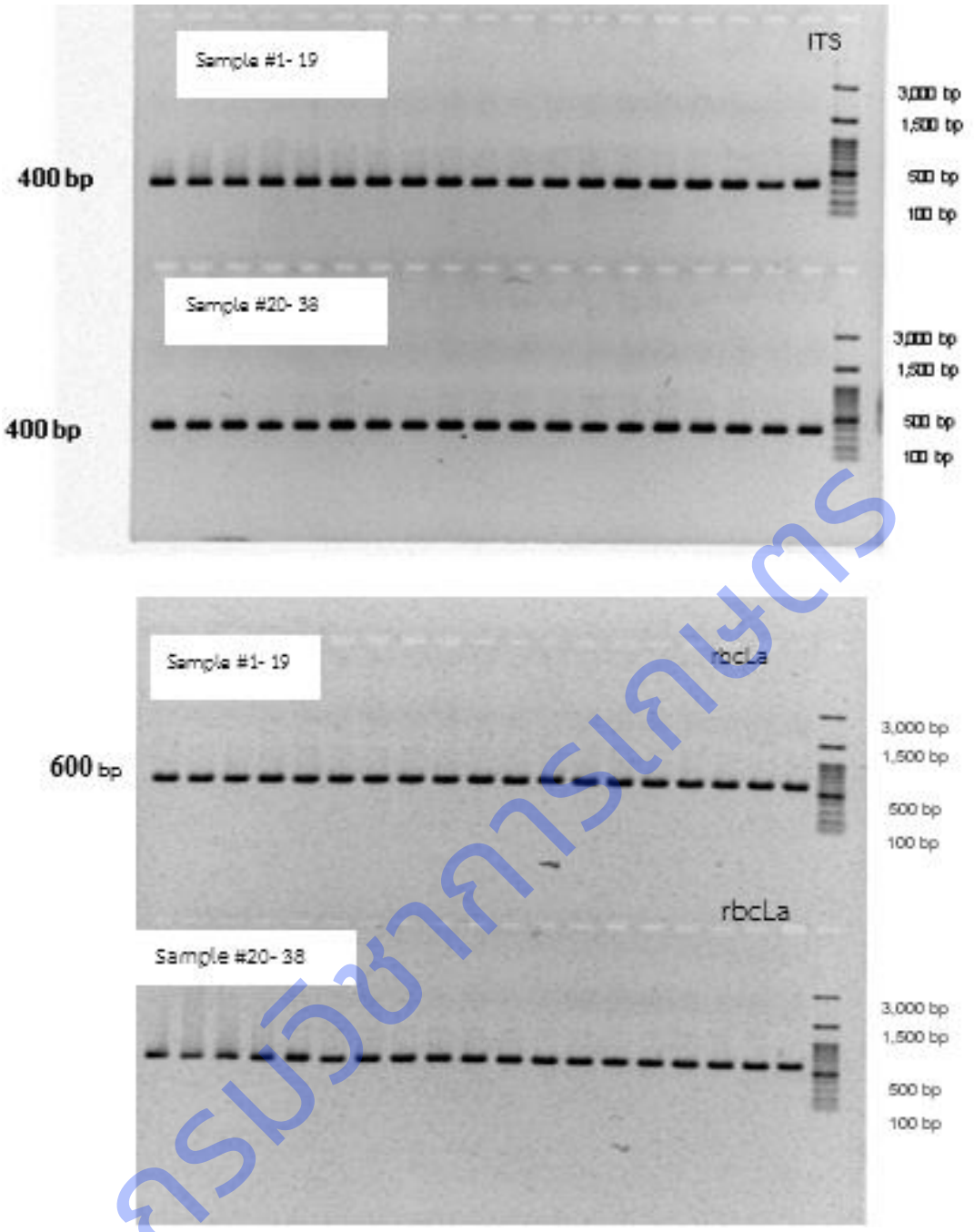
1. บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ (ตารางที่ 2.2.1 และตารางผนวกที่ 1) เก็บตัวอย่างใบ ต้น ดอกของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ จากแปลงปลูกถั่วเหลือง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ โดยเก็บเป็นตัวอย่างแห้งตามหลักมาตรฐานของกลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์ สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช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

ภาพที่ 2.2.1 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งถั่วเหลืองที่ดำเนินการจัดทำ จำนวน 40 สายพันธุ์/พันธุ์ โดยเก็บรักษา ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) และตรวจสอบแ ถ บดีเอ็นเอ

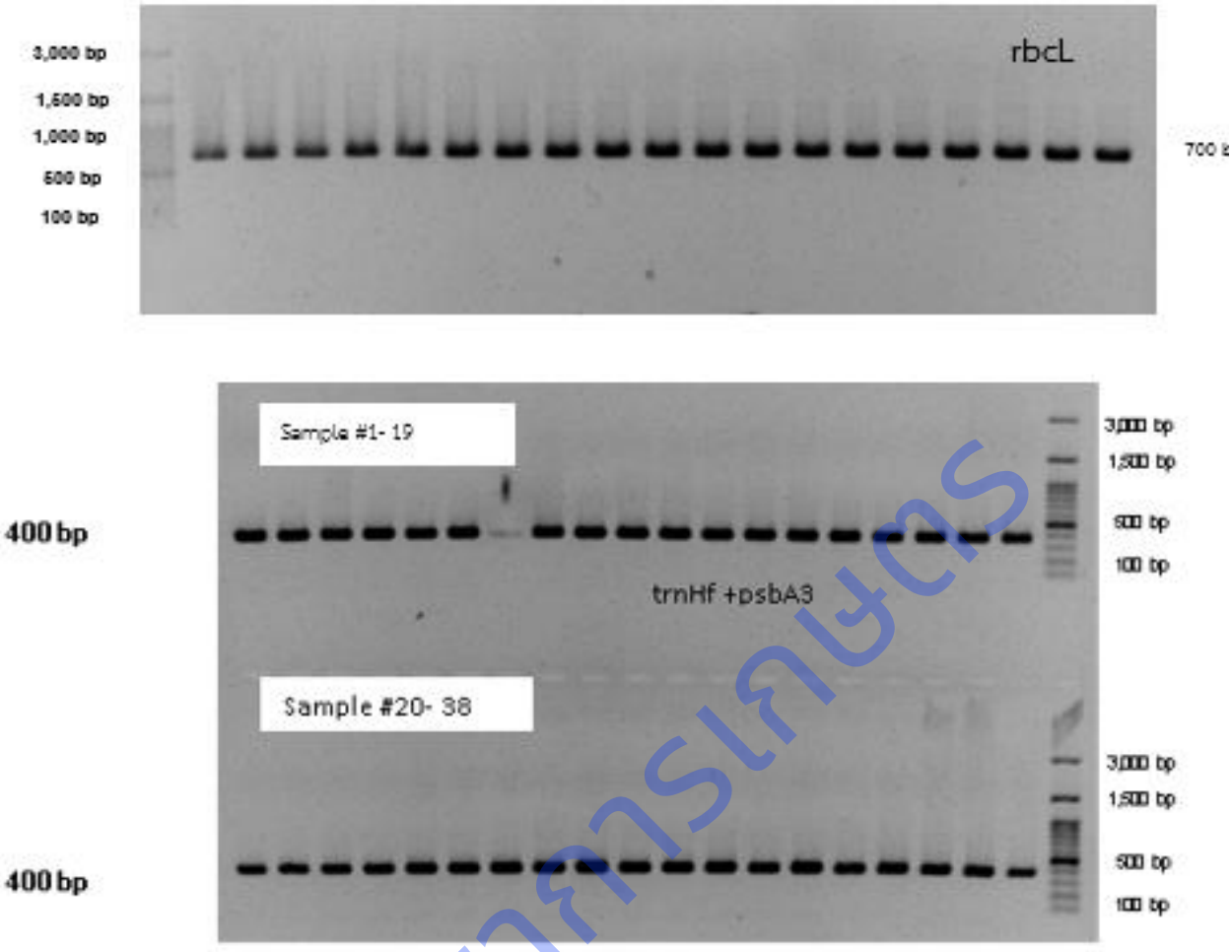
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์สากลของยีน 3 ตำแหน่ง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน ITS, rbcL และ rpoc1 ได้ขนาดประมาณ 400, 1,300 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 2.2.2)

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.2 ตัวอย่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน ITS, rbcLaของถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่าง ๆ ตามรายชื่อในตารางที่ 2.2.1



ภาพที่ 2.2.3 ตัวอย่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของrbcLและ trnHf+psbA3 ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่าง ๆ

3. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิต PCR ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS, rbcLa, rbcL,rbocL,trnHf+psbA3และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของถั่วเหลืองที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ 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 ยีน ITS, rbcL, , rpoCL, trnHf+psbA3

ยีน ITSอยู่บนนิวเคลียร์จีโนม (nuclear genome) นั้นเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ในถั่วเหลือง ทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ พบว่ามีขนาดประมาณ 400 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน*ITS* ด้วยโปรแกรม MEGA-X พบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ เท่ากับ 0.00-0.20พบว่าไม่สามารถจำแนกถั่วเหลืองแต่ละชนิดออกจากกันได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก

กรมวิชาการเกษตร

กล่าวคือมีรูปแบบการกลายแบบทรานสเวอร์ชัน (transversion) จาก pyrimidine (T) เป็น purine (A) .บนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 75 เพียงตำแหน่งเดียว

ยีน rbcLอยู่บนคลอโรพลาสต์จีโนม (Chloroplast genome) เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ Maximum Likelihood พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนั้น ไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ ออกจากกันทั้งหมด แยกได้เพียง 1 พันธุ์ คือ ‘ขอนแก่น (Khon Kaen)’

ยีน rpoC1 ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนคลอโรพลาสต์จีโนมเช่นเดียวกับ *rpcL* สามารถทำการแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ ‘ขอนแก่น (Khon Kaen)’ ออกจากถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้เพียงพันธุ์เดียว เช่นเดียวกับยีน *rpcL* โดยมีค่า log likelihood สูงสุดที่ -1783.58 ตามลำดับ โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงในยีน *rpoC1* จำนวน 100 ตำแหน่ง

กิจกรรมที่ 3ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชท้องถิ่น

การทดลองที่ 3.1ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์ศิลา (Aquifoliaceae)

1) ได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในปฏิกริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์ศิลา จากยีน 4 ตำแหน่ง คือ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*และ ITS (ตารางที่ 3.1.1)

2) ได้องค์ประกอบของสารเคมีในปฏิกริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส(ตารางที่ 3.1.2) และสภาวะเริ่มต้นของปฏิกริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส(ตารางที่ 3.1.3) ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชวงศ์ศิลา

3) ได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์และนิวเคลียร์ จำนวน 5 แผนภูมิ (ภาพที่ 3.1.1-3.1.5)

4) ได้ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง จำนวน 19 ตัวอย่าง และดีเอ็นเออ้างอิงของพืชวงศ์ศิลา (Aquifoliaceae) ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้จำนวน 54 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.1.4)

ตารางที่ 3.1.1 ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

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

กรมวิชาการเกษตร

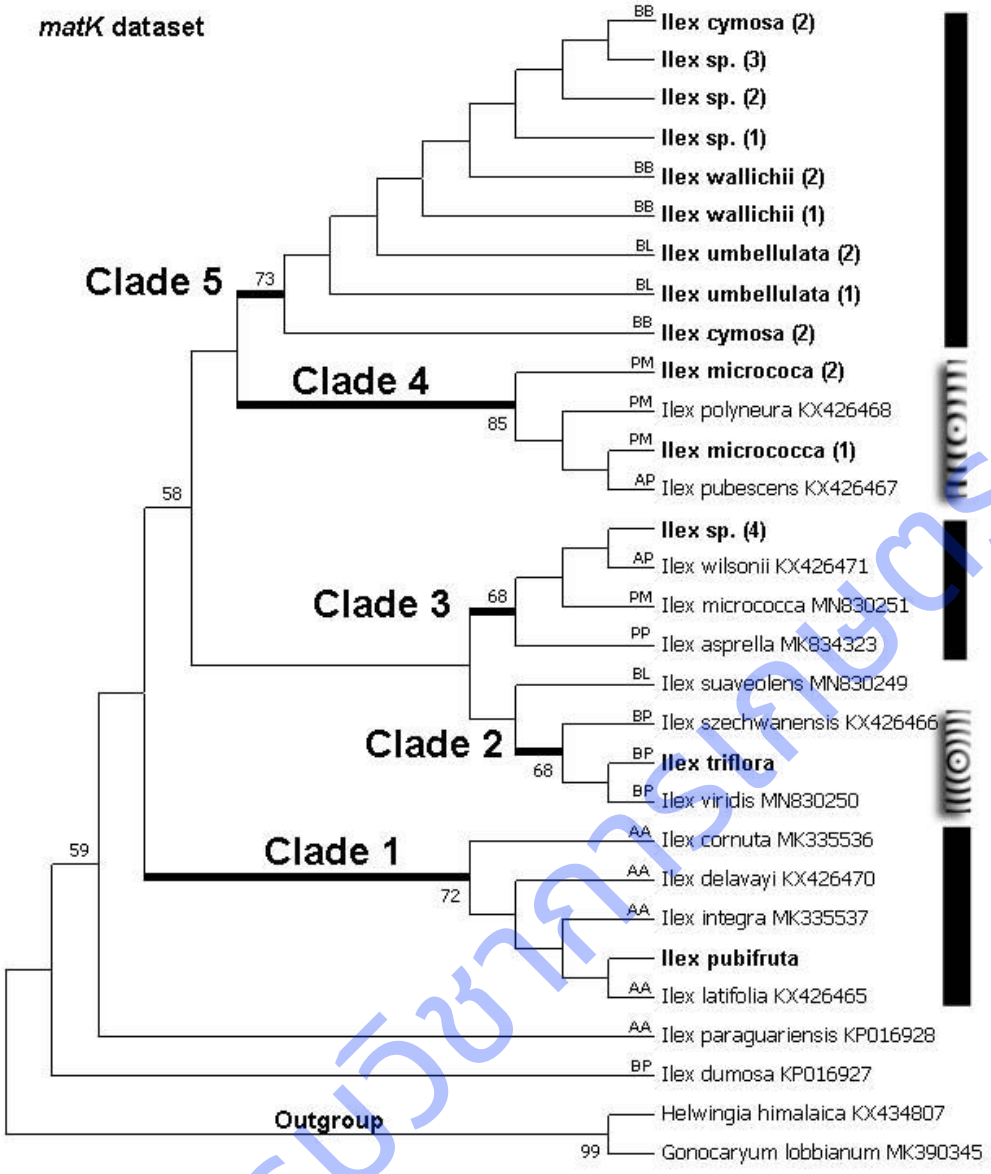
ตารางที่ 3.1.2องค์ประกอบของสารเคมีในปฏิกริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส

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_2O	18.75 µl	

ตารางที่ 3.1.3 สภาวะเริ่มต้นของปฏิกริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส

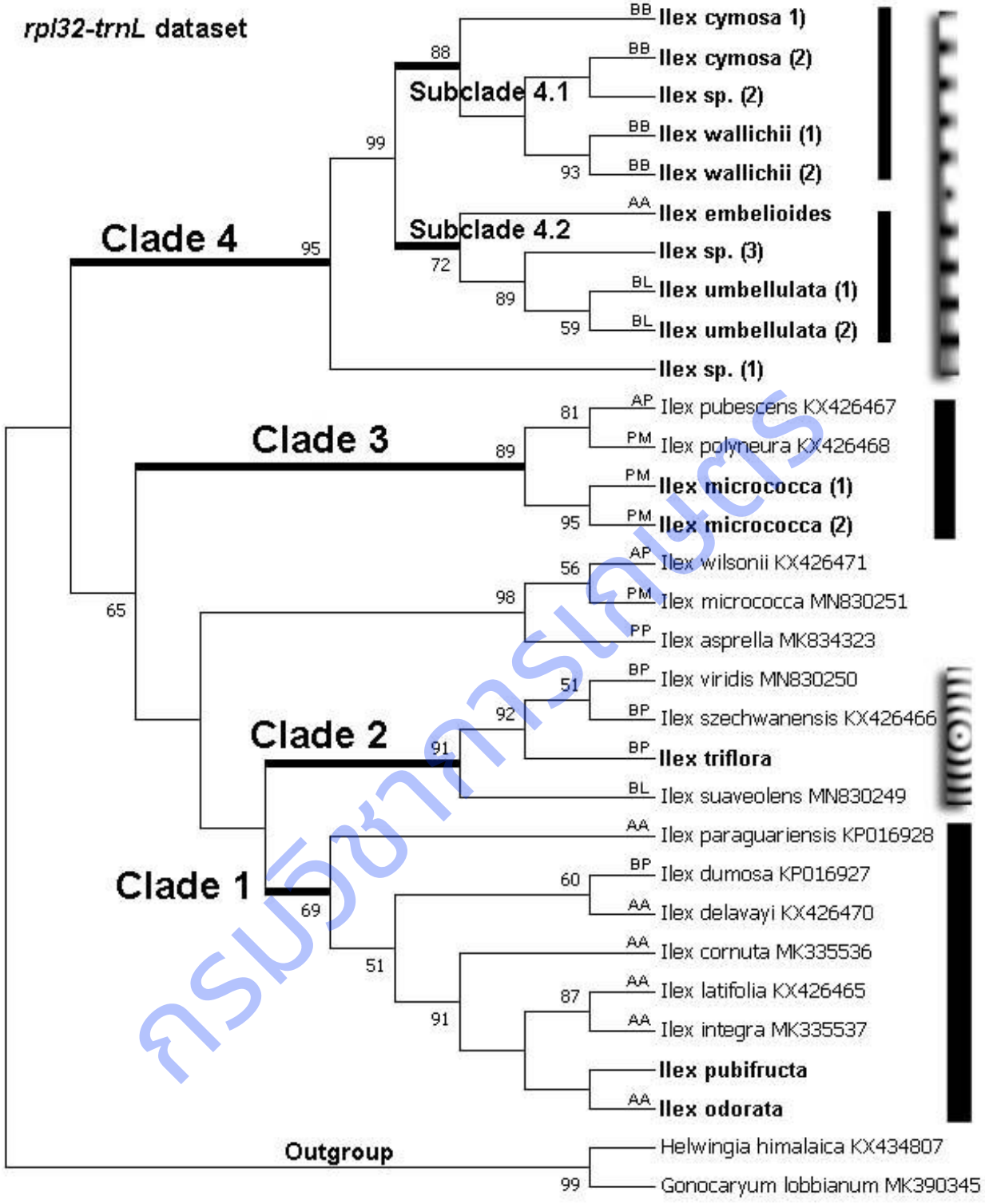
Cycle Step	Temperature	Time	Cycle(s)
Initial Denaturation	98°C	5 minutes	1
Denaturation	98°C	10 seconds	35
Annealing	54°C	10 seconds	
Extension	72°C	20 seconds	
Final extension	72°C	1 minutes	1
Hold	4°C	∞	

กรมวิชาการเกษตร



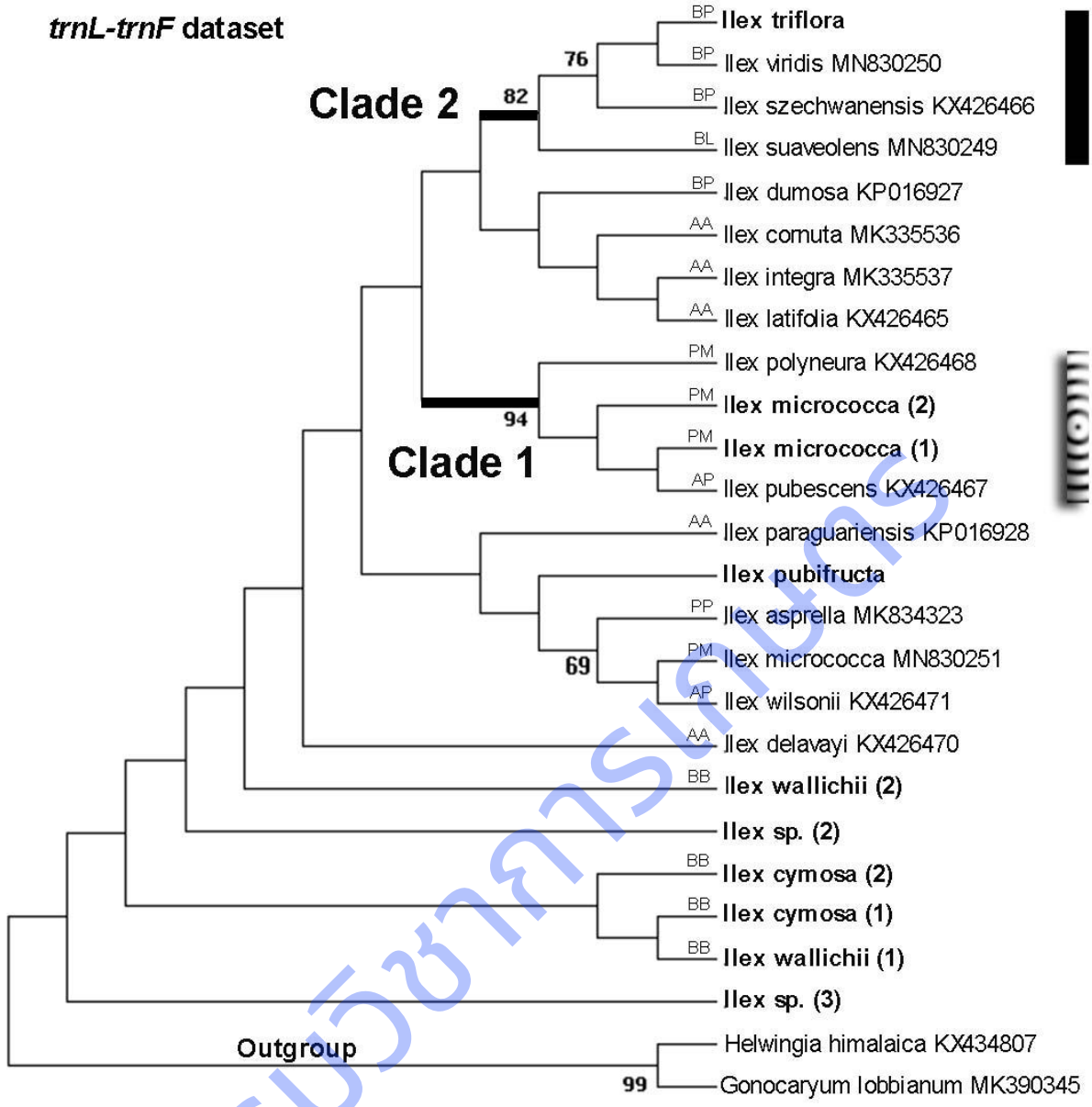
ภาพที่ 3.1.1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK*

กรมวิชาการเกษตร



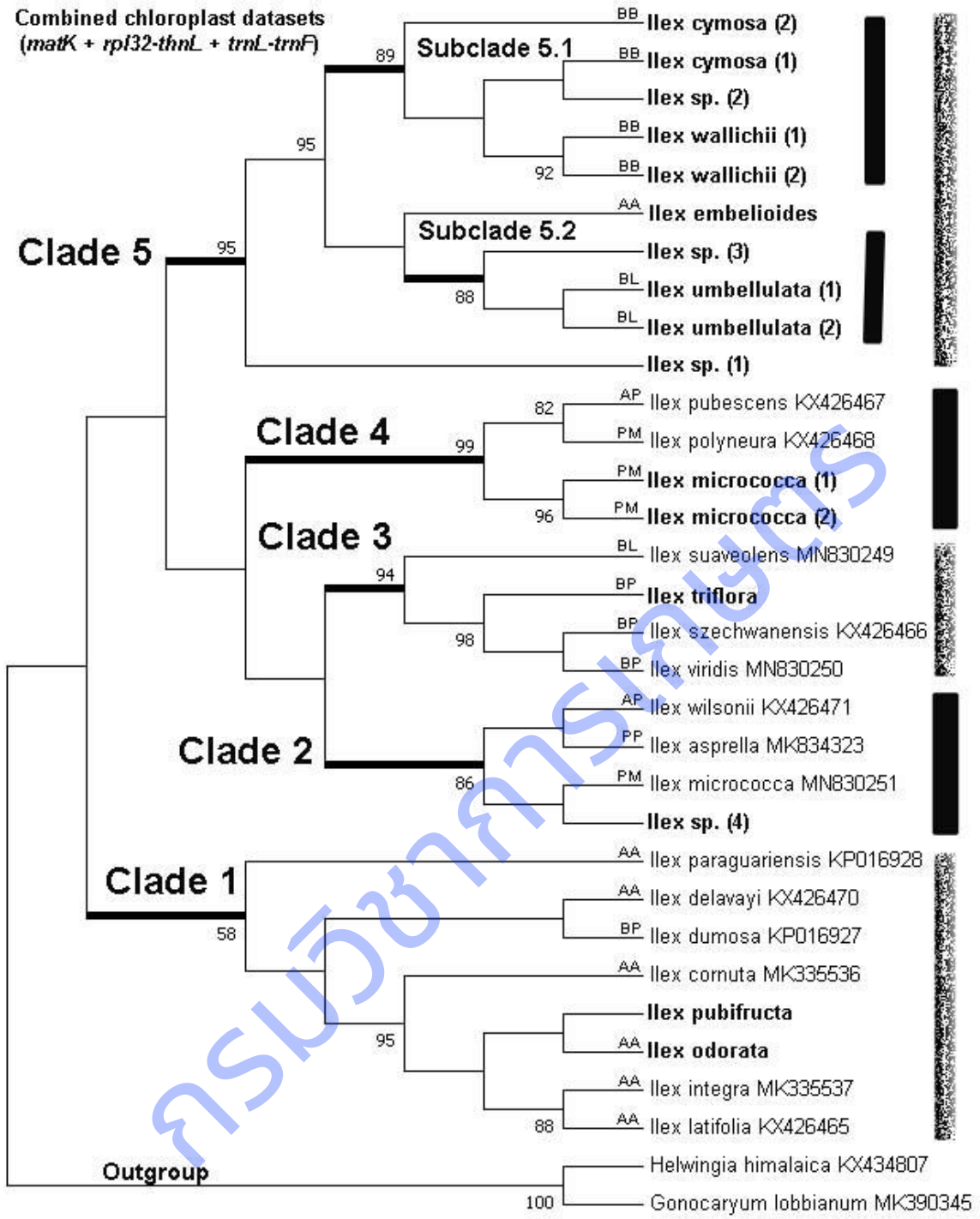
ภาพที่ 3.1.2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL*

กรมวิชาการเกษตร



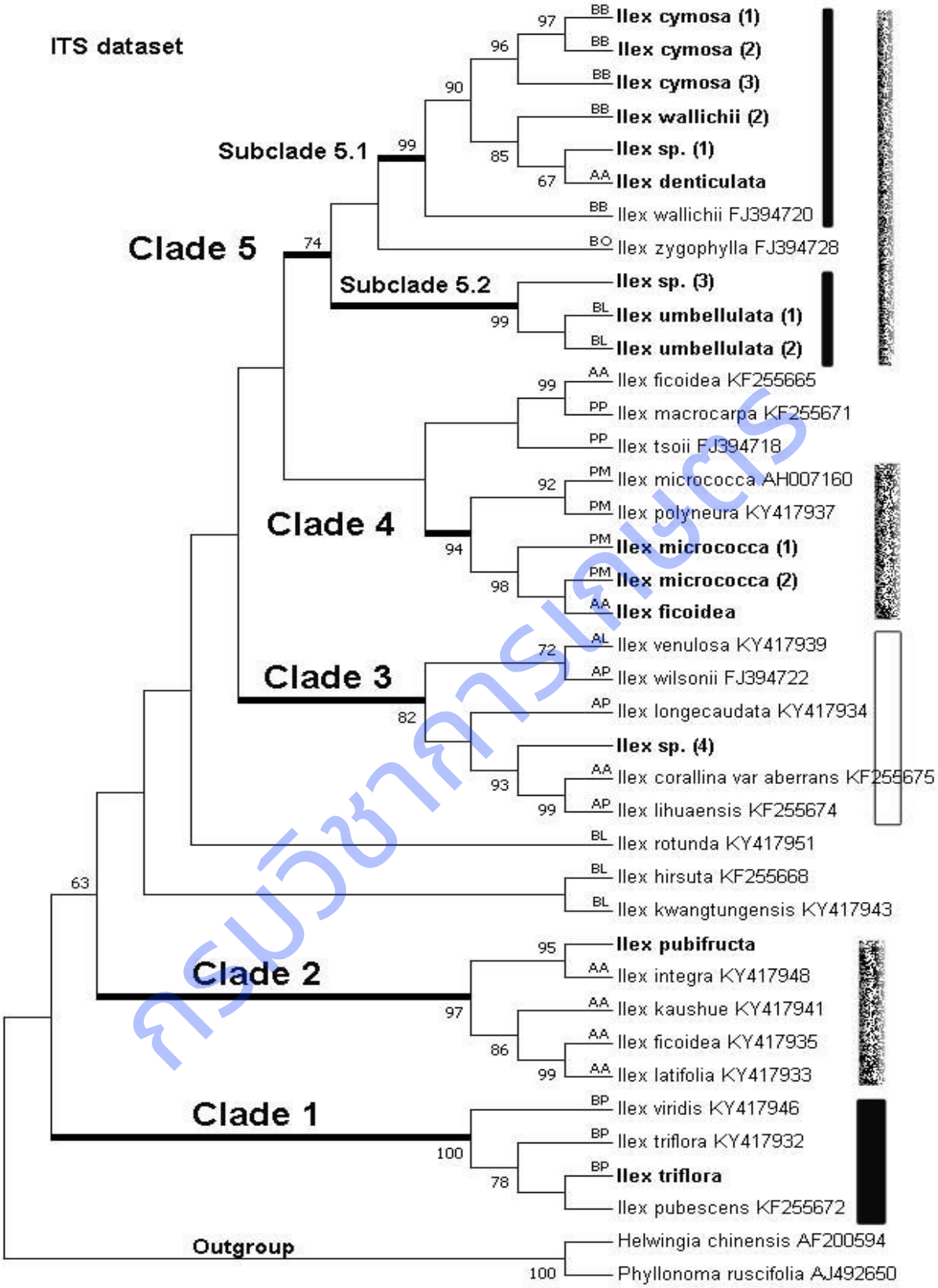
ภาพที่ 3.1.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF*

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3.1.4 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดร่วมกันของบริเวณคลอโรพลาสต์ (*matK+ rpl32-trnL + trnL-trnF*)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3.1.5 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณนิวเคลียร์ ITS

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่3.1.4 ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงและดีเอ็นเออ้างอิงของพืชวงศ์ศิลา (Aquifoliaceae) ที่ศึกษาใหม่

No.	Species	Specimen Voucher	GenBank Accession number			
			matK	*rpL32-trnL*	*trnL-trnF*	nrITS
1	*Ilex cymosa*Blume (1)	Rueangruea SR 82 (BKF)	MT114104	MT114089	MT114079	MT114118
2	*Ilex cymosa*Blume (2)	Pruesapan KP2018-1 (BK)	MT114105	MT114090	MT114080	MT114119
3	*Ilex cymosa*Blume (3)	Pruesapan KP2018-27 (BK)	NA	NA	NA	MT114120
4	*Ilex denticulata*Wall. ex. Wight	Gardner &Tippayasri ST 1769 (BKF)	NA	NA	NA	MT114121
5	*Ilex embelioides*Hook.f.	Takahashi & Tamura T-63342 (BKF)	NA	MT114091	NA	NA
6	*Ilex ficoidea*Hemsl.	Fukuoka T-63801 (BKF)	NA	NA	NA	MT114123
7	*Ilex micrococca* Maxim. (1)	Meewasana*et al.* KP2018-24 (BK)	MT114107	MT114092	MT114081	MT114124
8	*Ilex micrococca* Maxim. (2)	Meewasana*et al.* KP2018-25 (BK)	MT114108	MT114093	MT114082	MT114125
9	*Ilex odorata*Buch-Ham. ex D. Don	Pooma 1532 (BKF)	NA	MT114094	NA	NA
10	*Ilex pubifructa*Pruesapan, S. Andrews & D.A. Simpson	Pruesapan KP2017-1 (BK)	MT114109	MT114095	MT114083	MT114126
11	*Ilex* sp. (1)	KaeoKoon*et al.* KP2018-30 (BK)	MT114115	MT114101	NA	MT114131
12	*Ilex* sp. (2)	KaeoKoon*et al.* KP2018-31 (BK)	MT114116	MT114102	MT114087	NA
13	*Ilex* sp. (3)	Khiriwong&Pruesapan KP2018-32 (BK)	MT114117	MT114103	MT114088	MT114132
14	*Ilex* sp. (4)	Suddee*et al.* 4392 (BKF)	MT114106	NA	NA	MT114122
15	*Ilex trifloral*Blume	Suddee 5316 (BKF)	MT114110	MT114096	MT114084	MT114127
16	*Ilex umbellulata*(Wall.) Loes. (1)	Pruesapan 2015-1 (BK)	MT114111	MT114097	NA	MT114128
17	*Ilex umbellulata* (Wall.) Loes. (2)	Kertsawang 4621 (BK)	MT114112	MT114098	NA	MT114129

กรมวิชาการเกษตร

No.	Species	Specimen Voucher	GenBank Accession number			
			matK	***rpL32-trnL***	*trnL-trnF*	nrITS
18	*Ilex wallichii*Hook.f. (1)	Pruesapan KP2018-13 (BK)	MT114113	MT114099	MT114085	NA
19	*Ilex wallichii*Hook.f. (2)	Pruesapan KP2018-16 (BK)	MT114114	MT114100	MT114086	MT114130

การทดลองที่ 3.2 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปัญจขันธ์(*Gynostemmapentaphyllum* (Thunb.) Makino) พันธุ์พื้นเมืองและลูกผสม

1)ได้ลักษณะสัณฐานวิทยาของปัญจขันธ์พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม จำนวน 20 พันธุ์ (ตารางที่ 3.2.1และภาพที่ 3.2.1-3.2.2)

2) ได้ยีนที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปัญจขันธ์ได้สำเร็จ จำนวน 4 ยีน คือ*accD*, *petD*, *psbB*และ *ycf3* (ภาพที่ 3.2.3)

3) ได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปัญจขันธ์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ จำนวน 5 แผนภูมิ (ภาพที่ 3.2.4-3.2.6)

4) ได้ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงของปัญจขันธ์ จำนวน 20 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.2.2) และดีเอ็นเออ้างอิงของปัญจขันธ์(Aquifoliaceae) จำนวน 78 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.1.1)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3.2.1 แสดงลักษณะสัณฐานส่วนใบของปัญจขันธ์ที่มีอายุ 4 เดือน จำนวน 20 พันธุ์

ชื่อพันธุ์ปัญจขันธ์	วงใบ		จำนวนใบย่อย	ใบย่อยกลาง			
	รูปร่างวงใบ	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)		ขนาด (ซม.)	ความกว้าง/ยาวของใบ	ความยาวส่วนปลายใบ (มม.)	จำนวนหยักขอบใบต่อข้าง
เชียงราย 1	รูปไข่	13	5-7	4.5x8.5**	1.889*	5.5-7.5	8-14
เชียงราย 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
จีน-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
เชียงของ	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)

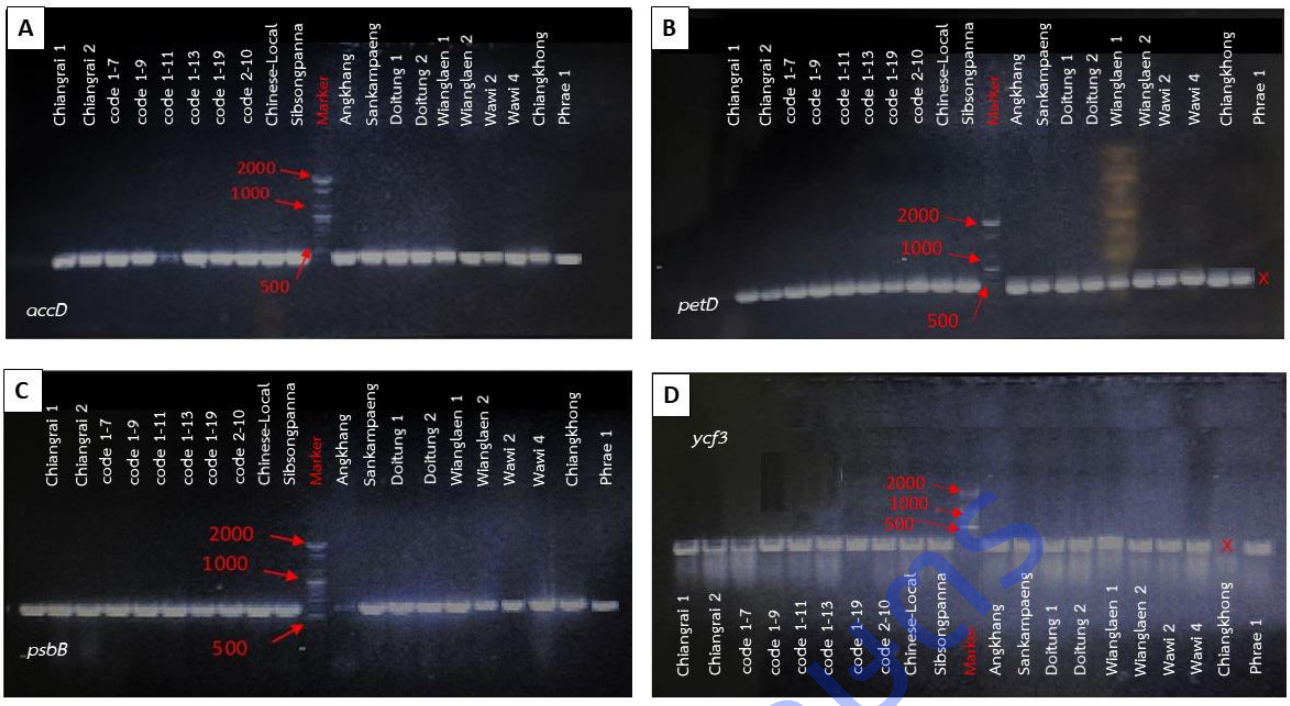
-อัตราความกว้าง/ความยาวของใบย่อยกลาง: * = รูปรีป้อม (1.5-<2), ** = รูปรี (2), *** = รูปรีขอบขนาน (>2)

กรมวิชาการเกษตร

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

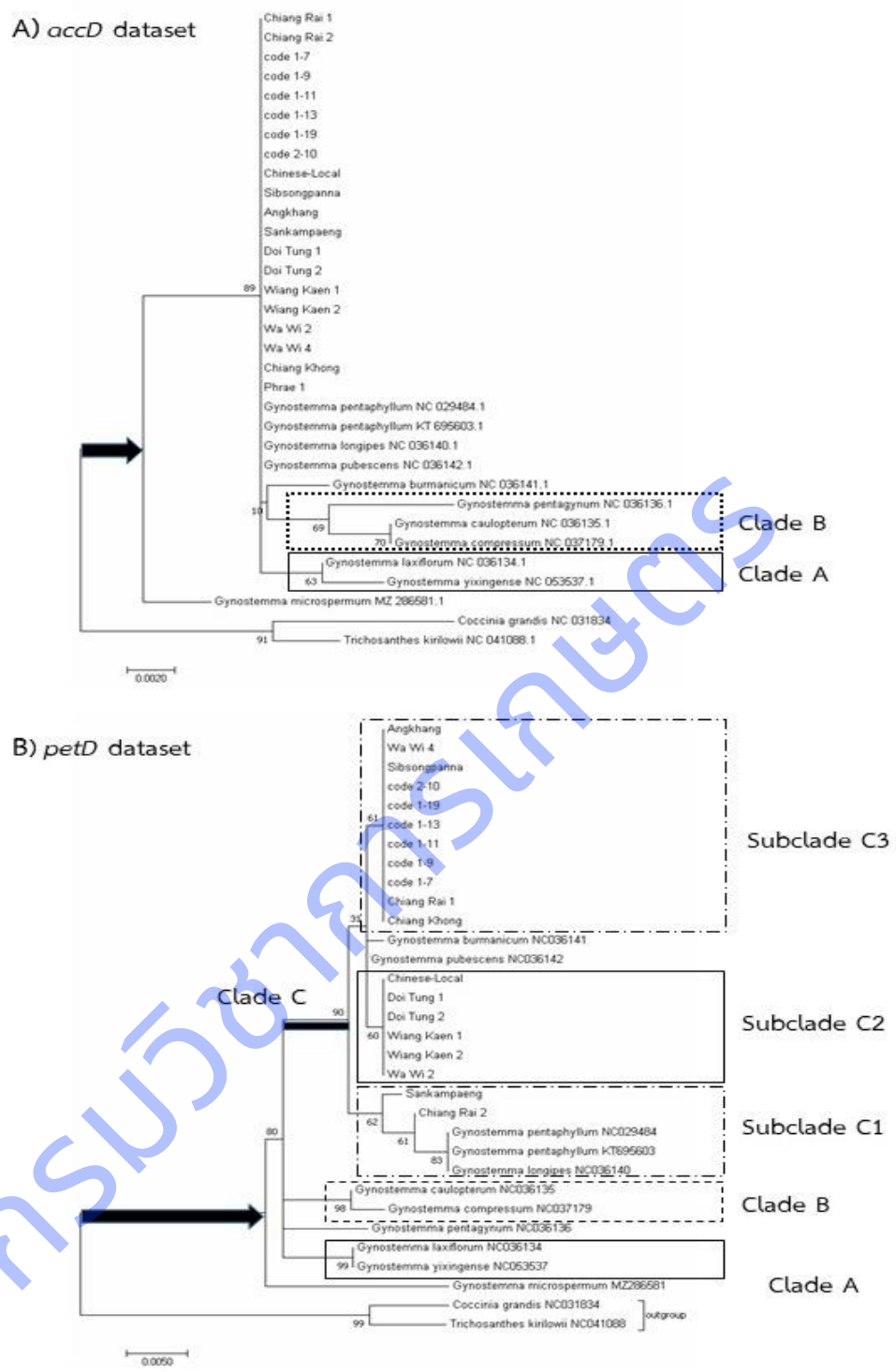
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3.2.2 ลักษณะสัณฐานของเมล็ดปัญจขันธ์ แสดงความแตกต่างของขนาด ลักษณะพื้นผิวเมล็ด และลักษณะด้านข้างเมล็ด ของปัญจขันธ์พันธุ์ดอยตุง 1(A-C), พันธุ์เชียงราย 1 (D-F), พันธุ์สันกำแพง (G-I), พันธุ์สิบสองปันนา (J-L), พันธุ์อ่างขาง (M-O) และ พันธุ์ลูกผสม 1-7 (P-R)



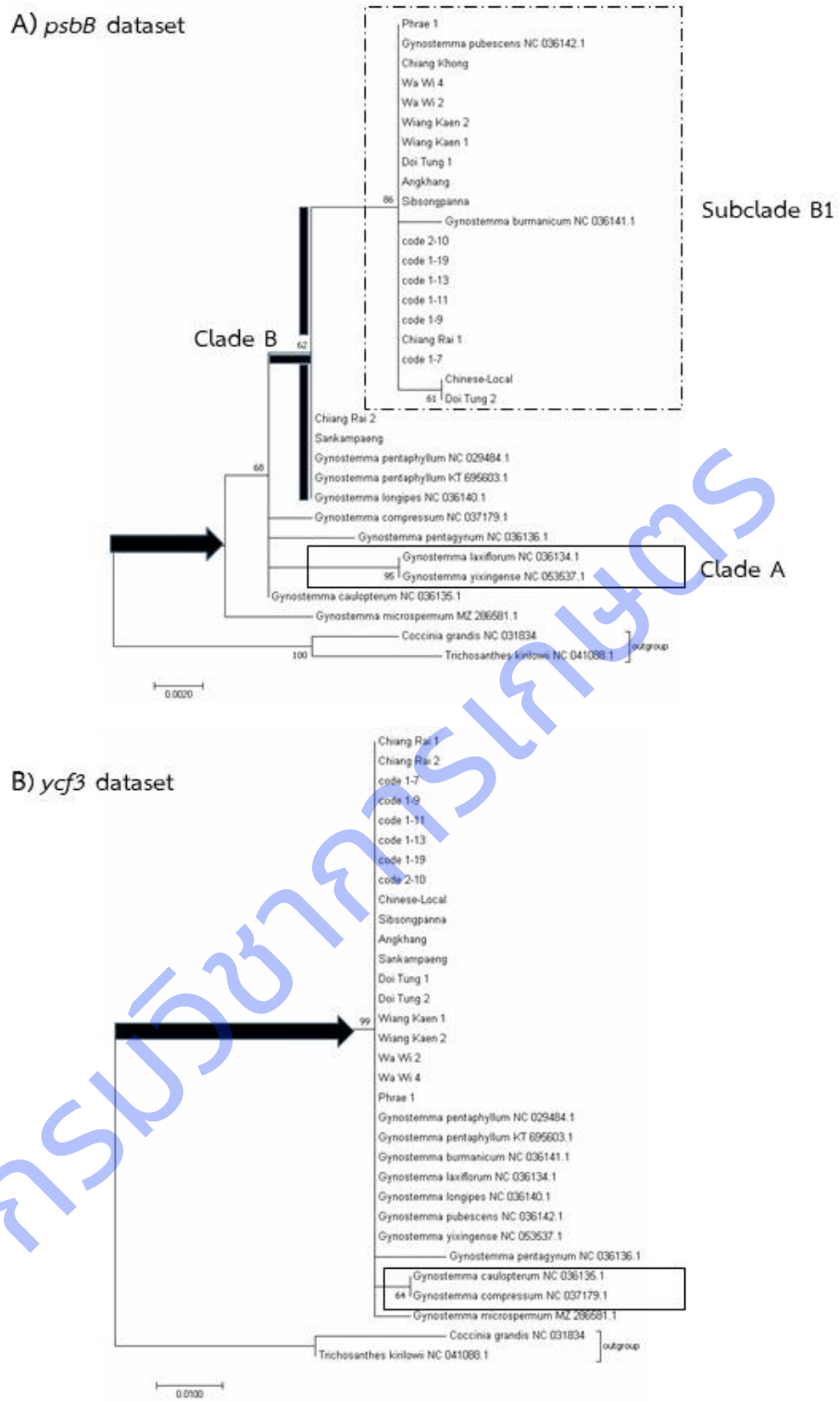
ภาพที่ 3.2.3 แสดงประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ของปัญจขันธ์ 20 สายพันธุ์ ด้วยยีน *accD*, *petD*, *psbB*และ *ycf3* โดยมีตัวอย่างปัญจขันธ์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แสดงไว้ด้วยเครื่องหมาย X

กรมวิชาการเกษตร



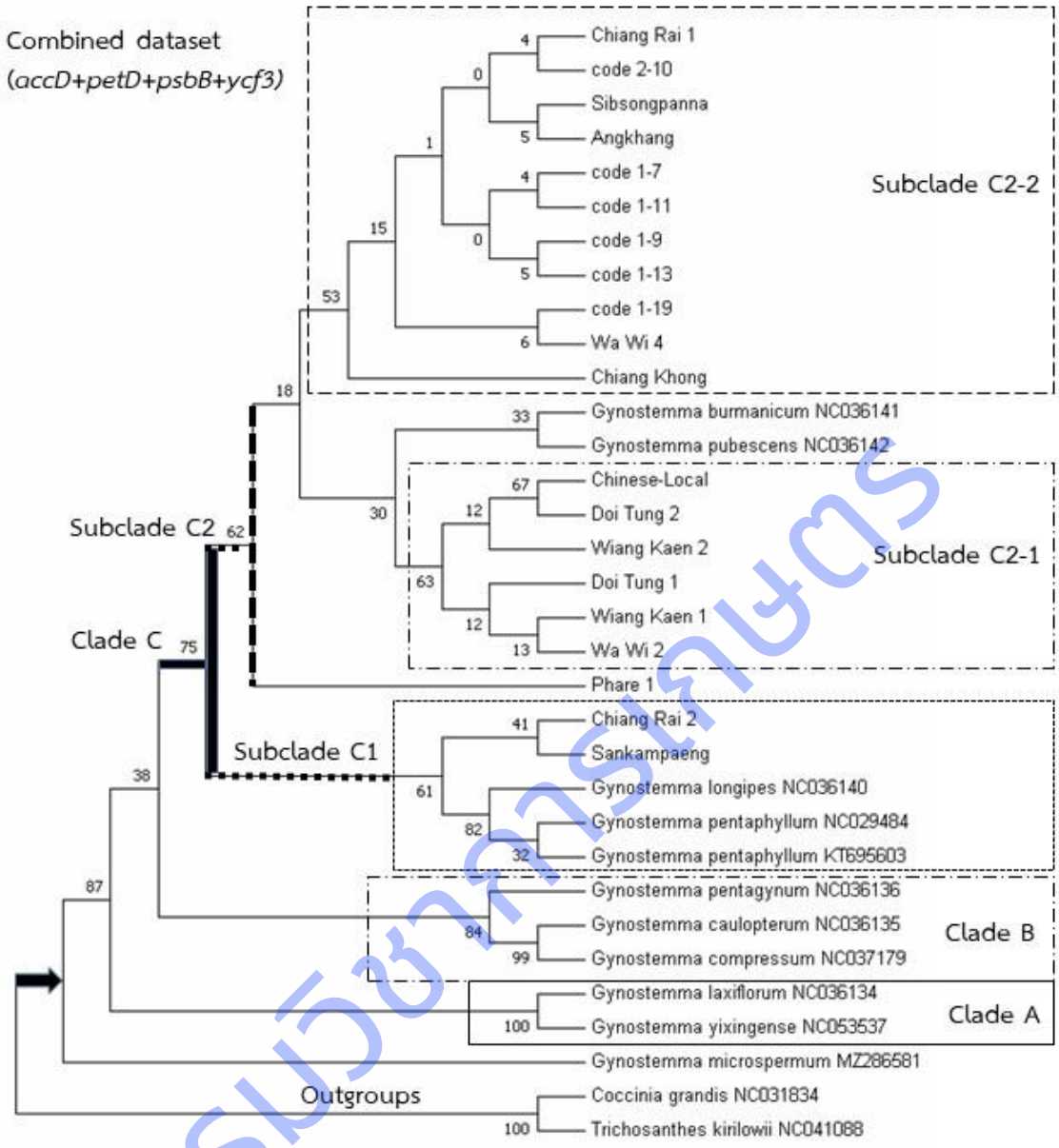
ภาพที่ 3.2.4 แผนภูมิ Maximum Likelihood (ML Phylogram) แสดงความสัมพันธ์ของ *Gynostemma* spp. ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอของยีน *accD* (A) และยีน *petD* (B) พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS)

กรมวิชาการเกษตร



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

กรมวิชาการเกษตร



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

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3.2.2รายชื่อปัญจขันธ์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้และรายละเอียดของตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย (Herbarium voucher specimens) ที่ลงทะเบียนเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร

ที่	รายชื่อปัญจขันธ์	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	สายพันธุ์1-9 (code no. 1-9)	K. Pruesapan KP2020-4	BK no. 071528	BK269124
5	สายพันธุ์1-11 (code no. 1-11)	K. Pruesapan KP2020-5	BK no. 071529	BK269125
6	สายพันธุ์1-13 (code no. 1-13)	K. Pruesapan KP2020-6	BK no. 071530	BK269126
7	สายพันธุ์1-19 (code no. 1-19)	K. Pruesapan KP2020-7	BK no. 071531	BK269127
8	สายพันธุ์2-10 (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 (WiangKaen 1)	K. Pruesapan KP2020-15	BK no. 071539	BK269135
16	เวียงแก่น2 (WiangKaen 2)	K. Pruesapan KP2020-16	BK no. 071540	BK269136
17	วาวี2 (Wa Wi 2)	K. Pruesapan KP2020-17	BK no. 071541	BK269137
18	วาวี4 (Wa Wi 4)	K. Pruesapan KP2020-18	BK no. 071542	BK269138
19	เชียงของ (Chiang Khong)	K. Pruesapan KP2020-19	BK no. 071543	BK269139
20	แพร่ 1 (Phrae 1)	K. Pruesapan KP2020-20	BK no. 071544	BK269140

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.3ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาไหลเผือก

การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลปลาไหลเผือก

จากการสำรวจและรวบรวมพบว่ามีการกระจายพันธุ์เกือบทุกภูมิภาคของประเทศไทย การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการสำรวจในพื้นที่เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณ 5 เขต ทั้งหมด 18 จังหวัด รวบรวมได้ทั้งหมด 63 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.3.1) จำนวน 59 ตัวอย่าง พบเป็นปลาไหลเผือก *Eurycoma longifolia* Jack และมีเพียง 4 ตัวอย่างเป็นปลาไหลเผือกน้อย *Eurycoma harmandiana* Pierre

ตารางที่ 3.3.1 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	2ตัวอย่าง	AK60, AK61
	เลย	2 ตัวอย่าง	AK62, AK63
ภาคตะวันออก	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 หรือ ปลาไหลเผือกใหญ่ *Eurycoma longifolia* Jack เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดเล็ก ต้นที่สำรวจพบในจังหวัดกระบี่ มีความสูงมากที่สุดประมาณ 6 เมตร อย่างไรก็ตามต้นที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติสามารถสูงได้ถึง 10-15 เมตร ใบ

กรมวิชาการเกษตร

เป็นใบประกอบ ยาว 20-40 เซนติเมตร ใบย่อยเรียงตรงข้าม รูปใบหอกแกมรูปไข่กลับหรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่ ขนาดใบย่อย กว้าง 1.5-6 เซนติเมตร ยาว 3-10 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อขนาดใหญ่ ยาวได้เกือบ 1 เมตร ดอกสีแดง ที่ก้านช่อดอก แกนช่อ ก้านดอกและผิวด้านนอกของกลีบรอง กลีบดอกมีขนชนิดที่ปลายขนมีตุ่มพองสีส้มแดง กลีบรองกลีบดอกรูปสามเหลี่ยม ยาวประมาณ 1 มิลิเมตร กลีบดอกรูปคล้ายรูปไข่หรือรูปรี กว้าง 2-3 มิลิเมตร มีขนนุ่ม ดอกตัวผู้และดอกสมบูรณ์เพศมีเกสรตัวผู้สมบูรณ์ 5 อัน ก้านชูอับเรณูยาวประมาณ 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 เป็นไม้พุ่มเล็ก สูงไม่เกิน 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 ด้านบนใบสีเขียวและเป็นมันเรียบกว่าด้านล่าง ช่อดอกยาวไม่เกิน 20 เซนติเมตร มีขนนุ่มกระจายอยู่ทุกส่วนของดอก กลีบรองกลีบดอก 5 กลีบ รูปสามเหลี่ยมยาว 1-1.5 มิลลิเมตร กลีบดอกรูปเรียวปลายแหลม 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)

ก ข ค

กรมป่าไม้

ภาพที่ 3.3.1 แสดงลักษณะต้น (ก, ข) ใบ (ค) ดอก (ง, จ, ฉ) ผลอ่อน (ช) ผลแก่ (ซ) และราก(ฌ)

ของปลาไหลเผือก *Eurycoma longifolia* Jack

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3.3.2 แสดงลักษณะต้น และ ใบ ของปลาไหลเผือกน้อย *Eurycoma harmandiana* Pierre

การจัดเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัยของปลาไหลเผือก

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

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3.3.2ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของปลาไหลเผือก จำนวน 43 ตัวอย่าง ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเลขลงทะเบียน
1	AK1	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070660
2	AK2	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070661
3	AK4	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071290
4	AK9	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071291
5	AK18	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071292
6	AK21	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070662
7	AK22	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070663
8	AK23	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070664
9	AK24	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070665
10	AK25	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070666
11	AK26	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070667
12	AK27	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070668
13	AK28	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070669
14	AK29	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070670
15	AK30	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070671
16	AK31	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070672
17	AK32	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070673
18	AK33	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070674
19	AK34	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070675

กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเลข ลงทะเบียน
20	AK35	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070676
21	AK36	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070677
22	AK37	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070678
23	AK38	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070679
24	AK39	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070680
25	AK40	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070681
26	AK41	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 070659
27	AK42	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071293
28	AK43	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071294
29	AK44	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071295
30	AK45	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071296
31	AK46	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071297
32	AK47	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071298
33	AK48	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071299
34	AK49	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071300
35	AK50	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071301
36	AK51	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071302
37	AK52	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071303
38	AK54	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071304
39	AK55	*Eurycoma harmandiana* Pierre	BK 071305
40	AK56	*Eurycoma harmandiana* Pierre	BK 071306

กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเลข ลงทะเบียน
41	AK57	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071307
42	AK58	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071308
43	AK59	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071309

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3.3.3 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของปลาไหลเผือก *E. longifolia*ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้

ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3.3.4 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของปลาไหลเผือก *E. harmandiana*ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้

ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร

ความจำเพาะของดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาไหลเผือก

ผลการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยบริเวณ *rbcL*, *rpoC*, และ ITS ในปลาไหลเผือก พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกที่มีคุณภาพแตกต่างกัน ดังนี้ *rbcL* จำนวน 18 ตัวอย่าง, rpoC จำนวน 32 ตัวอย่าง, และ ITS จำนวน 32 ตัวอย่าง คิดเป็น 34.61%, 61.52% และ 61.52% ตามลำดับ

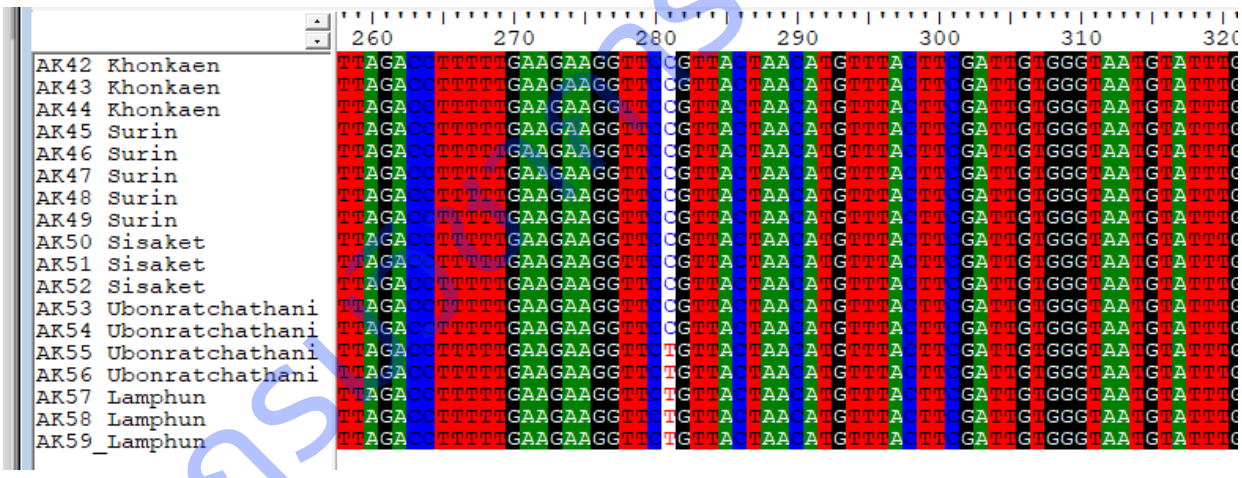
ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ความยาว 696-698 คู่เบส โดยปลาไหลเผือกชนิด *E. harmandiana* (AK55) มีความยาวมากที่สุด คือ 698 คู่เบส ในขณะที่ปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* ทั้ง 31 ตัวอย่าง มีความยาวเท่ากัน คือ 696 คู่เบส ส่วนดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rbcL* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ความยาว 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

กรมวิชาการเกษตร

จากการตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *rpoC* ด้วยการ BlastN พบว่า มีเพียงข้อมูลดีเอ็นเอของปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* หมายเลข GenBank accession MH751519 (Wei *et al*., 2019) ซึ่งเป็นการศึกษาทั้งจีโนมพืชถูกลงทะเบียนบันทึกไว้บนระบบ NCBI ดังนั้น ข้อมูลดีเอ็นเอของปลาไหลเผือกที่ได้จากงานวิจัยนี้ทั้ง 32 ตัวอย่าง จึงเป็นข้อมูลใหม่ที่จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการใช้เป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rpoC* ในการพิสูจน์ชื่อปลาไหลเผือกในงานด้านสมุนไพร นอกจากนี้ยังพบว่าข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาไหลเผือกน้อยชนิด *E. harmandiana* บริเวณ *rbcL* และ ITS ที่ได้จากงานวิจัยนี้จำนวน 3 หมายเลข เป็นข้อมูลใหม่

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือก

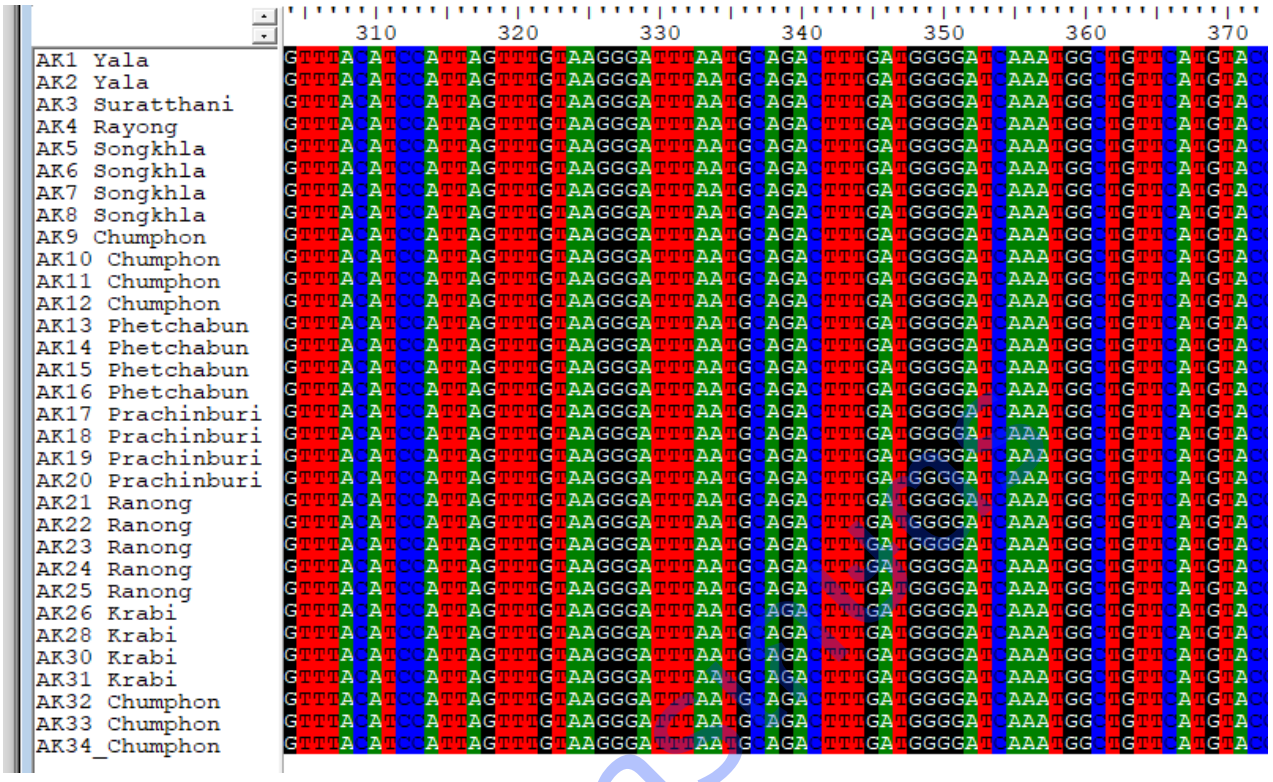
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกทั้งบริเวณ *rbcL, rpoC*, และ ITS มาจัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าเมตริกซ์ของ*rbcL* ทั้ง 18 ตัวอย่าง มีความยาว 526 ตำแหน่ง โดยมีความหลากรูปที่เกิดจากการกลายแบบ pyrimidine transition (C<-->T) ของตัวอย่างที่ตำแหน่งที่ 281 (ภาพที่ 3.3.5) โดยพบว่า ความผันแปรทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* แยกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจากเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ขอนแก่น: AK42, AK43, AK44) และเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออก (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* ซึ่งมาจากเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออก (อุบลราชธานี: AK55, AK56) กลับแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น T เช่นเดียวกับปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* ที่มาจากเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคเหนือ



ภาพที่ 3.3.5 แสดงความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาไหลเผือกบริเวณ *rbcL*

ส่วนเมตริกซ์ของ *rpoC* ทั้ง 32 ตัวอย่าง (ภาพที่ 3.3.6) เมื่อจัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งด้วยโปรแกรม ClustalW แล้วพบว่ามีความยาว 423 ตำแหน่ง และไม่มีความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ปรากฏในดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *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) อย่างไรก็ดี ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rpoC* ที่ศึกษาได้ในงานวิจัยนี้ มีเฉพาะตัวแทนของปลาไหลเผือก

ชนิด *E. longifolia* จึงไม่สามารถทำนายได้ว่ามีความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับ นิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกชนิด *E. harmandiana* เกิดขึ้นหรือไม่

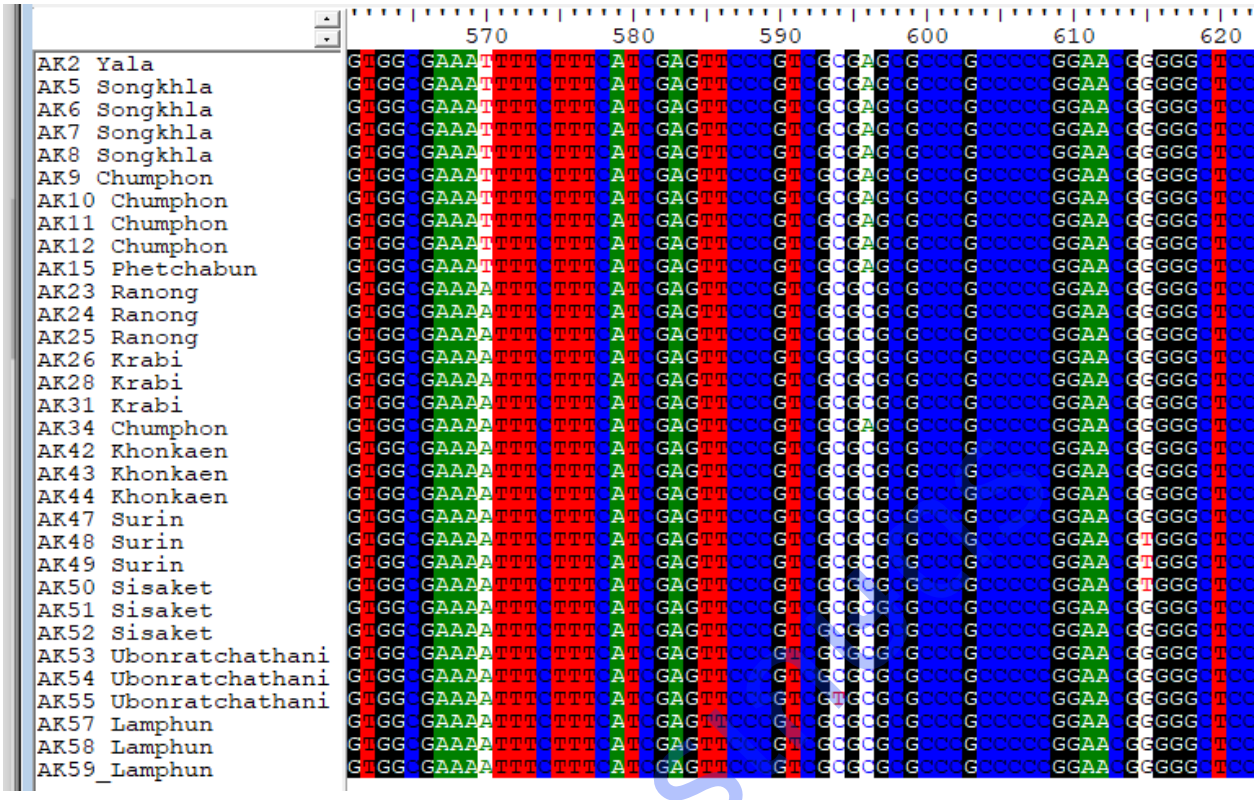


ภาพที่ 3.3.6 แสดงบริเวณที่ไม่มีความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาไหลเผือก

บริเวณ *rpoC*

ส่วนเมตริกซ์ของ ITS ทั้ง 32 ตัวอย่าง (ภาพที่ 3.3.7) เมื่อจัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งด้วยโปรแกรม ClustalW แล้วพบว่ามีความยาว 696 ตำแหน่ง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 14 ตำแหน่งมีความหลากรูปที่เกิดจากการกลาย 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 ดังนั้นความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกที่ได้จากข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS นี้ จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกต่อไป

กรมวิชาการ



ภาพที่ 3.3.7 แสดงตัวอย่างตำแหน่งที่มีความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกบริเวณ ITS

ตารางที่ 3.3.3 แสดงรูปแบบการกลายที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกบริเวณ ITS

ตำแหน่งลำดับเบส	ความหลากรูปที่เกิดจากการกลาย	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

กรมวิชาการ

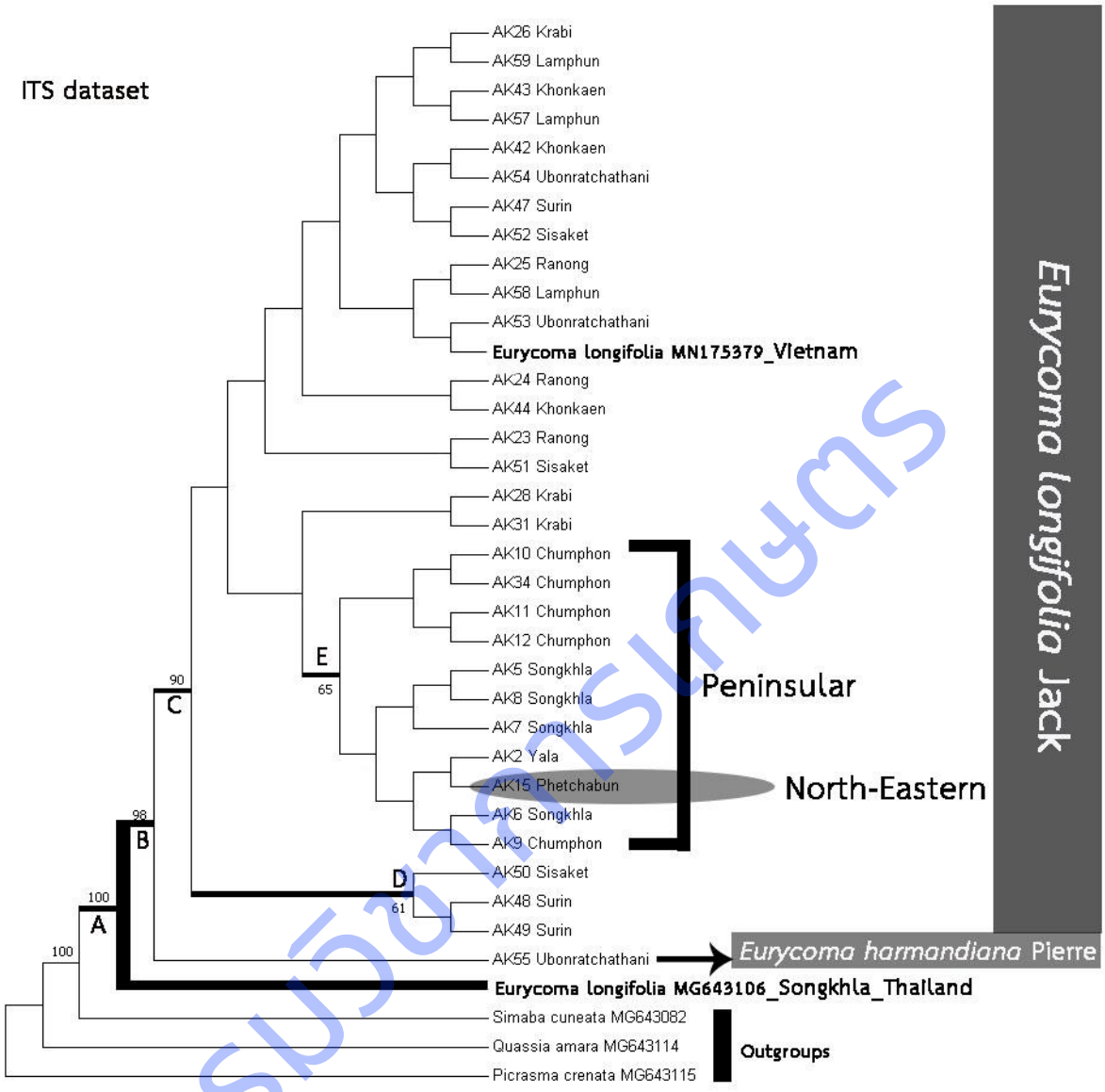
ตำแหน่งลำดับเบส	ความหลากรูปที่เกิดจากการกลาย	รูปแบบการกลาย
466	C/A	transversion
570	T/A	transversion
594	C/T	Pyrimidine transition
596	C/A	transversion
615	G/T	transversion
658	C/T	Pyrimidine transition

การวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือก

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rbcL* และ *rpoC* ไม่มีตัวแทนที่สามารถใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกของประเทศไทยได้ จึงใช้เฉพาะข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS ในการวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือก โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 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 เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคใต้ จับกลุ่มอยู่ที่ฐาน แต่ *E. longifolia* MN715370 จากประเทศเวียดนามกลับจับกลุ่มกับปลาไหลเผือกของประเทศไทยใน **clade B** ด้วยค่า bootstrap support 90% เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มตัวอย่างใน **clade B** พบว่า ปลาไหลเผือกชนิด *E. harmandiana* แยกออกจากกลุ่มปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* อย่างชัดเจนส่วนกลุ่มปลาไหลเผือกชนิด *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 ตัวอย่างนี้กระจายพันธุ์อยู่ในเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออก ในขณะที่ตัวอย่างจากศรีสะเกษอีก 2 ตัวอย่าง (AK51, AK52) และจากสุรินทร์อีก 1 ตัวอย่าง (AK47) ไม่ได้แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมแยกออกได้ชัดเจนจากปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* ตัวอื่น อย่างไรก็ดี ค่า bootstrap support ใน **clade D** นี้กลับต่ำเพียง 61% ส่วนใน **clade E** พบตัวแทนของปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* จำนวน 11 ตัวอย่าง จับกลุ่มกันด้วย bootstrap support ต่ำเช่นกันที่ 65% โดยพบสมาชิกส่วนใหญ่มาจากเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคใต้ คือ ชุมพร (AK9, AK10, AK11, AK12, AK34) สงขลา (AK5, AK6, AK7, AK8) และยะลา (AK2) แต่ที่น่าสนใจคือ มีสมาชิกจากเพชรบูรณ์ (AK15) ซึ่งอยู่ในเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออกเฉียงเหนือรวมอยู่ด้วย ส่วนสมาชิกที่เหลือตัวอื่นๆ ของ **clade C** ไม่ได้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แตกต่างออกไป

กรมวิชาการเกษตร



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

กรมวิชาการเกษตร

<u>การทดลองที่ 3.4ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดสมุนไพรเพื่อการอนุรักษ์ : หนอนตายหยาก</u>

1. สำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืชสมุนไพรหนอนตายหยากเพื่อการศึกษาและการเก็บรักษา

รวบรวมตัวอย่างพืชสกุลหนอนตายหยากปลูกลงกระถางเก็บอนุรักษ์ไว้ในโรงเรือน ได้จำนวนทั้งสิ้น 92 ตัวอย่าง จากแหล่งที่มา 11 แหล่ง ได้แก่

1) เชื้อพันธุ์ดั้งเดิมที่มีการอนุรักษ์ไว้ในโรงเรือนของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช
2) ตลาดนัดสมุนไพร บริเวณวัดพระศรีรัตนมหาธาตุ (วัดพระพุทธชินราช) จ. พิษณุโลก
3) พื้นที่การเกษตร ต. กุดสินคุ้มใหม่ อ.เขาวง จ.กาฬสินธุ์

4) หาดทุ่งวัวแล่น ต.สะพลี อ.ประทิว จ.ชุมพร
5) พื้นที่สวนยางพาราา ต.แหลมสัก อ.อ่าวลึก จ.กระบี่
6) พื้นที่ป่าชุมชน อ.เมืองปาน จ.ลำปาง
7) พื้นที่ใน ต. ท่าเสา อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี
8) พื้นที่ใน ต. หนองทะเล อ.เมืองกระบี่ จ.กระบี่
9) พื้นที่การเกษตร ต.ปากน้ำ อ.บางน้ำจืด จ.ชุมพร
10) พื้นที่ป่าชุมชน อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา
11) ตลาดขายสินค้าและต้นไม้บริเวณ ด่านช่องจอม บ้านด่านพัฒนา ต.ด่าน อ.กาบเชิง จ.สุรินทร์

ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเชิญนักอนุกรมวิธานซึ่งชำนาญการจำแนกพืชสกุลหนอนตายหยากมาทำการตรวจลักษณะตัวอย่างที่รวบรวมมาได้ สามารถจัดจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์โดยเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาจาก 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 3.4.1, ภาพที่ 3.4.2)

ตารางที่ 3.4.1 รายชื่อ แหล่งที่มา และหมายเลขลงทะเบียนการเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ ของพืชสมุนไพรหนอนตายหยากสกุล *Stemona*ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่	หมายเลข (Number)	ชื่อวิทยาศาสตร์ (Botanical Name)	แหล่งที่มา	หมายเลขลงทะเบียนเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ (Bk number)
31	SS14.1	*Stemona pierrei* Gagnep.	อ. กาบเชิง จ. สุรินทร์	082338
32	SS14.7	*Stemona pierrei* Gagnep.	อ. กาบเชิง จ. สุรินทร์	082339
33	SS14.12	*Stemona pierrei* Gagnep.	อ. กาบเชิง จ. สุรินทร์	082340
34	SS19.1	*Stemona tuberosa* Lour.	อ.เมืองปาน จ. ลำปาง	082341
35	SS19.4	*Stemona tuberosa* Lour.	อ. เมืองปาน จ. ลำปาง	082342
36	SS19.5	*Stemona tuberosa* Lour.	อ. เมืองปาน จ. ลำปาง	082343
37	SS22.1	*Stemona phyllantha* Gagnep.	อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	082344
38	SS22.2	*Stemona phyllantha* Gagnep.	อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	082345
39	SS22.3	*Stemona phyllantha* Gagnep.	อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	082346
40	SS22.5	*Stemona phyllantha* Gagnep.	อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	082347

หมายเหตุ พันธุ์ดั้งเดิม คือพันธุ์ที่ได้รับการปลูกอนุรักษ์ในโรงเรือนธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สทช. (บางเขน) ตั้งแต่อดีต

ภาพที่ 3.4.2 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งผ่านกระบวนการรักษาสภาพและทำเป็นพรรณไม้อ้างอิง (Voucher specimen) จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ

2. การสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอ และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

(1) การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เลือกตัวอย่างพืชสมุนไพรหนอนตายหยากมาสกัดดีเอ็นเอจำนวน 35 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนหนอนตายหยากทั้ง 6 ชนิด (species) จากแหล่งที่มา 11 แหล่ง พบว่า สามารถสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอได้ทั้ง 35 ตัวอย่าง คิดเป็นค่าความสำเร็จในการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของพืชทั้งหมดร้อยละ 100 เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (เทคนิคพีซีอาร์) ใน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS(ไพรเมอร์ ITS5-ITS4),*trn*L-*trn*F, *psb*A-*trn*H, *mat*K*และ rbc*L ผลการทดลอง พบว่า มีค่าร้อยละความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์เท่ากับ 71.42, 62.85, 88.57, 62.85 และ 45.71 ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดดังนี้

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

ตรวจการสอบ

- ไพรเมอร์ยีน *trn*L-*trn*F ให้ผลผลิตพีซีอาร์ จำนวน 22 ตัวอย่าง เป็น double-band ทั้งหมดโดยมีขนาดดีเอ็นเอ อยู่ในช่วง 900-1200 คู่เบส

- ไพรเมอร์ ยีน *psb*A-*trn*Hให้ผลผลิตพีซีอาร์ จำนวน 31 ตัวอย่าง ได้ผลเป็น multi-band จำนวน 1 ตัวอย่าง และ single-band จำนวน 30 ตัวอย่างโดยมีขนาดดีเอ็นเออยู่ในช่วง 900-1100 คู่เบส

- ไพรเมอร์ ยีน *mat*Kให้ผลผลิตพีซีอาร์ จำนวน 22 ตัวอย่าง ได้ผลเป็น single-band ทั้งหมดโดยมีขนาดดีเอ็นเอ อยู่ในช่วง 900-1200 คู่เบส

- ไพรเมอร์ ยีน *rbc*L ให้ผลผลิตพีซีอาร์ จำนวน 16 ตัวอย่าง ได้ผลเป็น single-band ทั้งหมด โดยมีขนาดดีเอ็นเอ อยู่ในช่วง 900-1000 คู่เบส

เลือกนำผลผลิตดีเอ็นเอจากตำแหน่งที่ให้ผลเป็น single-band เกิน 50% ได้แก่ ตำแหน่ง ITS(ไพรเมอร์ ITS5-ITS4),*psb*A-*trn*H, *mat*K*และ rbc*Lนำไปทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (U2Bio (Thailand) Co., Ltd.) พบว่า การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมีค่าความสำเร็จร้อยละ 34.28, 37.14, 62.85 และ 45.71 ตามลำดับเมื่อตรวจสอบภาพโครมาโตแกรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตำแหน่ง ITS มีการปนเปื้อนหรือความไม่แน่นอนสูง สังเกตได้จากภาพโครมาโตแกรมที่มีกราฟสูงซ้อนทับกันอยู่หลายตำแหน่ง ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ควรมีภาพโครมาโตแกรมที่ชัดเจนไม่มีกราฟสูงซ้อนทับกัน (ภาพที่ 3.4.3) ดังนั้น จึงเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *psbA-trnH*, *mat*Kและ *rbcL* ไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

(2) การเปรียบเทียบวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด

เพื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดของพืชสกุลหนอนตายหยากในตำแหน่งยีน *psb*A-*trn*H*mat*Kและ *rbc*Lโดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *psb*A-*trn*H *mat*K และ *rbc*Lที่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแตกต่างด้วยฟังชันก์ 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 *psb*A-*trn*H*mat*K และ *rbc*L เท่ากับ 0.009, 0.004 และ 0.007 ตามลำดับ

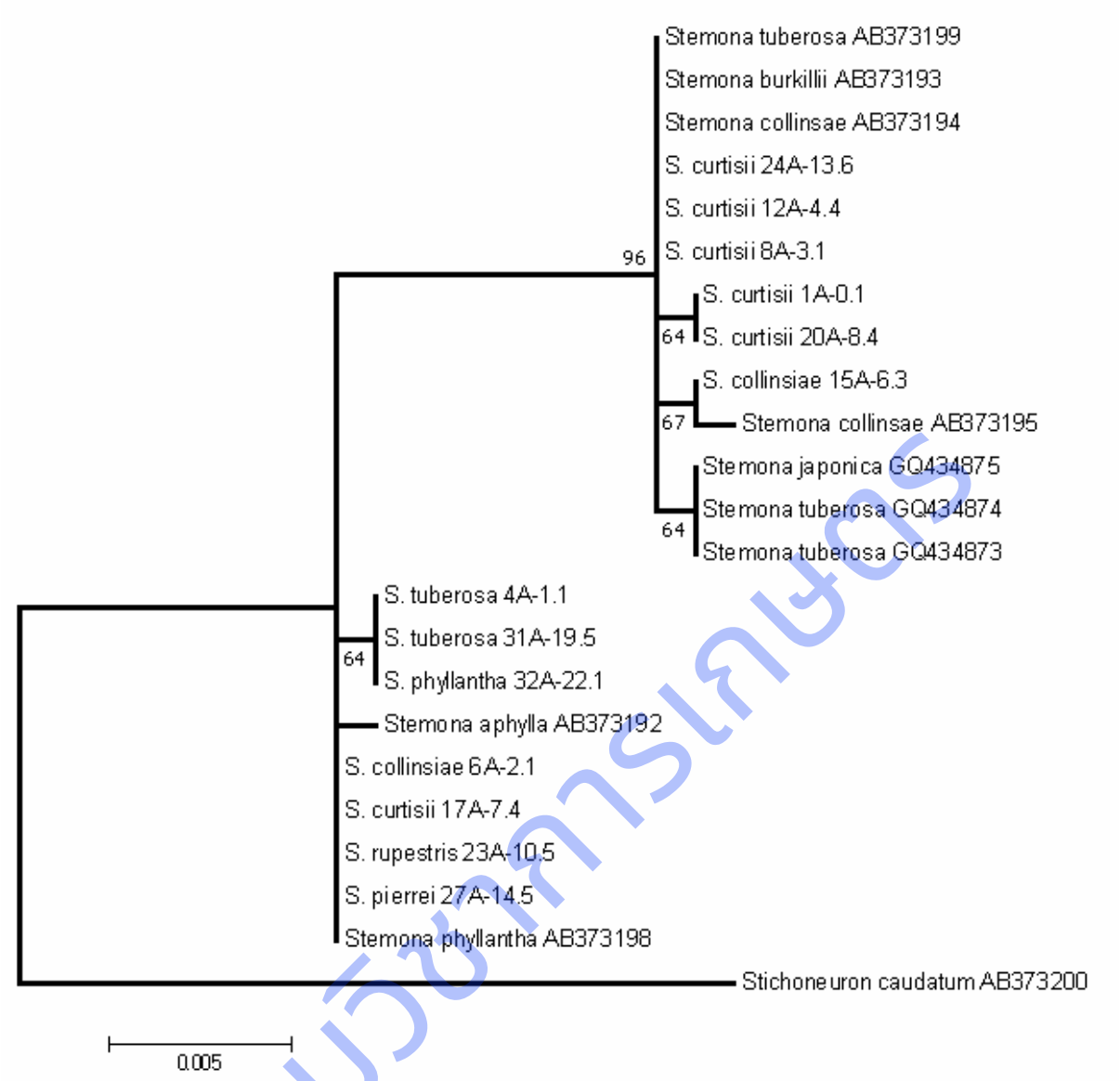
(3) การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้บนตำแหน่งยีน *psb*A-*trn*H จำนวน 13 ตัวอย่าง,*mat*Kจำนวน 22 ตัวอย่าง และ *rbc*Lจำนวน 16 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมโดยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap test เท่ากับ 1000 รอบ (replicates) พบว่า ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเชิงพันธุกรรมของพืชสกุลหนอนตายหยากที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่งยีน *psb*A-*trn*H*mat*Kและ *rbc*L แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของพืชสกุลหนอนตายหยากที่ศึกษามีความสอดคล้องและคล้ายคลึงกันเป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 3.4.4, 3.4.5 และ 3.4.6 ตามลำดับ) โดยผลการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด *psb*A-*trn*H ไม่สามารถจัดแบ่งกลุ่มของพืชสกุลหนอนตายหยากที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้อย่างชัดเจน แสดงว่าที่ตำแหน่งยีน *psb*A-*trn*H ของพืชสกุลหนอนตายหยากมีความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง (ภาพที่ 3.4.4) ส่วนดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rbc*Lสามารถจัดจำแนก *S. tuberosa*Lour.ได้ด้วยค่าความเชื่อมั่นในระดับต่ำมาก (<50% BS) และยังแยก *S. phyllantha* Gagnep. ออกเป็นอีกกลุ่มได้ที่ค่าความเชื่อมั่นระดับต่ำเท่ากับ 62% BS (ภาพที่ 3.4.6)และดีเอ็นเอบาร์โค้ด *mat*K 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*Inthachubกับ *S. pierrei* Gagnep.ได้ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 63% BS และ 57% BS ตามลำดับ (ภาพที่ 3.4.5)

กรมวิชาการเกษตร

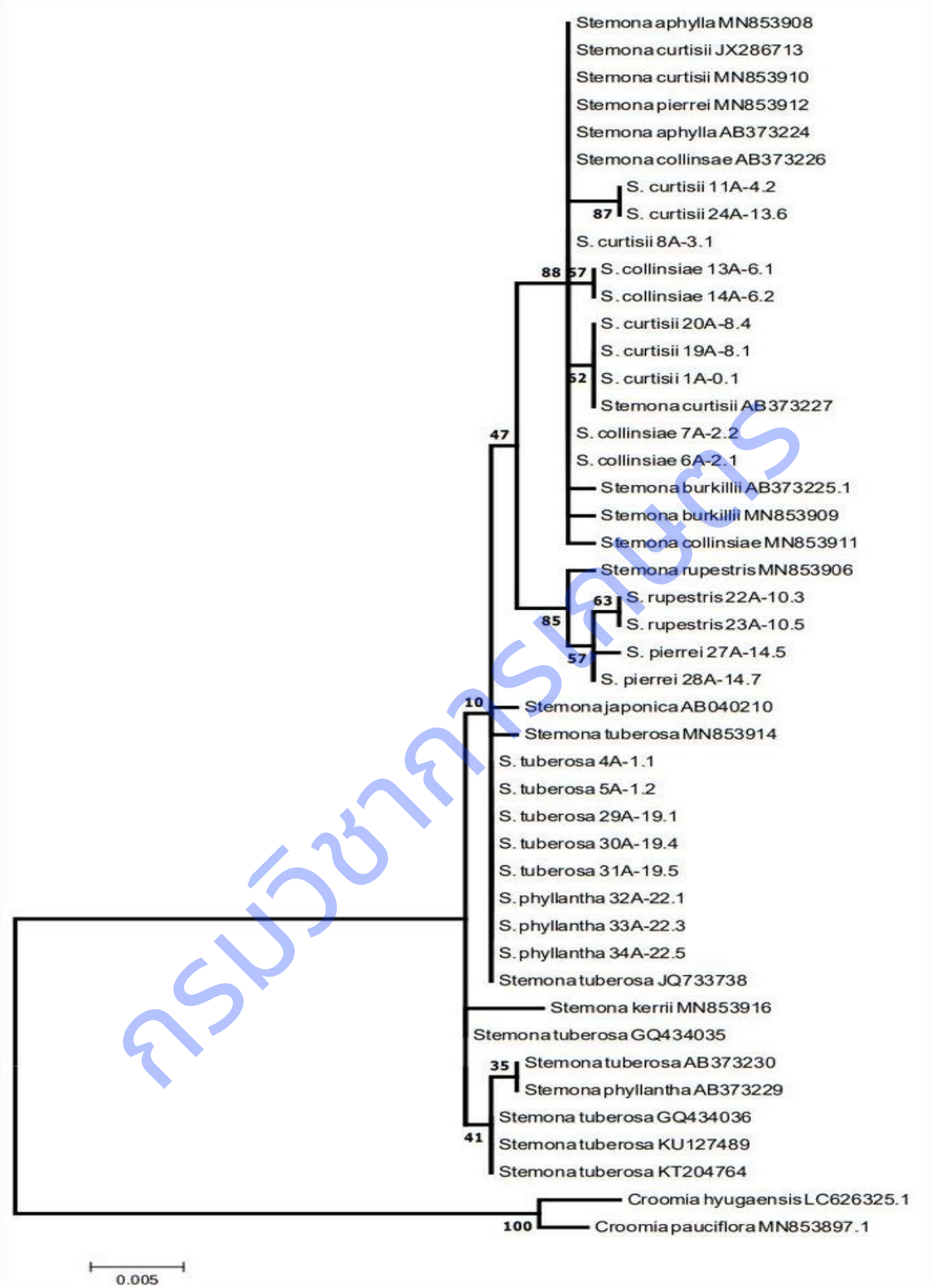
ภาพที่ 3.4.3 ภาพลักษณะโครมาโตแกรม (Chromatogram) ที่นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

กรมวิชาการเกษตร



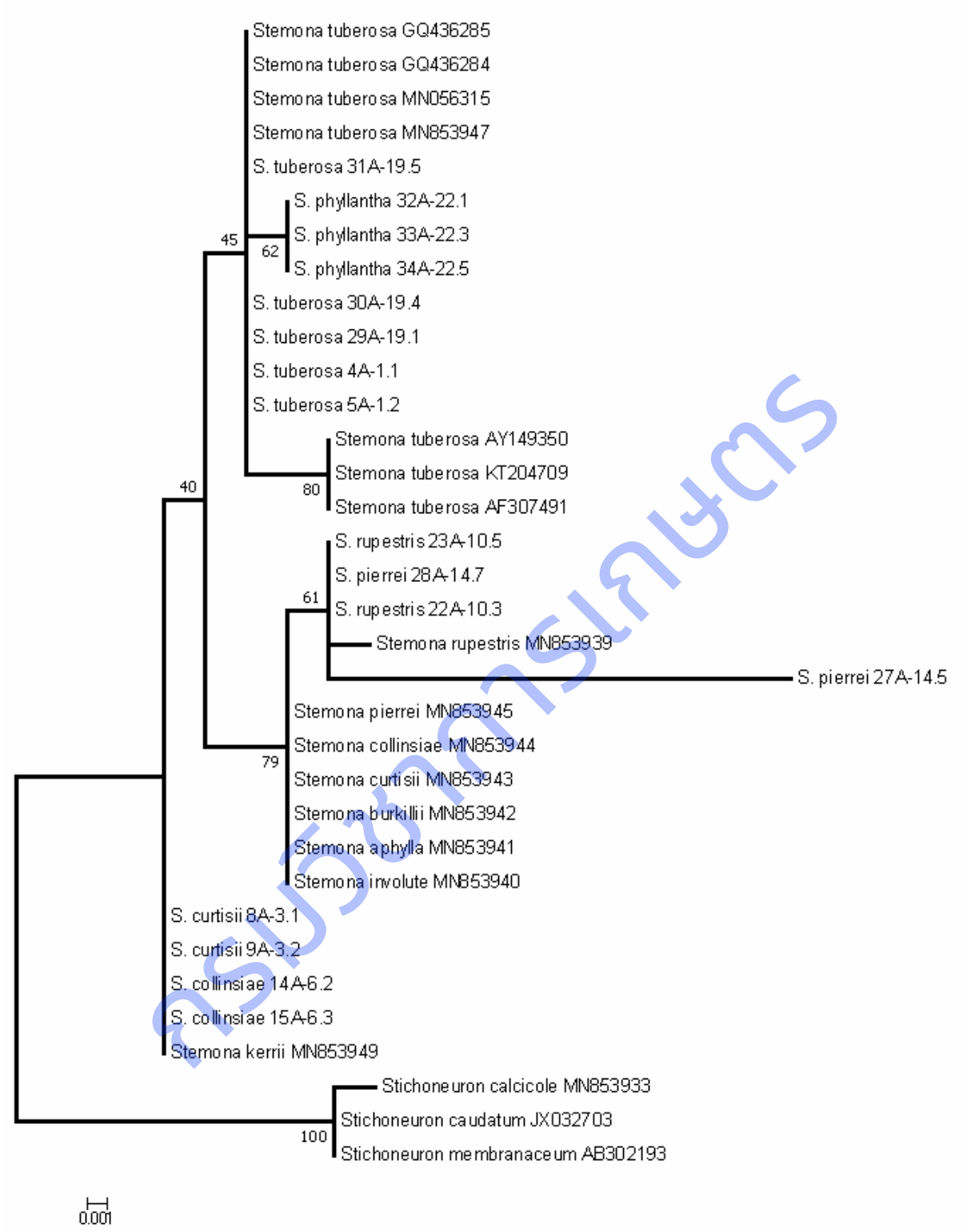
ภาพที่ 3.4.4 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างพืชสมุนไพรหนอนตายหยาก จากยีนบริเวณ *psb*A-*trn*H วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA7 ด้วยวิธี Maximum Likelihood กำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates

กรมวิชาการเกษตร



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

กรมวิชาการเกษตร



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

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.5ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสะตอ

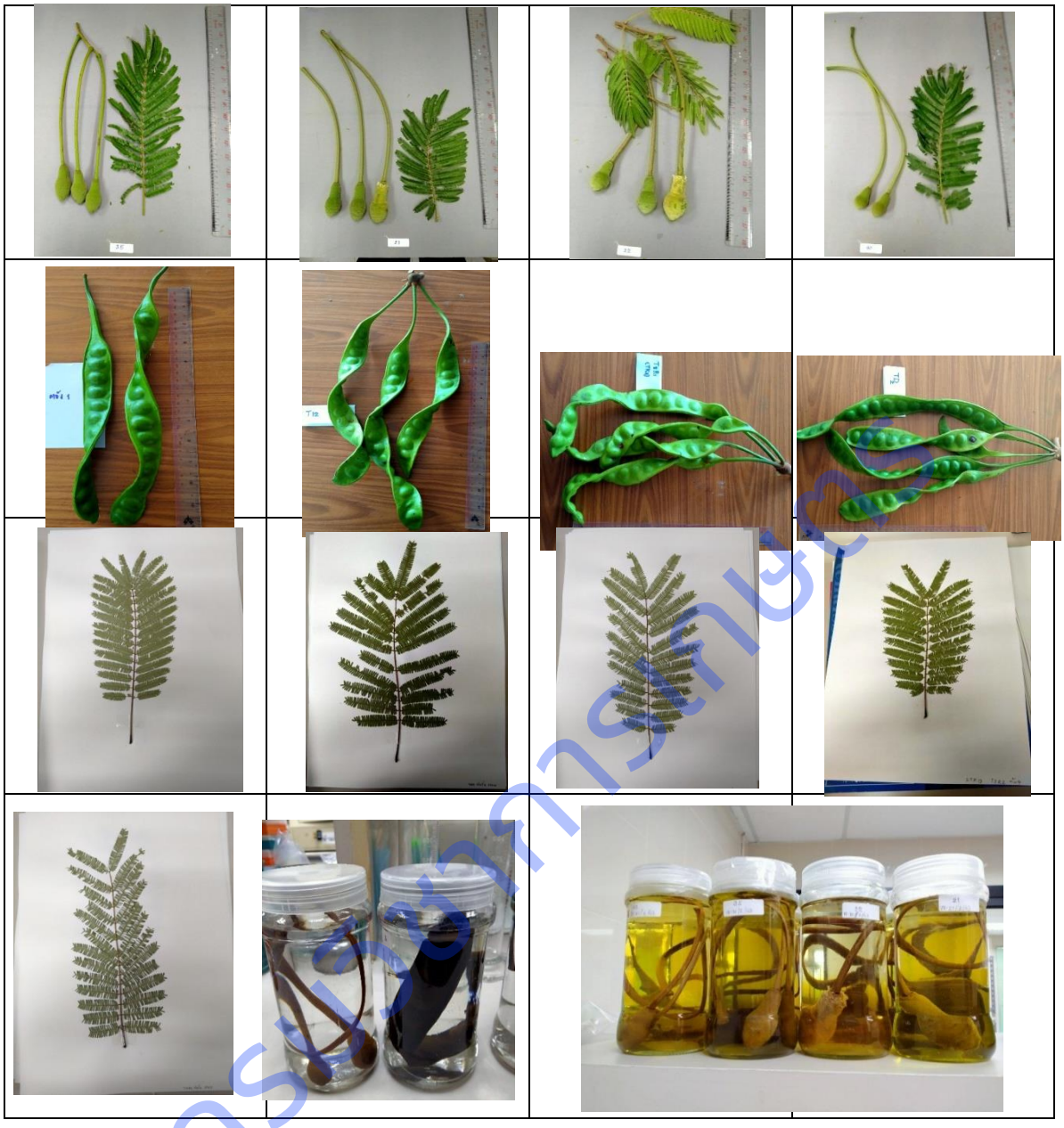
การเก็บตัวอย่างสะตอและการเก็บตัวอย่างอ้างอิง

จากการเก็บตัวอย่างสะตอ ที่ทำการปลูกรวบรวมพันธุ์สะตอจากแหล่งปลูกต่างๆของภาคใต้ ในแปลงรวบรวมพันธุ์สะตอ ศุนย์วิจัยพืชสวนตรัง ต. ไม้ฝาด อ.สิเกา จ. ตรัง มาจัดทำพรรณไม้แห้ง ส่งเก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK) สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร โดยบันทึกข้อมูลชนิดพืชสถานที่เก็บตัวอย่างและเลขอ้างอิงตัวอย่างพืช (Voucher number) ตามมาตรฐานสากล ได้ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของสะตอ จำนวน 16 ตัวอย่าง ที่ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (ตารางที่3.5.1)

ตารางที่ 3.5.1 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของสะตอ จำนวน 16 ตัวอย่าง ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง (Refference)	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพืช	หมายเลขลงทะเบียน
1	2TD1	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอดาน	083046
2	2TD2	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอดาน	083037
3	2TK1	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083054
4	2TK2	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083043
5	2TK3	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083056
6	2TK4	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083052
7	2TK5	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083048
8	2TK6	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083050
9	2TK7	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083045
10	2TK8	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083053
11	2TK9	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083051
12	2TK10	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083044
13	2TK11	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083047
14	2TK13	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083049
15	2TK14	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083055
16	2TK15	*Parkia speciosa* Hassk.	สะตอข้าว	083038

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ภาพที่ 3.5.1 ตัวอย่างสะตอและการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

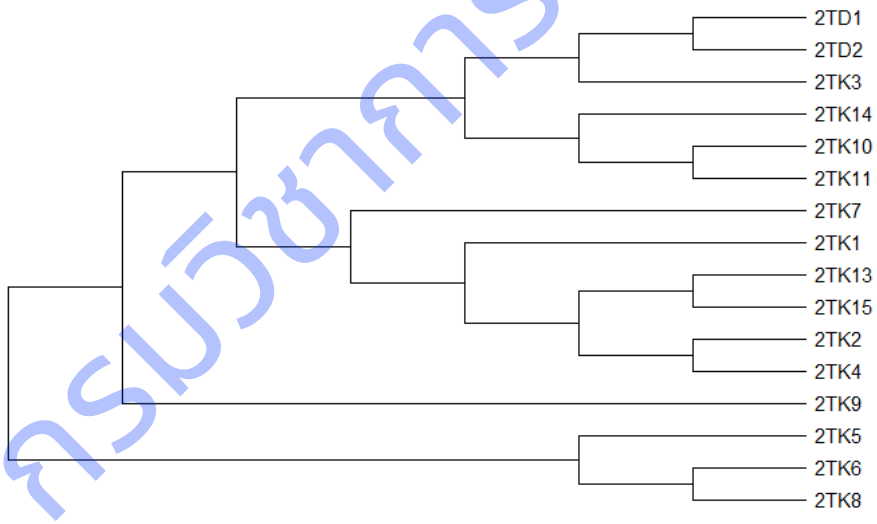
ภาพที่ 3.5.2 ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง สะตอ ที่ทำการปลูกรวบรวมพันธุ์ ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ต. ไม้ฝาด อ.สิเกา จ. ตรัง นำมาลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

การจัดทำ DNA barcode ของสะตอ

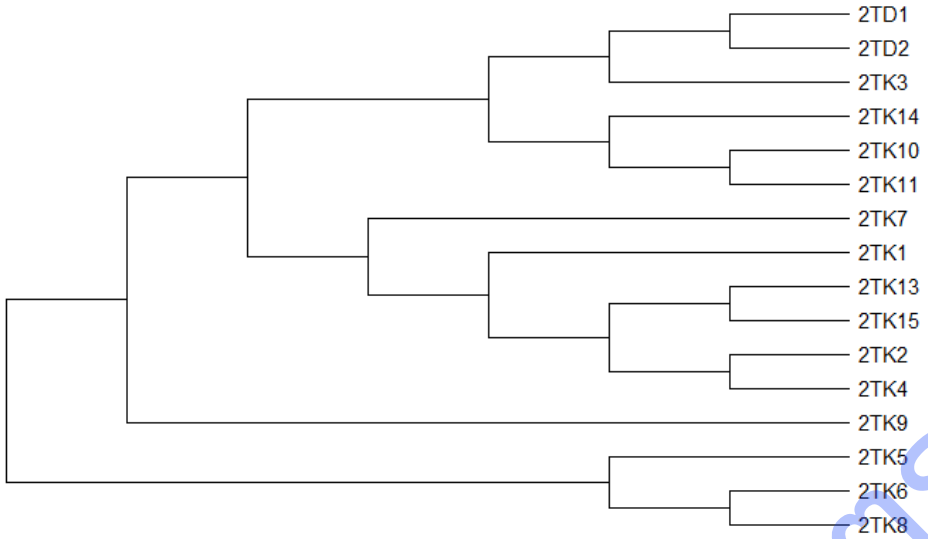
การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสะตอ จำนวน 16 ตัวอย่างโดยได้คัดเลือกชิ้นส่วนยีนที่ศึกษาไว้ในขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของไพรเมอร์บาร์โค้ดสากลของพืชกับตัวอย่างสะตอ ได้แก่ ITS และ matK นำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสะตอพบว่า เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ MatKและ ITS ของสะตอ พันธุ์ต่างๆ จำนวน 32 ตัวอย่างมาจัดเรียงเปรียบเทียบ พบว่า MatK ของสะตอทั้ง16 พันธุ์ มีความยาว 1526 bp. พบมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ G/C ของตัวอย่างบริเวณตำแหน่งที่ 64 A/Gของตัวอย่างบริเวณตำแหน่งที่ 192 และ 243 T/C บริเวณตำแหน่งที่ 587 และ A/C บริเวณตำแหน่งที่ 899ส่วน ITS ของสะตอทั้ง16 พันธุ์ มีความยาว 714bp. พบมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ C/Y ของตัวอย่างบริเวณตำแหน่งที่ 36 98 105 110 124 291และ 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

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ MatKและ ITS ของสะตอทั้ง16 พันธุ์ ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม MEGAx โดยสร้างแผนผังพันธุกรรม (phylogenetic tree) สามารถแบ่งกลุ่มสะตอได้เป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่1 ประกอบด้วย 2TD1 2TD2 2TK3 2TK14 2TK10 และ 2TK11 กลุ่มที่2 ประกอบด้วย 2TK7 2TK1 2TK13 2TK15 2TK2 และ 2TK4 กลุ่มที่3 ประกอบด้วย 2TK9 กลุ่มที่ 4ประกอบด้วย 2TK5 2TK6 และ 2TK8 (ภาพที่ 3.5.3 และ 3.5.4) ซึ่งในทั้ง MatK และ ITS สามารถจัดแบ่งกลุ่มได้สะตอ ได้เหมือนกัน อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายดีเอ็นบาร์โค้ดจากบริเวณยีน *matK และITS*ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ในระดับที่น้อยมาก อย่างไรก็ตามระดับความแตกต่างนี้ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสะตอข้าวและสะตอดานได้ จึงควรนำเทคนิคอื่นๆ เช่นเทคนิค GBS มาใช้ในการจัดจำแนกพันธุ์สะตอ ต่อไป



ภาพที่ 3.5.3แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างสะตอ จำนวน 16 ตัวอย่าง จากยีน MatK ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3.5.4 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของตัวอย่างสะตอ จำนวน 16 ตัวอย่าง จากยีน ITS ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGAx

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
1. องค์ความรู้	2	เรื่อง	**1. องค์ความรู้**	2	เรื่อง	ได้ฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของทุเรียน และสะตอ ที่เชื่อมโยงกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (อยู่ระหว่างดำเนินการ 75%)	ฐานข้อมูลจากองค์ความรู้ใช้ประโยชน์ในการแสดงความเป็นเจ้าของและคุ้มครองพันธุ์พืช
2. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนาระดับนานาชาติ	**2**	เรื่อง	**2. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนาระดับนานาชาติ**	3	เรื่อง		
2.1 นำเสนอแบบปากเปล่า			2.1 นำเสนอแบบปากเปล่า	1	เรื่อง	Molecular phylogeny and DNA barcode regions efficacy for identification the variety of *Capsicum annuum* L. in Thailand	นำข้อมูลที่ได้จากการเผยแพร่งานวิจัยตามช่องทางต่างๆ ไปพัฒนาและต่อยอดได้
2.2 ผลงานตีพิมพ์			2.2 ผลงานตีพิมพ์	1	เรื่อง	DNA barcode for rambutan diversity in Thailand using chloroplast genome regions	
2.3 โปสเตอร์			2.3 โปสเตอร์	1	เรื่อง	DNA barcode for rambutan diversity in Thailand using chloroplast genome regions	
3. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนาระดับชาติ	3	เรื่อง		5	เรื่อง		
3.1 นำเสนอปากเปล่า			3.1 นำเสนอปากเปล่า	1	เรื่อง	-พืชวงศ์ศิลา แหล่งยาน่าสนใจ	
3.2 ผลงานตีพิมพ์			3.2 ผลงานตีพิมพ์	3	เรื่อง	-การประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับการจำแนกระดับพันธุ์ของมันสำปะหลัง -การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* ในมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด -ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุล *Ilex* L. (Aquifoliaceae) ในประเทศไทยด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ	
3.3 โปสเตอร์			3.3 โปสเตอร์	1	เรื่อง	-พืชวงศ์ศิลา แหล่งยาน่าสนใจ	

กรมวิชาการเกษตร

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
นักวิชาการป่าไม้และเจ้าหน้าที่กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ได้ข้อมูลชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชวงศ์ศิลาที่กระจายพันธุ์อยู่ในพื้นที่อนุรักษ์ เพื่อจัดทำเป็นบัญชีรายชื่อพรรณไม้ และจัดทำป้ายชื่อพรรณไม้ติดไว้ที่ต้นพืชวงศ์ศิลา เพื่อให้นักท่องเที่ยวหรือนักวิจัยทราบชื่อที่ถูกต้องของชนิดพืชวงศ์ศิลา	2563
เพิ่มศักยภาพของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ในการเก็บรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกและถั่วเหลือง โดยจัดเก็บเมล็ดพันธุ์พริกได้ 84 ตัวอย่าง และเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้ 59 ตัวอย่าง	2564

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านเศรษฐกิจ:	
ด้านสังคม :	
ด้านสิ่งแวดล้อม :	

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการ/กระบวนการผลักดันงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ด้านวิชาการ นักวิจัย นักปรับปรุงพันธุ์พืช นักศึกษา หมอยาพื้นบ้านเกษตรกร ผู้ประกอบการ และผู้สนใจ รวมทั้งหน่วยงานภาครัฐ ภาคเอกชน

1. โดยการเผยแพร่ผลงานวิจัยในรูปแบบบทความทางวิชาการ โปสเตอร์ในการประชุม/สัมมนาระดับชาติ/นานาชาติ เผยแพร่บนเว็บไซต์ เพื่อให้เกิดการนำผลงานวิจัยไปต่อยอดและใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืช

กิจกรรมที่ 1 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสวน

การทดลองที่ 1.2 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเงาะ

1. ผลงานตีพิมพ์วิชาการในวารสารระดับนานาชาติเรื่อง DNA barcode for rambutan diversity in Thailand using chloroplast genome regions ใน วารสาร ActaHorticulturae Number 1312 [ผนวก 1.2ก]

2. การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ

2.1 ประชุมเผยแพร่ผลงานระดับนานาชาติ

- นำเสนอแบบโปสเตอร์ เรื่อง DNA barcode for rambutan diversity in Thailand using chloroplast genome regions[ผนวก 1.2ข]

การทดลองที่ 1.5 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริก

1. การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ

1.1 ประชุมเผยแพร่ผลงานระดับนานาชาติ

- นำเสนอแบบปากเปล่า เรื่อง Molecular phylogeny and DNA barcode regions efficacy for identification the variety of *Capsicum annuum* L. in Thailand **ใน** การประชุมวิชาการ The IX International Scientific and Practical Conference on Biotechnology as an Instrument for Plant Biodiversity Conservation เมื่อวันที่ 12-13 กรกฎาคม 2564 [ผนวก 1.5ก]

กิจกรรมที่ 2 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชไร่

การทดลองที่ 2.1ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายของพันธุกรรมของมันสำปะหลัง

1. ผลงานตีพิมพ์วิชาการในวารสารระดับชาติเรื่อง

กรมวิชาการเกษตร

- การประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับการจำแนกระดับพันธุ์ของมันสำปะหลัง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 50:1 (พิเศษ)1-7.[ผนวก 2.1ก]

- การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* ในมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด.การประชุมวิชาการระดับชาติครั้งที่ 13 มหาวิทยาลัยนครปฐม วันที่ 8-9 กรกรฎาคม 2564. 34-41.[ผนวก 2.1ข]

กิจกรรมที่ 3 ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชท้องถิ่น

การทดลองที่ 3.1ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์ศิลา (Aquifoliaceae)

1. ผลงานตีพิมพ์ระดับชาติ เรื่อง ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุล *Ilex* L. (Aquifoliaceae) ในประเทศไทยด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ (Diversity and Phylogenetic Relationships of Thai *Ilex* L. (Aquifoliaceae) Based on DNA Data) ใน วารสารวิชาการเกษตร เล่มที่ 40 ฉบับที่ 1 ปี 2565 (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์) [ผนวก 3.1ก]

2. การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ

2.1 ประชุมเผยแพร่ผลงานระดับชาติ

-นำเสนอแบบปากเปล่า เรื่อง “พืชวงศ์ศิลา แหล่งยาน่าสนใจ” ในการประชุมมหกรรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์พื้นบ้านไทย ปีที่ ๑๐ภาคตะวันออกฉียงเหนือ ในวันที่ ๒๐ กุมภาพันธ์ ๒๕๖๑จังหวัดขอนแก่น[ผนวก 3.1ข]

-นำเสนอแบบโปสเตอร์ เรื่อง “พืชวงศ์ศิลา แหล่งยาน่าสนใจ” เรื่อง “พืชวงศ์ศิลา แหล่งยาน่าสนใจ” ในการประชุมมหกรรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์พื้นบ้านไทย ปีที่ ๑๐ ภาคตะวันออกฉียงเหนือ ระหว่างวันที่ ๑๖-๒๐ กุมภาพันธ์ ๒๕๖๑ จังหวัดขอนแก่น[ผนวก 3.1ค]

2.2ทางสื่อสังคมออนไลน์

เผยแพร่ข้อมูลงานวิจัยบนเว็บไซต์ของสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ภายใต้ หัวข้อ พรรณไม้ที่น่าสนใจ ประจำเดือนเมษายน 2564, กระดานข่าววิจัยใช้ได้จริง : พืชอาหาร พืชสมุนไพร[ผนวก 3.1ง]

การทดลองที่ 3.2ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปัญจขันธ์(*Gynostemmapentaphyllum* (Thunb.) Makino) พันธุ์พื้นเมืองและลูกผสม

-การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ โดยการเผยแพร่ข้อมูลงานวิจัยบนเว็บไซต์ของสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ภายใต้ หัวข้อ พรรณไม้ที่น่าสนใจ ประจำเดือนกุมภาพันธุ์ 2565 บนกระดานข่าววิจัยใช้ได้จริง : พืชอาหาร พืชสมุนไพร[ผนวก 3.2ก]

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผล

1. เก็บรวบรวมความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชสวน จำนวน 5 พืช ได้แก่ ทุเรียน, เงาะ, บัว, กล้วยไม้สมุนไพร และพริก ได้ตัวอย่างพันธุ์พืชจำนวน 169, 36, 34, 40 และ 84 ตัวอย่าง ตามลำดับ;พันธุ์พืชไร่ จำนวน 2 พืช ได้แก่ มันสำปะหลัง และถั่วเหลือง ได้ตัวอย่างพันธุ์พืชจำนวน 17 และ 40 ตัวอย่าง ตามลำดับ; และพืชท้องถิ่น จำนวน 5 พืช ได้แก่ พืชวงศ์ศิลา ปัญจขันธ์ ปลาไหลเผือก หนอนตายหยาก และสะตอ ได้ตัวอย่างพันธุ์พืชจำนวน 19, 20, 63, 40 และ 16 ตัวอย่าง ตามลำดับ พร้อมจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงได้ 516 ตัวอย่าง ได้แก่ ทุเรียน, เงาะ, บัว, พริก, มันสำปะหลัง, ถั่วเหลือง, พืชวงศ์ศิลา, ปัญจขันธ์, 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 *rpocL*; พืชวงศ์ศิลามี 4 ยีน คือ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*และ ITS;พันธุ์ปัญจขันธ์มี 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, พืชวงศ์ศิลา 19 ตัวอย่าง,พันธุ์ปัญจขันธ์ 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, กล้วยไม้สมุนไพรได้ 39 ข้อมูลพันธุ์พืช, พริกได้ 71 ข้อมูลพันธุ์พืช, มันสำปะหลังได้ 17 ข้อมูลพันธุ์พืช, ถั่วเหลืองได้ 40 ข้อมูลพันธุ์พืช, พืชวงศ์ศิลาได้ 14 ข้อมูลชนิดพืช, ปัญจขันธ์ได้ 20 ข้อมูลพันธุ์พืช, พืชสกุลปลาไหลเผือกได้ 2 ข้อมูลชนิดพืช, พืชสกุลหนอนตายหยากได้ 6 ข้อมูลชนิดพืช และสะตอได้ 2 ข้อมูลพันธุ์พืช;และฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของทุเรียนได้ 270 ข้อมูล, เงาะได้ 187 ข้อมูล, บัวได้ 392 ข้อมูล, กล้วยไม้สมุนไพรได้ 80 ข้อมูล, พริกได้ 217 ข้อมูล, มันสำปะหลังได้ 68 ข้อมูล, ถั่วเหลืองได้ 120 ข้อมูล, พืชวงศ์ศิลาได้ 54 ข้อมูล, ปัญจขันธ์ได้ 78 ข้อมูล, พืชสกุลปลาไหลเผือกได้ 82 ข้อมูล, พืชสกุลหนอนตายหยากได้ 51 ข้อมูล และสะตอได้ 64 ข้อมูล

อภิปรายผล

การวิจัยความหลากหลายของพืชสวน พืชไร่ และพืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจของไทย จำนวน 12 กลุ่มพืช คือ ทุเรียน, เงาะ, บัว, กล้วยไม้, พริก, มันสำปะหลัง, ถั่วเหลือง, พืชวงศ์ศิลา, ปัญจขันธ์, ปลาไหลเผือก, หนอนตายหยาก และสะตอ พบว่า มีความหลากหลายของพืชแต่ละกลุ่มชัดเจน

กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถช่วยยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์กลุ่มพันธุ์ทุเรียนที่ศึกษาได้เป็นชนิดเดียวกัน คือ *Duriozibethinus*Rumpkh. ex Murray ส่วนกลุ่มพันธุ์เงาะ สามารถระบุยืนยันชื่อได้ 4 ชนิด คือ *Nepheliummutabile*Blume, *N. ramboutan-ake*(Labill.) Leenh.,*N. hypoleucom*Kursและ *Nephelium* sp. สำหรับพันธุ์บัว พบ 2 ชนิด คือ *Nymphaealotus*L. และ *N. nucifera*Gaertn.

ในกลุ่มพันธุ์พริกสามารถระบุชื่อได้ 4 ชนิด คือ *Capsicum annuum*L.,*C. baccatum*L., *C. chinense*Jacq.และ *C. frutescens* L. ด้วยข้อมูลทางสัณฐาน แต่ดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ตำแหน่ง *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 และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยส่วนโดยส่วนใหญ่ไม่สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยา ยกเว้นสีของกลีบดอกที่สอดคล้องกับการจัดจำแนกชนิดตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกกลุ่ม *C. annuum* มีค่อนข้างสูงโดยสามารถแบ่งได้ถึง 20haplotypes โดยกลุ่มพริกบางช้างมีความแปรผันทางพันธุกรรมที่มีความหลากหลายสูงถึง 5 haplotypes โดยความแปรผันนั้นไม่ขึ้นกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกลุ่มพืชไร่ พบว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้ระบุชื่อทั้งกลุ่มพันธุ์มันสำประหลังเป็น *Manihotesculenta*(L.) Crantz และกลุ่มพันธุ์ถั่วเหลืองเป็น *Glycine max* (L.) Merr. สอดคล้องกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank, NCBI

ส่วนในกลุ่มพืชท้องถิ่นจะพบความหลากหลายของชนิดพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มพืชที่สำรวจและเก็บรวบรวมจากพื้นที่ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยในกลุ่มพืชวงศ์ศิลา หรือวงศ์ Aquifoliaceaeพบความหลากหลายของชนิดพืชถึง 14 ชนิด ได้แก่ *Ilex cymosa*Blume,*I.micrococca*Maxim, *I.umbellulata*(Wall.) Loes.,*I.wallichii*Hook.f., *I.denticulata*Wall. ex Wight, *I. embelioides*Hook.f., *I. ficoidea*Hemsl., *I.odorata*Buch-Ham. ex D. Don, *I.pubifructa*Pruesapan, S. Andrews & D.A. Simpson, *I.triflora*Blume, *Ilex* sp. (1), *Ilex* sp. (2), *Ilex* sp. (3), *Ilex* sp. (4) ซึ่งข้อมูลดีเอ็นเอของชนิดพืช 8 ชนิด ได้แก่ *I.denticulata*, *I. embelioides*, *I.odorata*, , *I.pubifructa*, *Ilex* sp. (1), *Ilex* sp. (2), *Ilex* sp. (3) และ *Ilex* sp. (4) จัดเป็นข้อมูลนิวคลีโอไทด์ใหม่ของโลกที่ศึกษาได้จากงานวิจัยภายใต้โครงการวิจัยนี้ สำหรับการแยกกลุ่มพืชที่ยังไม่ได้มีการระบุชื่อชนิดที่ได้จากงานวิจัยนี้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการช่วยยืนยันสถานะชนิด เพื่อระบุชื่อที่ถูกต้องและ/หรือตั้งชื่อเป็นชนิดใหม่ของโลก

ในกลุ่มพันธุ์ปัญจขันธ์ หรือรู้จักทั่วไปในชื่อ Jiaogulanปกติจะถูกระบุชื่อเป็น *Gynostemmapentaphyllum* (Thunb.) Makino แต่เมื่อตรวจสอบข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในงานวิจัยนี้ กลับพบว่า พันธุ์ปัญจขันธ์ที่เก็บรวบรวมไว้ของประเทศไทย จำนวน 20 พันธุ์ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสกุล *Gynostemma*ชนิดอื่นๆ แยกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ปัญจขันธ์ 2 พันธุ์ มีความใกล้ชิดกับ *G. pentaphyllum*และ *G. longipes* C.Y. Wu ในขณะที่ปัญจขันธ์อีก 18 พันธุ์ กลับแสดงความใกล้ชิดกับ *G. burmanicum* King ex Chakrav. และ *G. pubescens* (Gagnep.) C.Y. Wu ซึ่งสามารถตั้งสมมติฐานถึงความเป็นไปได้ในการแยกกลุ่มปัญจขันธ์ได้ 3 ประการ คือ ประการแรก ปัญจขันธ์ทั้งหมดเป็น *G. pentaphyllum*แต่ด้วยลักษณะทางสัณฐานของพืชที่ใกล้ชิดกันมาก จนเกิดความสับสนในการเรียกชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า *Gynostemma*ทั้ง 4 ชนิด แท้จริงอาจจะเป็นชนิดเดียวกัน ดังข้อโต้แย้งของนักพฤกษอนุกรมวิธานในการยุบรวมพืชทั้ง 3 ชนิดให้เป็นชนิดเดียวกันภายใต้ *G. pentaphyllum*ประการที่สอง

กรมวิชาการเกษตร

ปัญจขันธ์ทั้ง 2 กลุ่มเป็น *Gynostemma* ต่างชนิดกัน ซึ่งความเป็นไปได้นี้ได้ถูกพิสูจน์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอของพืชทั้งจีโนมแล้วว่า ชื่อพืชทั้ง 3 ชนิด แยกกันด้วยข้อมูลดีเอ็นเออย่างชัดเจน แต่ในงานวิจัยนี้ ได้ใช้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่สั้นเกินไป จึงไม่สามารถระบุได้ว่า ปัญจขันธ์ของไทยทั้ง 20 พันธุ์ พันธุ์ใดมีชื่อวิทยาศาสตร์ใดบ้างใน *Gynostemma* ทั้ง 4 ชนิดที่ใกล้ชิดด้วยนี้ เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานใกล้ชิดกันมาก ดังนั้น การวิเคราะห์ข้อมูลพันธุ์พืชทั้งจีโนมจะสามารถยืนยันชื่อพันธุ์ปัญจขันธ์ของไทยได้อย่างชัดเจน

ในการศึกษาพืชกลุ่มปลาไหลเผือก สามารถพิสูจน์ชื่อพืชได้ 2 ชนิด คือ *Eurycoma harmandiana* Pierre และ *Eurycoma longifolia* Jack โดยไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรของพืชสกุลปลาไหลเผือกทั้ง 2 ชนิด เช่นเดียวกันกับพืชกลุ่มหนอนตายหยากที่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรของชนิดพืช แต่พบความแตกต่างของชนิดพืชที่ถูกถูกจำแนกได้ทั้ง 5 ชนิด คือ*Stemona collinsiae* Craib, *S.curtisii* Hook.f., *S.pierrei* Gagnep.,*S.phyllantha* Gagnep., และ *S.rupestris*Inthachub สำหรับสะตอนั้น ชื่อที่ระบุเป็น *Parkiaspeciosa*Hassk. ถูกต้องสอดคล้องกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank, NCBI แต่ดีเอ็นบาร์โค้ดที่ใช้ไม่สามารถจำแนกกลุ่มพันธุ์ออกจากกันได้

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

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

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

ในการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงไม่สามารถทำได้ทุกตัวอย่าง เนื่องจากบางตัวอย่างไม่มีการออกดอกติดผล

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

ปิยดา บุสดี ธีระชัย ธนานันท์ และนฤมล ธนานันต์. 2558. การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน rpoC1 และ rbcL. ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 23(6): 983-993.

สุชาดา สุขหร่อง. 2553. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรุโณทัย ซาววา สุภาวดี ง้อเหรียญอัญชลี ศรีสุวรรณ ประพิศ วองเทียม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). รายงาผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-118.

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.

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.

Flora of Thailand. 2011. Stemonaceae. 11(1): 74-99.

Kress, W. J. and D. L. Erickson. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* sequences. Journal of Plant Research 109: 21-27.

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.

Pajaree Inthachub. 2008. Taxonomic revision on the family STEMONACEAE in Thailand. Master's Thesis, Kasetsart University, Thailand.

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.

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 *Mimulusguttatus* species complex. Molecular biology and evolution 10(6): 1273-1288.

Rogers, S.O. and A.J. 1987.Bendich.Heritability and variability in ribosome RNA genes of *Viciafaba*. Genetics 117: 287-295.

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.

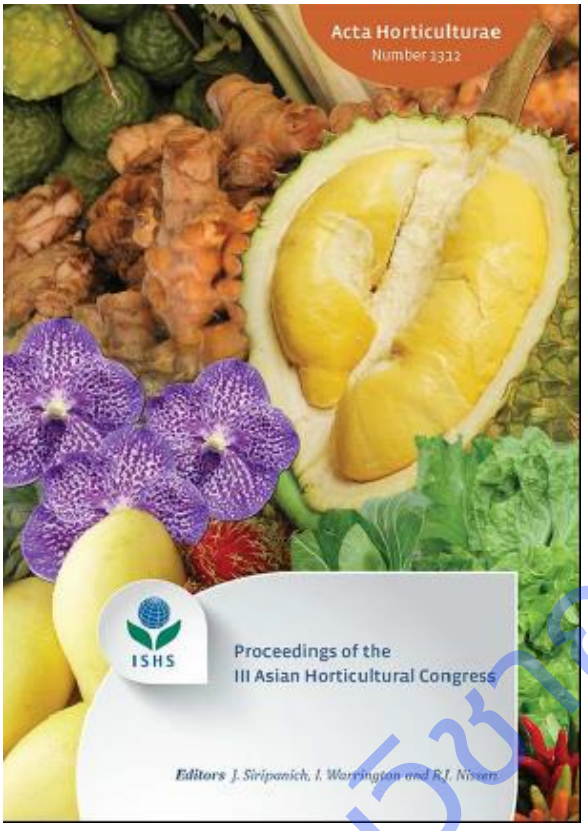
Yao, P.C., H.Y. Gao, Y.N. Wei, J.H. Zhang, X.Y. Chen and H.-Q. Li. 2017. Evaluating sampling strategy for DNA barcoding study of coastal and inland halo-tolerant poaceae and chenopodiaceae: A case study for increased sample size. PLOS ONE. 12: e0185311. 14 pages.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

ผนวก 1.2ก

ผลงานตีพิมพ์วิชาการในวารสารระดับนานาชาติเรื่อง DNA barcode for rambutan diversity in Thailand using chloroplast genome regions ใน วารสาร Acta Horticulturae Number 1312



DNA barcode for rambutan diversity in Thailand using chloroplast genome regions

T. Chutinanthalcun[1]*, A. Sawwa[2], O. Chusri[3], K. Pruesapan[4] and S. Petsiri[5]

[1]Horticulture Research Institute, Department of Agriculture Bangkok, Thailand; [2]Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand; [3]Chanthaburi Horticultural Research Center, Chanthaburi, Thailand; [4]Plant Varieties Protection Office, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand.

Abstract

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 Nephelliums, 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 (*psbA*, *trnL* and *rpoC*). Seventeen samples of rambutan were collected from the field at Chanthaburi Horticultural Research Center for analysis. Among these, 14 samples are classified as *N. lappaceum*. Six of the commercial cultivars and eight hybrid cultivars including 'Rongrien', 'Seechompoo', 'Seethong', 'Bangyeekhan', 'Namtankraud', 'Jaemong' and 'Pliew 1-8' were analyzed. The other three samples were Pulasan (*N. rambouton-ake* (Labill.) Leenh.), *Nephelium* sp. No. 1 and *Nephelium* sp. No. 2. Extracted DNA samples were evaluated with 3 universal primers of *psbA*, *trnL* and *rpoC*. The result showed that using *psbA* primer separated the group of 'Seethong' and 'Pliew 2' ('Seethong' × 'Jaemong') and group of *Nephelium* sp. No. 2 from the others. Whereas *trnL*, *rpoC* and combination of three primers could not explicitly explain the diversity within rambutan. Our study will further examine more specific primers to confirm the relationships of the Thai rambutans. The genetic diversity of cultivated rambutan from this study will be used as a genetic database for development of a future breeding program.

Keywords: rambutan genetics, phylogenetic relationships, barcode sequencing

INTRODUCTION

The genus *Nephelium* is distributed throughout South-East Asia. *N. lappaceum* is known as rambutan. Rambutan is commonly cultivated in orchards and home gardens in Thailand, Malaysia, and Indonesia. Another species such as pulasan (*N. rambouton-ake*) is a close relative and is rarely cultivated. However, fruits are sold in the local markets in Malaysia and Indonesia (Salma et al., 2015). *N. lappaceum* reveals a wide range of genetic variation within the species. The seedling progeny of *N. lappaceum* is heterogenous and shows a great variability in fruit characters. For instance, characteristics such as fruit size, shape, color, taste, thickness, juiciness, flavor and flesh adherence to the seed (Salma, 1986). Thailand has a high diversity of rambutan clones, including 'Rongrian', 'Seechompoo', 'Seethong', and 'Bangyeekhan'. However, the diversity of the *Nephelium* species has been not fully exploited. They are rapidly declining and in danger of being lost forever. Even though, Chanthaburi Horticultural Research Center, Department of Agriculture, has bred a new hybrid, 'Pliew 1'-'Pliew 8', the identification for each cultivar, especially from seedlings, is very difficult. Therefore, a study will be undertaken using a molecular technique, short DNA sequence to identify phylogenetic relationships.

DNA barcode is a technique used for identifying species using short orthologous DNA sequences. It is gradually being tested in many areas as a cost-effective tool for identifying and regulating pests, invasive and disease-carrying species, trade and sale of endangered species, and for many other species (Onuminya and Ogundipe, 2016). The goal of barcoding is that

*E-mail: t.chutinan@gmail.com

Acta Hortic. 1312. ISHS 2021. DOI 10.17660/ActaHortic.2021.1312.12
Proc. III Asian Horticultural Congress
Eds.: J. Siripanich et al.

กรมวิชาการเกษตร

ผนวก 1.2ข

การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ โดยการนำเสนอโปสเตอร์ เรื่อง DNA barcode for rambutan diversity in Thailand using chloroplast genome regions

กรมวิชาการเกษตร

ผนวก 1.5ก

การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ โดยการนำเสนอแบบปากเปล่า เรื่องMolecular phylogeny and DNA barcode regions efficacy for identification the variety of *Capsicum annuum* L. in Thailand

S6_3

Molecular phylogeny and DNA barcode regions efficacy for identification the variety of *Capsicum annuum* L. in Thailand

T. Luangsuphabool, Genebank Research and Development Group, Biotechnology Research and Development, Thanyaburi, 12110, Thailand; theerapat.l@hotmail.com
A. Wongpia, Genebank Research and Development Group, Biotechnology Research and Development, Thanyaburi, 12110, Thailand; aphinya.wongpia@gmail.com
P. Sangkasa-ad, Genebank Research and Development Group, Biotechnology Research and Development, Thanyaburi, 12110, Thailand; psk50-2003@hotmail.com
T.N. Nan, Genebank Research and Development Group, Biotechnology Research and Development, Thanyaburi, 12110, Thailand; taweepong2785@gmail.com
K. Pipithsangchan, Genebank Research and Development Group, Biotechnology Research and Development, Thanyaburi, 12110, Thailand; kunyapithsan@gmail.com
K. Thammasiri, Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Thanon Rama VI, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand; kanchitthammasiri@gmail.com

Capsicum annuum L. is an important hot chili species for commercial vegetable crop. This species has various varieties that were cultivated in several localities in Thailand. The genetic diversity of *C. annuum* group in Thailand is poorly known. The aim of this study is to test the efficacy of DNA barcodes for identifying the *C. annuum* group and to understand the genetic relationships among variety within this species. Seventeen samples were represented from twelve varieties for molecular analysis. All samples were successfully amplified and generated DNA sequences from the internal transcribed spacer (ITS), the large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase (*rbc*L) and Maturase K (matK) regions. Molecular phylogeny was analyzed based on the maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) methods with each of single DNA locus. The results showed that two DNA loci (*rbc*L and matK) did not distinguish between species level; while, ITS region showed high genetic diversity within this species. The phylogenetic tree based on ITS region can delimit the *C. annuum* from other species (C. *baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, and *C. pubescens*). Also, the phylogeny divided *C. annuum* species into three groups and revealed to this taxa as species complex. The morphological characters did not relate to molecular evidences, which shared between varieties. In addition, *C. annuum* (Phrik Bang Chang) group demonstrated that more genetic diversity than previous estimate, which separated into four subgroups with strong molecular data supports. This study suggested that DNA barcode via ITS region was suitable for *C. annuum* identification into the species and variety level. However, the further study needs to investigate on the phylogenetic analysis from other DNA regions and more phenotypic characters, such as chemotaxonomy to clarify the relationship of species complex within *C. annuum* species.

Keywords: *Capsicum annuum*, DNA barcoding, genetic diversity, molecular phylogeny, Thailand

กรมวิชาการเกษตร

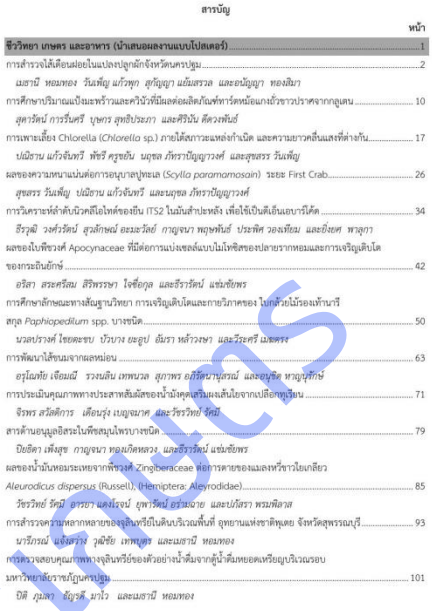
ผนวก 2.1ก

ผลงานตีพิมพ์วิชาการในวารสารระดับชาติเรื่องการประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์ ของดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด สำหรับการจำแนกระดับพันธุ์ของมันสำปะหลัง

กรมวิชาการเกษตร

ผนวก 2.1ข

ผลงานตีพิมพ์วิชาการในวารสารระดับชาติเรื่องการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* ในมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด. การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 13 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม วันที่ 8-9 กรกฎาคม 2564. 34-41.



สารบัญ

หน้า

ชีววิทยา เกษตร และอาหาร (นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์) 1

การสำรวจไส้เดือนฝอยในแปลงปลูกผักจังหวัดนครปฐม 2
เมธามี หอมทอง วันเพ็ญ แก้วพุฒา สุภัญญา แย้มสรวล และอนัญญา ทองสิมา

การศึกษาปริมาณแป้งมะพร้าวและคาร์บังที่มีผลต่อผลิตภัณฑ์ทาร์ตหน้าเนื้อกุ้งขาวปาศจากกลูเตน 10
สุดารัตน์ การรื่นศรี บุษกร สุขธิประภา และศิริมัน ศิดวงพันธ์

การเพาะเลี้ยง Chlorella (*Chlorella* sp.) ภายใต้สภาวะแหล่งกำเนิด และความยาวคลื่นแสงที่ต่างกัน 17
ปณิธาน แก้วจันทรี พัชรี ครูยอัน นฤชล ภัทราปัญญาวงศ์ และสุชสรร วันเพ็ญ

ผลของความหนาแน่นต่อการอนุบาลปูทะเล (*Scylla paramomosain*) ระยะ First Crab 26
สุชสรร วันเพ็ญ ปณิธาน แก้วจันทรี และนฤชล ภัทราปัญญาวงศ์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS2 ในมันสำปะหลัง เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด 34
ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ กาญจนา พฤษพันธ์ ประพิศ วองทีขม และยิ่งยศ พาลุกา

ผลของไบพีชวงศ์ Apocynaceae ที่มีต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของปลายรากหอมและการเจริญเติบโต
ของกระถินยักษ์ 42
อริสา สระศรีสม สิริพรรษา ใจซื่อกุล และธีรวรัตน์ แซ่มซิพร

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญเติบโตและกายวิภาคของ ไบกล้วยไม้รองเท้านารี
สกุล *Paphiopedilum* spp. บางชนิด 50
นวลปรางค์ ไชยคะชบ บัวบวง ยะอูป๊ะ อัมรา หล้าวงษา และวีระศรี แซ่ตรง

การพัฒนาไส้ขนมจากผลหม่อน 63
อรุโณทัย เจือมณี รวงผึ้ง เทพนวล สุภาพร อภิรัตนานุสรณ์ และอนุธิดา หาญบุรักษ์

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำมังคุดเสริมผงเส้นใยจากเปลือกกุ้งขาว 71
จิรพร สวัสดิการ เตือนรุ่ง เบญจมาศ และวัชรวิทย์ จักมี

สารต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรบางชนิด 79
ปิยธิดา เพ็งสุข กาญจนา หอมภิหลวง และธีรวรัตน์ แซ่มซิพร

ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์ Zingiberaceae ต่อการตายของแมลงหวี่ขาวใยเกลียว
Aleurodicus dispersus (Russell). (Hemiptera: Aleyrodidae) 85
วัชรวิทย์ จักมี อารยา แคล้วรงค์ ยุพาวัลย์ อร่ามอาย และปภัสรา พรมพิลาส

การสำรวจความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินบริเวณพื้นที่ อุทยานแห่งชาติพุเตย จังหวัดสุพรรณบุรี 93
นารีภรณ์ แย้มสวัสดิ์ วุฒิชัย เทพบุตร และเมธามี หอมทอง

การตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ของตัวอย่างน้ำดื่มจากตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญบริเวณรอบ
มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม 101
ปิติ กุมลา ธัญรดี มาโว และเมธามี หอมทอง

กรมวิชาการเกษตร

ผนวก 3.1ก

ผลงานตีพิมพ์วิชาการในวารสารระดับชาติเรื่องความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุล *Ilex* L. (Aquifoliaceae) ในประเทศไทยด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ(Diversity and Phylogenetic Relationships of Thai *Ilex* L. (Aquifoliaceae) Based on DNA Data) ใน วารสารวิชาการเกษตร เล่มที่ 40 ฉบับที่ 1 ปี 2565 (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

ผนวก 3.1ข

การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ ในการประชุมวิชาการระดับชาติ โดยเป็นวิทยากรบรรยาย เรื่อง “พืชวงศ์ศิลา แหล่งยาน่าสนใจ” ในการประชุมมหกรรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์พื้นบ้านไทย ปีที่ ๑๐ภาคตะวันออกฉียงเหนือในวันที่ ๒๐ กุมภาพันธ์ ๒๕๖๑จังหวัดขอนแก่น

ผนวก 3.1ค

การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ ในการประชุมวิชาการระดับชาติ โดยการนำเสนอโปสเตอร์ เรื่อง “พืชวงศ์ศิลา แหล่งยาน่าสนใจ” เรื่อง “พืชวงศ์ศิลา แหล่งยาน่าสนใจ” ในการประชุมมหกรรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์พื้นบ้านไทย ปีที่ ๑๐ภาคตะวันออกฉียงเหนือระหว่างวันที่ ๑๖-๒๐ กุมภาพันธ์ ๒๕๖๑จังหวัดขอนแก่น

ที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	พื้นที่การกระจายพันธุ์	ชื่อพื้นเมือง
1	**Ilex celebensis** Capit.	ภาคใต้	-
2	**Ilex chapaensis** Merr.	ภาคตะวันออกเฉียงใต้	-
3	**Ilex chevalieri** Tardieu	ภาคกลาง	-
4	**Ilex cymosa** Blume	ภาคตะวันออกเฉียงใต้ ภาคใต้	ชีโก้ ไทรชีใต้ ไม้มะ ศิลา
5	**Ilex denticulata** Wall. ex Wight	ภาคเหนือ ภาคใต้	-
6	**Ilex embelioides** Hook.f.	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	-
7	**Ilex englishii** Lace	ภาคตะวันตกเฉียงใต้	-
8	**Ilex ficoidea** Hemsl.	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	-
9	**Ilex godajam** (Colebr.) Wall. ex Hook.f.	ภาคใต้	ตานแดง
10	**Ilex macrophylla** Wall. ex Hook.f.	ภาคใต้	-
11	**Ilex micrococca** Maxim.	ภาคเหนือ ภาคตะวันตกเฉียงใต้ ภาคกลาง ภาคใต้	-
12	**Ilex odorata** Buch.-Ham. ex D.Don	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก	-
13	**Ilex pubifructa** Pruesapan, S. Andrews & D.A. Simpson	ภาคเหนือ	-
14	**Ilex triflora** Blume	ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคใต้	สายฝน
15	**Ilex umbellulata** (Wall.) Loes.	ภาคเหนือ ภาคตะวันตก ภาคกลาง ภาคใต้	เน่าใน
16	**Ilex wallichii** Hook.f.	ภาคตะวันออกเฉียงใต้/เฉียงใต้ ภาคใต้	กำฉา รามใต้ ศิลา

ตัวอย่าง

ผนวก 3.1ง

การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะทางสื่อสังคมออนไลน์ โดยเผยแพร่ข้อมูลงานวิจัยบนเว็บไซต์ของสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ภายใต้ หัวข้อ พรรณไม้ที่น่าสนใจประจำเดือนเมษายน 2564 บนกระดานข่าววิจัยใช้ได้จริง : พืชอาหาร พืชสมุนไพร

กรมวิชาการเกษตร

ผนวก 3.2ก

การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะทางสื่อสังคมออนไลน์ โดยการเผยแพร่ข้อมูลงานวิจัยบนเว็บไซต์ของสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ภายใต้ หัวข้อ พรรณไม้ที่น่าสนใจ ประจำเดือนกุมภาพันธุ์ 2565 บนกระดานข่าววิจัยใช้ได้จริง : พืชอาหาร พืชสมุนไพร

กรมวิชาการเกษ