รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย

การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรม

2. โครงการวิจัย

ความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ

กิจกรรม ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชท้องถิ่น

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายของปลาไหลเผือก

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) DNA Barcodes and Diversity of *Eurycoma longifolia* Jack

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางอัญชลี แก้วดวง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวอรุโณทัย ซาววา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวกาญจนา พฤษพันธ์	สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช
	นายสมคิด ดำน้อย	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกระบี่

5. บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดศึกษาความหลากหลายของพืชสกุลปลาไหลเผือกที่สำรวจรวมรวมจากพื้นที่การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย โดยกำหนดพื้นที่จังหวัดตามการแบ่งเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณของประเทศไทย โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rbcL*, *rpoC* และ ITS ผลการศึกษาได้ข้อมูลดีเอ็นเอที่จะลงทะเบียนเก็บรักษาไว้บนระบบออนไลน์ของ National Center for Biotechnology Information เพื่อใช้ในการระบุยืนยันปลาไหลเผือกรวมทั้งสิ้น 82 ข้อมูล ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rbcL*และ *rpoC* ไม่มีตัวแทนที่สามารถใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกของประเทศไทยได้ จึงใช้เฉพาะข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS ในการวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือก พบว่า ปลาไหลเผือกชนิด *Eurycoma harmandiana* แยกออกจากกลุ่มปลาไหลเผือกชนิด *Eurycoma longifolia* Jack อย่างชัดเจน ส่วนกลุ่มปลาไหลเผือกชนิด *Eurycoma longifolia* Jack มีความแตกต่างทางพันธุกรรมแยกกลุ่มอย่างชัดเจนเพียง 2 กลุ่ม และควรมีการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาไหลเผือกที่กระจายพันธุ์ในเขตภูมิศาสตร์พืชอีก 2 เขต เพิ่มเติม เพื่อความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นของงานวิจัย

Abstract

This study was performed to utilize DNA barcode techniques to study the diversity of the genus Eurycoma plant collected and surveyed from the distribution area in Thailand. By defining the provincial area according to the geographical zoning of the flora of Thailand using

กรมวิชาการเกษตร

DNA barcode markers, rbcL, rpoC and ITS regions, the results demonstrated the total of 82 Eurycoma-identifying DNA data deposited on the NCBI. Using rbcL and rpoC DNA barcode regions, these markers were unable to identify the genetic diversity among Thai phlebae. To meet this need, we have applied DNA barcode within ITS region in analyzing the genetic diversity of Eurycoma. The results have shown that there was clearly no correlation between Eurycoma harmandiana and Eurycoma longifolia. For the Eurycoma longifolia identification, there were only two distinct genetic diversity groups identified. This study suggests more survey and collection of Eurycoma spp. presented from two other plant geographic areas for the completion of the study.

6. คำนำ

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

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

จากแนวโน้มความต้องการของรากปลาไหลเผือกที่เพิ่มสูงขึ้น เพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพ ซึ่งส่วนใหญ่ถูกขุดออกมาจากป่าธรรมชาติ ส่งผลให้ปริมาณต้นปลาไหลเผือกในป่าธรรมชาติลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว อีกทั้งไม่มีการปลูกทดแทน หรือปลูกเพื่อการผลิตในเชิงการค้า จึงอาจส่งผลให้สมุนไพรปลาไหลเผือกสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม ตลอดจนส่งผลให้เกิดการสูญพันธุ์ในอนาคตได้ นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่ระบุว่าเป็นรากปลาไหลเผือกร้อยเปอร์เซ็นต์ กลับพบว่ามีการนำพืชชนิดอื่นมาเป็น

กรมวิชาการเกษตร

ส่วนผสมเพื่อลดต้นทุน และไม่สามารถตรวจสอบหรือตรวจสอบได้ยาก จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) มาช่วยในการจำแนกหรือแยกความแตกต่างระหว่างปลาไหลเผือกกับพืชชนิดอื่น หรือพืชที่มีความใกล้ชิดและคล้ายคลึงกัน

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

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

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

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

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างต้นปลาไหลเผือกที่สำรวจรวบรวมจากพื้นที่การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย (ตารางที่ 2)
2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์
    - เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis)
    - เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
    - เครื่องตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอและผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (Gel documentation System)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

- เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
- ชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)
- ตู้อบ (Memmert UF750)
- ไมโครไปเปต ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

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

3. วัสดุอุปกรณ์ในการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย เช่น กรรไกรตัดกิ่ง กระดาษหนังสือพิมพ์ แผงอัดพรรณไม้และเชือกมัด กระดาษลูกฟูก ฟองน้ำ ถุงพลาสติก ป้ายชื่อ สมุดบันทึก ดินสอดำ2 B กระดาษติดผนึกพรรณไม้แห้ง เข็ม-ด้าย

4. สารเคมี เช่น ชุดสีฟลูออเรสเซนต์สำหรับย้อมดีเอ็นเอ, ผงอะกาโรส, ไนโตรเจนเหลว, แอลกอฮอล์, DNA Ladder, sodium EDTA ,Tris-HCl, NaCl, Isopropanol, RNaseA, $MgCl_2$, dNTP, Taq DNA polymerase

วิธีการ

1. การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลปลาไหลเผือกและการจัดทำตัวอย่างอ้างอิง

1.1สำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลปลาไหลเผือก

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

1.2 การจัดทำตัวอย่างอ้างอิง

ศรีนครินทร์

นำชิ้นส่วนจากตัวอย่างที่สำรวจและรวบรวมได้มาจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย (Voucher specimens) ตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บรวมรวมชิ้นตัวอย่าง ติดป้ายหมายเลขพันธุ์ บันทึกข้อมูลพืชอัดทับและอบแห้ง อาบน้ำยารักาสภาพพรรณไม้ ติดผนึกพรรณไม้ ติดฉลากรายละเอียดพืชจนถึงขั้นตอนลงทะเบียนเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืช โดยได้ดำเนินการตามหลักการจัดทำพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย และลงทะเบียนเก็บรักษาไว้เป็นตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัยในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร (Bangkok Herbarium, BK)

2. ศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุลปลาไหลเผือก

2.1 นำตัวอย่างชิ้นส่วนใบปลาไหลเผือกมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี CTAB เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2% β-mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งใบ 5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Choroform:Isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Choroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAC 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยนำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร โดยแยกเก็บเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ชุดที่ 2 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิงงานวิจัย เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *rbcL, rpoC1* และ ITS (ตารางที่ 1) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยเตรียมส่วนผสมดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) จำนวน 4 ไมโครลิตร 10x PCR buffer ($(NH_4)_2SO_4$) 8 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ 8 ไมโครลิตร 2mM dNTP 8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (10 uM) อย่างละ 4 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.5 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 100 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่องthemal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 แสดงไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
rpoC1_1_F	GGCAAAGAAGGAAGATTTCG	Paween *et al*., 2011
rpoC1_1_R	TGAGAAAACATAAGTAAACGAGC	Paween *et al*., 2011
rbcL – F	ATGTCACCACAAACAGAAACTAAAGC	Paween *et al*., 2011
rbcL – R	CTTCGGCACAAAATAAGAAACGATCTC	Paween *et al*., 2011
ITS1	ATCCATATGGAAATCTTGGTTC	Paween *et al*., 2011
ITS4	GTTCTAGCACACGAAAGTCG	Paween *et al*., 2011

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

2.4 นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบริเวณ *rbcL*, *rpoC*, และ ITS ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบความปนเปื้อนด้วยโปรแกรม BlastN บนฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit 7 (Hall, 1999) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้ไปจัดเรียง (Alignment) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกจาก ITS ได้เพิ่มเติม Ingroup taxa คือ *Eurycoma longifolia* หมายเลข GenBank accession MG64310 และ MN715379 และ Outgroup taxa ซึ่งเป็นสกุลพืชในวงศ์ Simaroubaceae เดียวกันกับปลาไหลเผือก คือ *Simaba cuneata*A.St.-Hil.&Tul.,*Quassia amara* L. และ *Picrasma crenata* Engl. หมายเลข GenBank accessionMG643082, MG643114 และ MG643115 ตามลำดับที่ดาวน์โหลดจากฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม ClustalW (Thompson *et al*., 1994) ด้วยวิธี Multiple alignment และตรวจสอบความถูกต้องของการจัดเรียงด้วยตาเปล่าอีกครั้ง

2.5 การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือก

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เวลาและสถานที่

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

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลปลาไหลเผือก

จากการสำรวจและรวบรวมพบว่ามีการกระจายพันธุ์เกือบทุกภูมิภาคของประเทศไทย การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการสำรวจในพื้นที่เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณ 5 เขต ทั้งหมด 18 จังหวัด รวบรวมได้ทั้งหมด 63 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) จำนวน 59 ตัวอย่างพบเป็นปลาไหลเผือก *Eurycoma longifolia* Jack และมีเพียง 4 ตัวอย่างเป็นปลาไหลเผือกน้อย *Eurycoma harmandiana* Pierre

ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างปลาไหลเผือก ที่สำรวจและเก็บรวบรวมในเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณของประเทศไทย

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

ศรีวิชาการเกษตร

1. ปลาไหลเผือก หรือ ปลาไหลเผือกใหญ่ *Eurycoma longifolia* Jack เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดเล็ก ต้นที่สำรวจพบในจังหวัดกระบี่ มีความสูงมากที่สุดประมาณ 6 เมตร อย่างไรก็ตามต้นที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติสามารถสูงได้ถึง 10-15 เมตร ใบเป็นใบประกอบ ยาว 20-40 เซนติเมตร ใบย่อยเรียงตรงข้าม รูปใบหอกแกมรูปไข่กลับหรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่ ขนาดใบย่อยกว้าง 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 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 2)

ก

ข

ค

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะต้น (ก, ข) ใบ (ค) ดอก (ง, จ, ฉ) ผลอ่อน (ช) ผลแก่ (ซ) และราก (ฌ) ของปลาไหลเผือก *Eurycoma longifolia* Jack

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะต้น และ ใบ ของปลาไหลเผือกน้อย *Eurycoma harmandiana* Pierre

กรมวิชาการเกษตร

การจัดเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัยของปลาไหลเผือก

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

ตารางที่ 3 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของปลาไหลเผือก 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
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

กรมวิทยาศาสตร์

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
41	AK57	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071307
42	AK58	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071308
43	AK59	*Eurycoma longifolia* Jack	BK 071309

ภาพที่ 3 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของปลาไหลเผือก *E. longifolia* ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 4 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงของปลาไหลเผือก *E. harmandiana* ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ความจำเพาะของดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาไหลเผือก

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

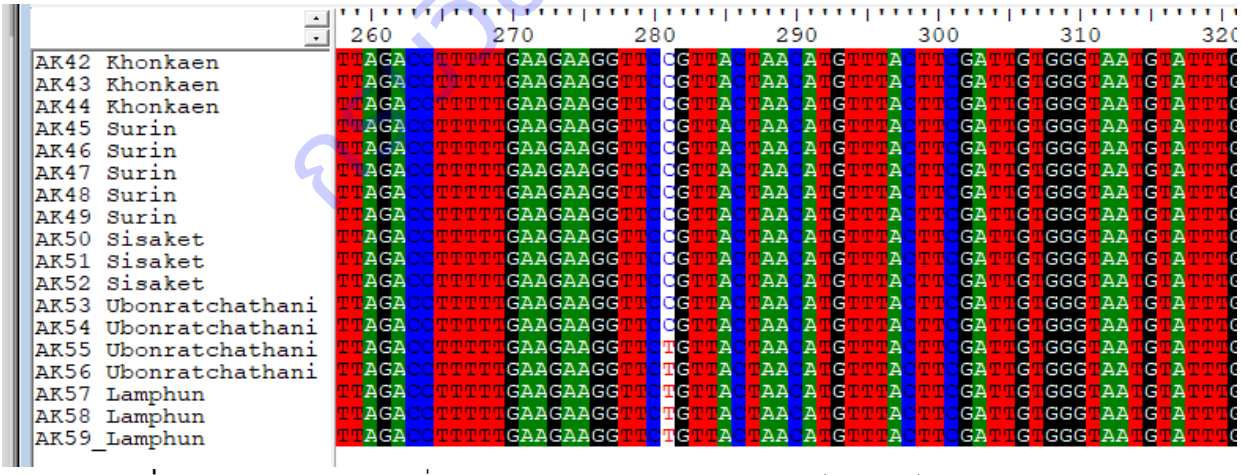
ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ความยาว 696-698 คู่เบส โดยปลาไหลเผือกชนิด *E. harmandiana* (AK55) มีความยาวมากที่สุด คือ 698 คู่เบส ในขณะที่ปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* ทั้ง 31 ตัวอย่าง มีความยาวเท่ากัน คือ 696 คู่เบส ส่วนดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rbcL* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ความยาว 526 คู่เบส โดยสามารถศึกษาปลาไหลเผือกได้ทั้ง 2 ชนิด คือ *E. harmandiana* และ *E. longifolia* และดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rpoC* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ความยาว 423 คู่เบส โดยตัวอย่างปลาไหลเผือกที่ศึกษาได้ทั้ง 32 ตัวอย่าง มีเฉพาะตัวแทนชนิด *E. longifolia* รวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้รวมทั้งสิ้น 82 ตัวอย่าง

จากการตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *rpoC* ด้วยการ BlastN พบว่า มีเพียงข้อมูลดีเอ็นเอของปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* หมายเลข GenBank accession MH751519 (Wei *et al*.,

2019) ซึ่งเป็นการศึกษาทั้งจีโนมพืชถูกลงทะเบียนบันทึกไว้บนระบบ NCBI ดังนั้น ข้อมูลดีเอ็นเอของปลาไหลเผือกที่ได้จากงานวิจัยนี้ทั้ง 32 ตัวอย่าง จึงเป็นข้อมูลใหม่ที่จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการใช้เป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rpoC* ในการพิสูจน์ชื่อปลาไหลเผือกในงานด้านสมุนไพร นอกจากนี้ยังพบว่าข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาไหลเผือกน้อยชนิด *E. harmandiana* บริเวณ *rbcL* และ ITS ที่ได้จากงานวิจัยนี้จำนวน 3 หมายเลข เป็นข้อมูลใหม่

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือก

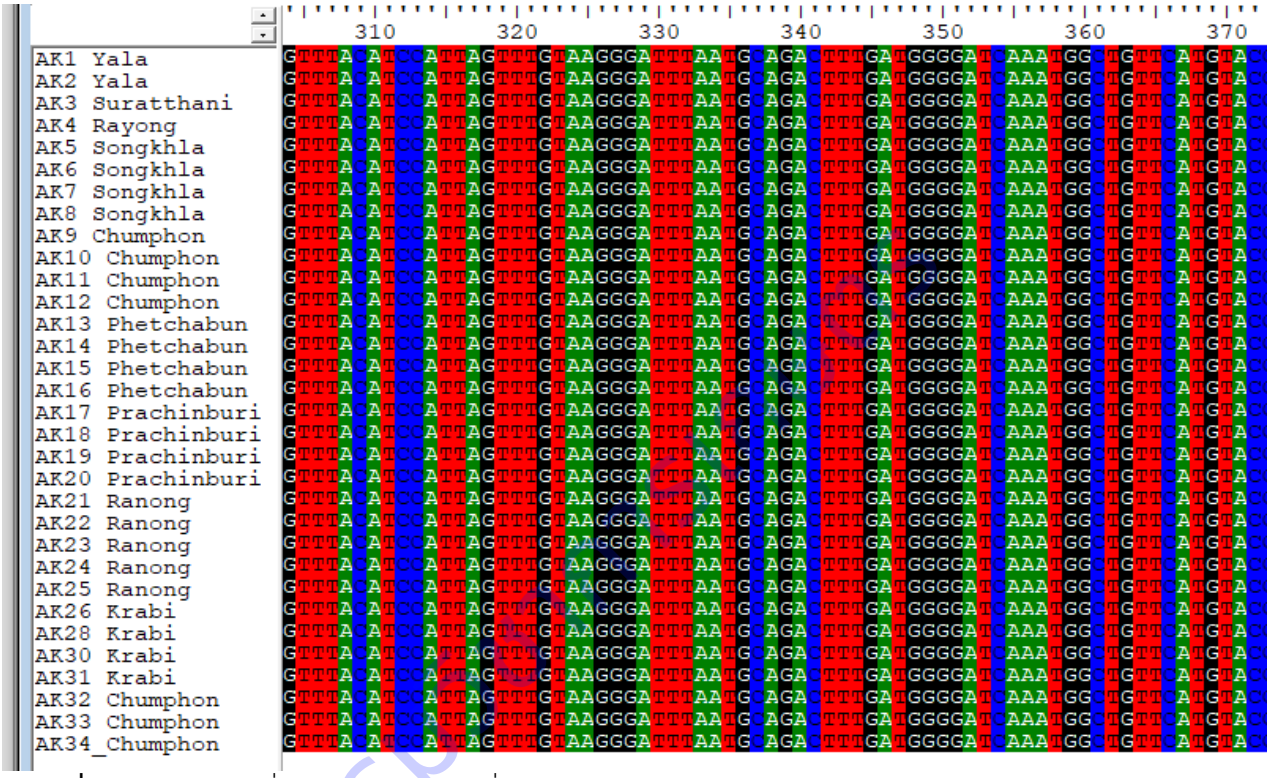
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกทั้งบริเวณ *rbcL, rpoC*, และ ITS มาจัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าเมตริกซ์ของ *rbcL* ทั้ง 18 ตัวอย่าง มีความยาว 526 ตำแหน่ง โดยมีความหลากรูปที่เกิดจากการกลายแบบ pyrimidine transition (C<-->T) ของตัวอย่างที่ตำแหน่งที่ 281 (ภาพที่ 5) โดยพบว่า ความผันแปรทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกชนิด *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 5 แสดงความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาไหลเผือกบริเวณ *rbcL*

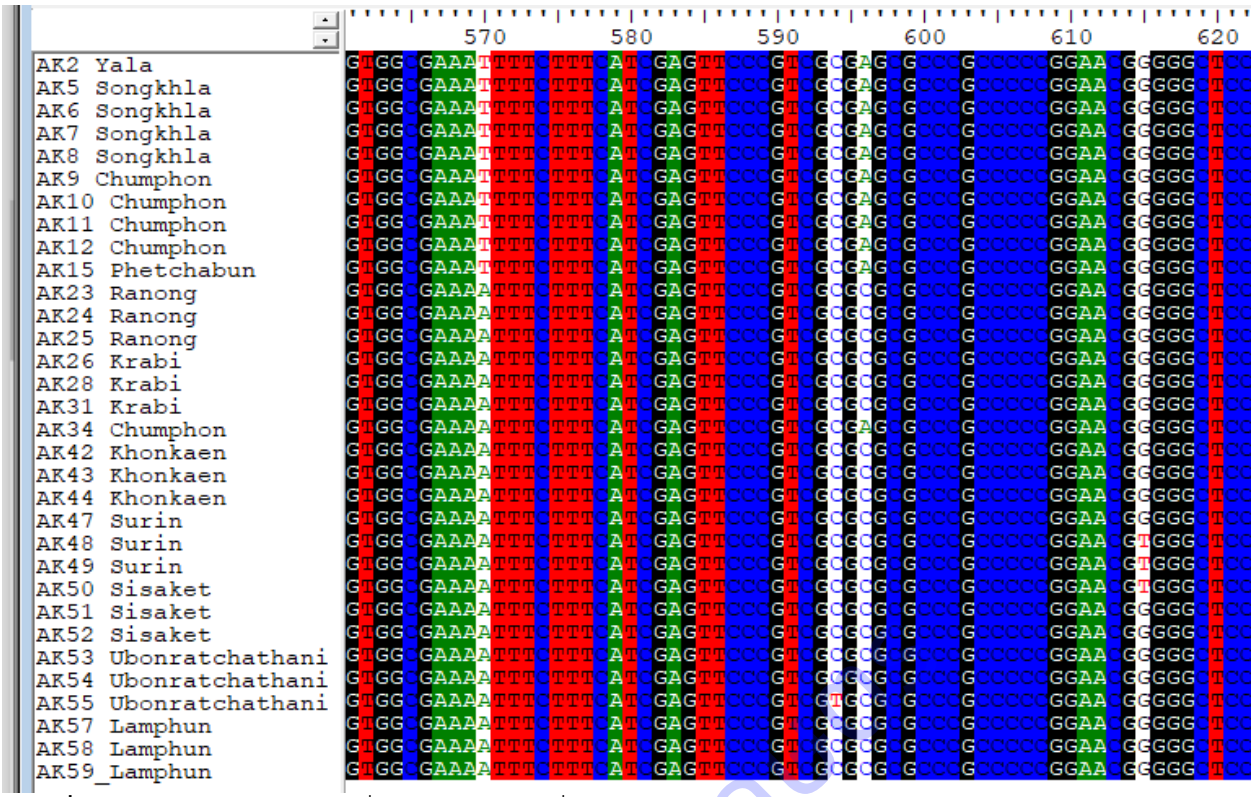
ส่วนเมตริกซ์ของ *rpoC* ทั้ง 32 ตัวอย่าง (ภาพที่ 6) เมื่อจัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งด้วยโปรแกรม ClustalW แล้ว พบว่ามีความยาว 423 ตำแหน่ง และไม่มีความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ปรากฏในดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rpoC* ของปลาไหลเผือกทั้ง 32 ตัวอย่าง ซึ่งมีตัวแทนตัวอย่างมาจากพื้นที่แตกต่างกัน 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 มีเฉพาะตัวแทนของปลาไหลเผือกชนิด *E. longifolia* จึงไม่สามารถทำนายได้ว่ามีความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกชนิด *E. harmandiana* เกิดขึ้นหรือไม่



ภาพที่ 6 แสดงบริเวณที่ไม่มีความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาไหลเผือกบริเวณ *rpoC*

ส่วนเมตริกซ์ของ ITS ทั้ง 32 ตัวอย่าง (ภาพที่ 7) เมื่อจัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งด้วยโปรแกรม ClustalW แล้ว พบว่ามีความยาว 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 4) ปลาไหลเผือกบริเวณบาร์โค้ด ITS ที่ศึกษาได้ในงานวิจัยนี้มีตัวแทนจาก 4 จาก 5 เขตภูมิศาสตร์พืชพรรณที่เก็บสำรวจและรวบรวมมา ขาดเพียงตัวแทนจากเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณภาคตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้น ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกที่ได้จากข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS นี้ จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกต่อไป



ภาพที่ 7 แสดงตัวอย่างตำแหน่งที่มีความหลากรูปที่เกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาไหลเผือกบริเวณ ITS

ตารางที่ 4 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
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

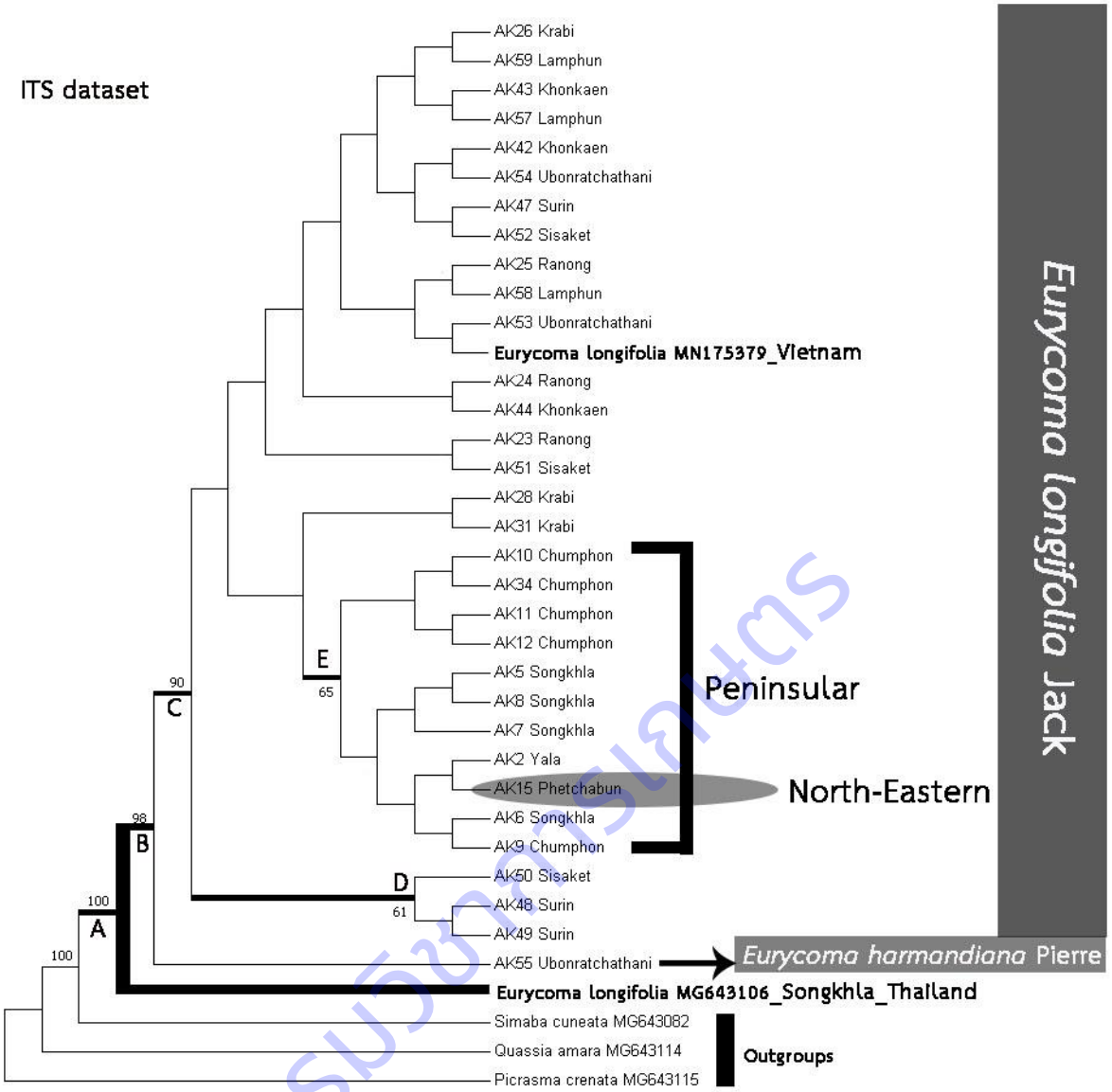
กรมวิชาการเกษ

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

ลิขสิทธิ์กรมวิทยาศาสตร์บริการ



ภาพที่ 8 UPGMA bootstrap consensus tree แสดงการการจัดกลุ่มของปลาไหลเผือกบริเวณ ITS: เส้นดำหนา แสดง clade ของ Ingroups และ clade ที่มีค่า bootstrap support มากกว่า 50%

กรมวิทยาศาสตร

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาความหลากหลายของปลาไหลเผือกในประเทศไทยจากตัวอย่างที่สำรวจรวมรวมมาได้จากการแบ่งเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณของประเทศไทย 5 เขต ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณคลอโรพลาสต์ *rbcL*, *rpoC* และบริเวณนิวเคลียร์ ITS ได้ข้อมูลดีเอ็นเอที่จะลงทะเบียนเก็บรักษาไว้บนระบบออนไลน์ของ National Center for Biotechnology Information เพื่อใช้ในการระบุยืนยันปลาไหลเผือกรวมทั้งสิ้น 82 ข้อมูล โดยพบว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *rbcL*และ *rpoC* ไม่มีตัวแทนที่สามารถใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ จึงใช้เฉพาะข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ ITS ในการวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือก โดยพบว่า สามารถแยกกลุ่มปลาไหลเผือก และปลาไหลเผือกน้อย ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และ

สามารถแบ่งปลาไหลเผือกได้เป็น 2 กลุ่ม และควรมีการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาไหลเผือกที่กระจายพันธุ์ในเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณอีก 2 เขตที่เหลือเพิ่มเติม เพื่อความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นของงานวิจัย

10. **การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

1. ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสาร เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการแก่นักวิจัยและบุคคลทั่วไป
2. ใช้เป็นข้อมูลเพื่อช่วยตรวจสอบผลิตภัณฑ์สมุนไพรปลาไหลเผือกที่วางขายในท้องตลาด
3. ใช้เป็นข้อมูลเพื่อให้นักปรับปรุงพันธุ์ นำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

11. คำขอบคุณ

12. เอกสารอ้างอิง

วิจิตรา สถิตย์บุตร วิเชียร กีรตินิจกาล และสุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2559. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Eurycoma longifolia* Jack ในประเทศไทย จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 54. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 2-5 กุมภาพันธ์ 2559 หน้า 358-365.

Bashir, M.A., N.H. Mohd Izham, F. Mohd Salleh, M.S. Shamsir Omar and A. Wagiran. 2016. Assessing product adulteration in selected Malaysian herbal product using DNA barcoding. International Conference on Agricultural and Food Engineering, 23 – 25 August 2016, pp.98-104.

Bhat, R., and A. Karim. 2010. Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack): a review on its ethnobotany and pharmacological importance Fitoterapia. 81: 669-679.

Farouk, A.E., and A. Benafri. 2007. Antibacterial activity of *Farouk and Benafri* Jack. A Malaysian medicinal plant. Saudi medical journal, 28: 1422-1424.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

Husen R., A. Hawariah, L. Pihie and M. Nallappan. 2004. Screening for antihyperglycaemic activity in several local herbs of Malaysia. J. Ethnopharmacol. 95: 205-208.

กรมวิชาการเกษตร

Kavitha, N., Noordin, R., Chan, K.L., and S. Sasidharan. 2012. Invitro anti-Toxoplasma gondii activity of root extract/fractions of *Eurycoma longifolia* Jack. BMC Complement. Altern.Med. 12, 91.

Kumar, S.; G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874.

Kuo, P.C., A.G. Damu, K.H. Lee and T.S.Wu. 2004. Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Eurycoma longifolia*. Bioorg. Med. Chem. 12: 537-544.

Mohamed, A.N., J. Vejayan and M.M. Yusoff. 2015. Review on *Eurycoma longifolia* Pharmacological and Phytochemical Properties. J Appl Sci. 15: 831-844.

Nei, M. and S. Kumar. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Newmaster, S.G., M. Grguric, D. Shanmughanandhan, S. Ramalingam and S. Ragupathy. 2013. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. BMC Med. 11(222): 1-13.

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.

Rehman S.U., K. Choe and H.H. Yoo. 2016. Review on a Traditional Herbal Medicine, Eurycoma longifolia Jack (Tongkat Ali): Its Traditional Uses, Chemistry, Evidence-Based Pharmacology and Toxicology. Molecules. 21(3): 1-31.

Ridzuan, M.A.R.M., A. Sow, A.n. Rain, A.M. Ilham and I.Zakiah. 2007. *Eurycoma longifolia* extract-artemisinin combination: parasitemia suppression of *Plasmodium yoelii* infected mice. Trop. Biomed. 24(1): 111-118.

ลิขสิทธิ์กรมวิทยาศาสตร์

Shuid, A.N., E. El-arabi, N.M. Effendy, H.S.A. Razak, N. Muhammad, N. Mohamed and I.N. Soelaiman. 2012. *Eurycoma longifolia* upregulates osteoprotegerin gene expression in androgen-deficient ostroporosis rat model. BMC Complement Altern.Med. 2012.12:152.

Smitinand, T. 1958. The genus *Dipterocarpus* Gaertn.f. in Thailand. Thai Forest Bull. 4: 1-26.

Solomon M.C., N. Erasmus and R.R. Henkel. 2014. In vivo Effects of *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali) Extract on Reproductive Functions in the Rat. Andrologia. 46: 339-348.

Tee, T.T., Y.H. Cheah and L.P.A. Hawariah. 2007. F16, A Fraction from *Eurycoma longifolia* Jack Extract, Induces Apoptosis via Caspase-9-independent Manner in MCF-7 Cells. Anticancer Ses. 27: 3425-3430.

Thomson, J.D.; D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sentivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap panalties and weight metix choice. Nucleic Acids Res. 22(22): 4673-80.

Varghese, C.P., C. Ambrose, S.C. Jin, Y.J. Lim and T. Keisaban. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Eurycoma longifolia* Jack, a traditional medicinal plant in Malaysia. Int. J. Pharm. Sc.i Nanotech. 5(4) : 1875-1878.

Wei Lun Ng, Shiou Yih Lee & Swee Keong Yeap. 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.

Zanoli, P., M. Zavatti, C. Montanari and M. Baraldi. 2009. Influence of *Eurycoma longifolia* on the copulatory activity of sexually sluggish and impotent male rats. J. Ethnopharmacol. 126: 308-313.

13. ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร