



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพป่าไม้)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ชีวภาพป่าไม้

ชีววิทยาป่าไม้

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) โดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จีโนม
Assessment of Genetic Diversity and Genetic Structure of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre using DNA Data from Chloroplast Genome

นามผู้วิจัย นางสาวราตรี อยู่เย็น

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์สุธีร์ ดวงใจ, Dr.rer.nat.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์สุจิตรา จางตระกูล, Doctor of Forestry)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์อุไรวรรณ อรัญวาสี, Dr.rer.nat.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิจักขณ์ นิยม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสถิตี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) โดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จีโนม

Assessment of Genetic Diversity and Genetic Structure of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre using DNA Data from Chloroplast Genome

โดย

นางสาวราตรี อยู่เย็น

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรชีวภาพป่าไม้)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ราตรี อยู่อื่น 2556: การประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) โดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จีโนม ปรินญาวิทยา ศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพป่าไม้) สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพป่าไม้ ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์สุธีร์ ดวงใจ, Dr.rer.nat. 100 หน้า

พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) เป็นไม้ยืนต้นที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของไทย ซึ่งปัจจุบันถูกลักลอบตัดอย่างผิดกฎหมาย ทำให้มีโอกาสดำเนินการอนุรักษ์ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยุงโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จีโนม และทดสอบวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากส่วนของเปลือกไม้ เนื้อไม้ และใบของต้นพะยุง ผลการศึกษาพบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมคือ วิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) จากการตรวจสอบส่วนต่างๆของคลอโรพลาสต์จีโนมที่เป็น non-coding region จำนวน 8 ส่วน พบว่ามี 3 ส่วน ได้แก่ *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* ที่มีความผันแปร สามารถใช้ในการประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรม ส่วนของดีเอ็นเอที่ศึกษาทั้ง 3 ส่วน มีความยาวรวม 1,841 นิวคลีโอไทด์ ในจำนวนดังกล่าวมีตำแหน่งที่มีความผันแปร รวม 10 ตำแหน่ง โดยเป็น SNP 8 ตำแหน่ง และ INDEL 2 ตำแหน่ง ผลการศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยุงรวม 108 ตัวอย่าง จำนวน 10 ประชากรที่อยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของไทย รวมถึงประเทศลาว มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับต่ำโดยมีค่า haplotype diversity (h) และค่า nucleotide diversity (π) เท่ากับ 0.608 และ 0.00033 ตามลำดับ และพบรูปแบบดีเอ็นเอรวม 11 haplotype ซึ่งแต่ละ haplotype มีการปรากฏในสัดส่วนที่แตกต่างกัน จำนวน haplotype ที่พบในแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 1-4 haplotype โดย haplotype ที่พบมากที่สุดได้แก่ H1 ซึ่งพบใน 9 ประชากรจากทั้งหมด 10 ประชากร โดยคิดเป็นร้อยละ 61 ของตัวอย่างที่ศึกษา และมี 7 haplotype ที่พบเฉพาะประชากรใดประชากรหนึ่ง ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรไม้พะยุงที่ศึกษาในครั้งนี้ พบว่าไม่ปรากฏโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ชัดเจนหรือไม่แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆ ทั้งนี้เนื่องมาจากประชากรส่วนใหญ่มีการปรากฏของ haplotype H1 ยกเว้นแต่ประชากร อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จ.สระบุรี ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ AMOVA ที่แสดงความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากรมากกว่าความผันแปรระหว่างประชากร ส่วนการทดสอบสมมติฐานวิวัฒนาการของประชากร “Neutral theory” ด้วยค่าสถิติ Tajima's D และ Fu and Li's D* and F* พบว่าประชากรไม้พะยุงยังอยู่ภายใต้สมดุล แสดงว่าความผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรไม้พะยุงที่ศึกษาได้รับอิทธิพลจากสมดุลระหว่าง mutation และ genetic drift

การศึกษานี้สามารถนำข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมไปใช้ประกอบการพิจารณาคัดเลือกแหล่งพันธุกรรมเพื่อใช้ในการอนุรักษ์ภายนอกถิ่นกำเนิด (*ex situ*) ได้ รวมถึงสามารถนำข้อมูล haplotype ที่มีความจำเพาะต่อประชากรไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ประโยชน์ในการบ่งชี้แหล่งที่มาของไม้พะยุงภายนอก

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Ratree Yooyuen 2013: Assessment of Genetic Diversity and Genetic Structure of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre using DNA Data from Chloroplast Genome. Master of Science (Forest Biological Science), Major Field: Forest Biological Science, Department of Forest Biology. Thesis Advisor: Mr. Sutee Duangjai, Dr.rer.nat. 100 pages.

The Siamese rosewood (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) is an valuable important tree species. This species has been illegally logged since the last few decades which may become extinct. This study aimed to assess genetic diversity and genetic structure of *D. cochinchinensis* using sequencing data from chloroplast genome and test of effective DNA extraction methods from the bark, wood and leave of *D. cochinchinensis*. The results showed that the DNA extraction of Sharma *et al.* (2002) was the best successful method. Eight non-coding chloroplast DNA regions were screened for polymorphism three regions, *trnS-trnG*, *trnV-trnM* and *trnC-ycf6* revealed polymorphisms and were selected for the further genetic diversity and genetic structure studies in *D. cochinchinensis*. A total of 10 polymorphic sites, including 8 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 2 insertions/deletions (INDEL) were detected in the 1,841 bp from three non-coding chloroplast DNA sequences. Genetic diversity and genetic structure of 108 individuals of *D. cochinchinensis* collected from 10 populations in the Northeast and the Central part of Thailand as well as Laos were assessed. Genetic diversity was low as shown by haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) of 0.608 and 0.00033, respectively. There were eleven haplotypes, of which each haplotype was presented in different proportions, ranged from 1-4 haplotypes per population. The most common haplotype was H1, presented in 9 of 10 populations which was 61% of the total samples. Seven haplotypes were unique to populations. No genetic structure was found on the basis of haplotype distribution due to the common haplotype H1 in most populations, except the Khao Yai National Park population. This result was consistent with the AMOVA analysis showing genetic variation within populations greater than the variation between populations. Neutrality tests by Tajima's D and Fu and Li's D^* and F^* statistics, were under neutral equilibrium, indicating that genetic variation of *D. cochinchinensis* populations was influenced by the balance between mutation and genetic drift.

The genetic diversity results can be used to select genetic sources for *ex situ* conservation area of *D. cochinchinensis*. The unique haplotype may be used to identify the source of illegally logged wood in the future.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สุธีร์ ดวงใจ ประธานกรรมการที่ปรึกษา
อาจารย์ ดร.สุจิตรา จางตระกูล และอาจารย์ ดร.อุไรวรรณ อรัญวาสน์ กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่
กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการค้นคว้าวิจัย ตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์
จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณกลุ่มงานพันธกรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่า
ไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช ที่ให้การสนับสนุนและให้ความ
อนุเคราะห์เพื่อสถานที่เพื่อทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนวัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี ภายใน
ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ ขอขอบพระคุณ ดร.สุวรรณ ตั้งมิตรเจริญ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างในการทำวิจัย
ขอขอบพระคุณ ดร.ชฎาพร เสนาคูณ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการช่วยเก็บตัวอย่างเป็นอย่างดี
รวมถึงเจ้าหน้าที่จากอุทยานแห่งชาติภูแล่นคา จ.ชัยภูมิ อุทยานแห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์ และ
อุทยานแห่งชาติผาแต้ม จ.อุบลราชธานี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ชาคริต ณ ตะกั่วทุ่ง และอาจารย์ ดร.สุวิมล อุทัยรัมย์ ที่คอยช่วย
ค้นเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ให้คำปรึกษาและข้อแนะนำต่างๆ รวมถึงน้องๆในห้องปฏิบัติการ
ดีเอ็นเอ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช ที่คอยช่วยเหลือในการทำวิจัยและให้กำลังใจ
เสมอมา

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่
ที่ได้อบรมและให้กำลังใจข้าพเจ้ามาตลอดในทุกเรื่อง

ราตรี อยู่ยี่น
มีนาคม 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	79
สรุป	79
ข้อเสนอแนะ	80
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	81
ภาคผนวก	92
ภาคผนวก ก สารเคมี	93
ภาคผนวก ข ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละ haplotype ในแต่ละส่วนของ ของคลอโรพลาสต์จีโนมที่ใช้ศึกษาในไม้พะยูน	96
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	100

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลักษณะของคลอโรพลาสต์จีโนม ไมโทคอนเดรียจีโนมและนิวเคลียร์จีโนมของพืชมีดอก (flowering plant)	18
2 ส่วนของต้นพะยูนและรูปแบบการเก็บตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีสกัดดีเอ็นเอ	24
3 ส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมและนิวเคลียร์จีโนมที่ใช้คัดเลือกและ primer ที่ใช้ทดสอบความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสารละลายดีเอ็นเอของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ จากส่วนต่างๆของต้นพะยูน	29
4 รายละเอียดโปรแกรมการทำ PCR ที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้สกัดด้วยวิธีต่างๆจากส่วนต่างๆของต้นพะยูน	30
5 ประชากรของไม้พะยูนที่ใช้ศึกษา	32
6 ส่วน non-coding regions ของคลอโรพลาสต์จีโนมที่ใช้คัดเลือกและ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	35
7 รายละเอียดโปรแกรมการทำ PCR จากส่วน <i>trnS-trnG</i> <i>trnV-trnM</i> และ <i>trnC-ycf6</i>	36
8 รายละเอียดโปรแกรมการทำ PCR เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์	37
9 ปริมาณและคุณภาพสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีต่างๆของตัวอย่างจากส่วนต่างๆของต้นพะยูน	44
10 ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากส่วนต่างๆของคลอโรพลาสต์จีโนมที่ใช้ศึกษาในไม้พะยูน	55
11 Haplotype ของส่วน <i>trnS-trnG</i> ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรและการปรากฏในแต่ละประชากรของไม้พะยูน	57
12 Haplotype ของส่วน <i>trnV-trnM</i> ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรและการปรากฏในแต่ละประชากรของไม้พะยูน	58
13 Haplotype ของส่วน <i>trnC-ycf6</i> ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรและการปรากฏในแต่ละประชากรของไม้พะยูน	58
14 Haplotype ที่ได้จากการวิเคราะห์รวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน <i>trnS-trnG</i> <i>trnV-trnM</i> และ <i>trnC-ycf6</i> เข้าด้วยกัน ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรและการปรากฏในแต่ละประชากรของไม้พะยูน	59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
15 จำนวน haplotypes (nh) ค่า haplotype diversity (h) ค่า nucleotide diversity (π และ θ_w) และค่าที่ได้จากการทดสอบสมมติฐานของประชากร (Neutrality Tests) ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมจากส่วน <i>trnS-trnG trnV-trnM</i> และ <i>trnC-ycf6</i> ของไม้พะยูน	61
16 ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย AMOVA ของไม้พะยูน ที่รวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน <i>trnS-trnG trnV-trnM</i> และ <i>trnC-ycf6</i> เข้าด้วยกัน แบบรวมส่วน INDEL	70
17 ค่า F_{ST} ของไม้พะยูน เมื่อวิเคราะห์ด้วยการรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน <i>trnS-trnG trnV-trnM</i> และ <i>trnC-ycf6</i> เข้าด้วยกัน แบบรวมส่วน INDEL	70
18 ค่า F_{ST} เมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ประชากรของไม้พะยูนที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน <i>trnS-trnG trnV-trnM</i> และ <i>trnC-ycf6</i> ไว้ด้วยกัน แบบรวมส่วน INDEL	71
19 ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย AMOVA ของไม้พะยูน ที่รวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน <i>trnS-trnG trnV-trnM</i> และ <i>trnC-ycf6</i> เข้าด้วยกัน แบบไม่รวมส่วน INDEL	72
20 ค่า F_{ST} ของไม้พะยูน เมื่อวิเคราะห์ด้วยการรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน <i>trnS-trnG trnV-trnM</i> และ <i>trnC-ycf6</i> เข้าด้วยกัน แบบไม่รวมส่วน INDEL	72
21 ค่า F_{ST} เมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ประชากรของไม้พะยูนที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน <i>trnS-trnG trnV-trnM</i> และ <i>trnC-ycf6</i> ไว้ด้วยกัน แบบไม่รวมส่วน INDEL	74

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะสัณฐานของต้นพะยูนส่วน ใบและดอก (ก) ฝัก (ข) เปลือกและลำต้น (ค) และเนื้อไม้ (ง)	5
2 การเกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation 2 แบบ ได้แก่ SNP และ INDEL	10
3 โครงสร้างคลอโรพลาสต์จีโนมของพืชวงศ์ถั่ว <i>Vigna radiate</i>	16
4 สีของสารละลายดีเอ็นเอโดย 0 = สีใส 1 = สีเหลือง 2 = สีน้ำตาลอ่อน 3 = สีน้ำตาลเข้ม	28
5 ประชากรของไม้พะยูนที่ใช้ศึกษา	31
6 ปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอของตัวอย่างจากต้นพะยูนเมื่อสกัดด้วยวิธีต่างๆ วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) (ก) วิธีประยุกต์ของ Jobes <i>et al.</i> (1995) (ข) วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) (ค) วิธีของ Novaes <i>et al.</i> (2009) (ง) วิธีประยุกต์ของ Sharma <i>et al.</i> (2002) (จ) และวิธีตามแบบ Dneasy Plant minikit (Qiagen) (ฉ) โดยหมายเลขด้านบนแทนส่วนต่างๆของพะยูนที่ใช้ทดสอบเรียงตามตารางที่ 2	43
7 ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน <i>trnL</i> intron ของดีเอ็นเอจากต้นพะยูนในแต่ละตัวอย่างที่ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอแตกต่างกันดังนี้ วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) (ก) วิธีประยุกต์ของ Jobes <i>et al.</i> (1995) (ข) วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) (ค) วิธีของ Novaes <i>et al.</i> (2009) (ง) วิธีประยุกต์ของ Sharma <i>et al.</i> (2002) (จ) และวิธีตามแบบ Dneasy Plant minikit (Qiagen) (ฉ) โดยที่หมายเลขด้านบนแทนส่วนต่างๆของพะยูนที่ใช้ทดสอบเรียงตามตารางที่ 2	51
8 ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน <i>ITS</i> ของดีเอ็นเอจากต้นพะยูนในแต่ละตัวอย่างที่ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอแตกต่างกันดังนี้ วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) (ก) วิธีประยุกต์ของ Jobes <i>et al.</i> (1995) (ข) วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) (ค) วิธีของ Novaes <i>et al.</i> (2009) (ง) วิธีประยุกต์ของ Sharma <i>et al.</i> (2002) (จ) และวิธีตามแบบ Dneasy Plant minikit (Qiagen) (ฉ) โดยที่หมายเลขด้านบนแทนส่วนต่างๆของพะยูนที่ใช้ทดสอบเรียงตามตารางที่ 2	52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
9 ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน <i>trnC-ycf6</i> ของดีเอ็นเอจากต้นพะยูนในแต่ละตัวอย่างที่ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอแตกต่างกันดังนี้ วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) (ก) วิธีประยุกต์ของ Jobes <i>et al.</i> (1995) (ข) วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) (ค) วิธีของ Novaes <i>et al.</i> (2009) (ง) วิธีประยุกต์ของ Sharma <i>et al.</i> (2002) (จ) และวิธีตามแบบ Dneasy Plant minikit (Qiagen) (ฉ) โดยที่หมายเลขด้านบนแทนส่วนต่างๆของพะยูนที่ใช้ทดสอบ เรียงตามตารางที่ 2	53
10 ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน <i>trnT-trnL</i> ของดีเอ็นเอจากต้นพะยูนในแต่ละตัวอย่างที่ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอแตกต่างกันดังนี้ วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) (ก) วิธีประยุกต์ของ Jobes <i>et al.</i> (1995) (ข) วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) (ค) วิธีของ Novaes <i>et al.</i> (2009) (ง) วิธีประยุกต์ของ Sharma <i>et al.</i> (2002) (จ) และวิธีตามแบบ Dneasy Plant minikit (Qiagen) (ฉ) โดยที่หมายเลขด้านบนแทนส่วนต่างๆของพะยูนที่ใช้ทดสอบ เรียงตามตารางที่ 2	54
11 ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากส่วนต่างๆของคลอโรพลาสต์จีโนม ได้แก่ส่วน <i>trnS-trnG</i> ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ส่วน <i>trnV-trnM</i> ขนาดประมาณ 900 คู่เบส และส่วน <i>trnC-ycf6</i> ขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส จากตัวอย่างของไม้พะยูน	56
12 รูปแบบการกระจาย haplotype ของไม้พะยูนที่วิเคราะห์ด้วยส่วน <i>trnS-trnG</i> (ก) ส่วน <i>trnV-trnM</i> (ข) และส่วน <i>trnC-ycf6</i> (ค) ของคลอโรพลาสต์จีโนม	67
13 รูปแบบการกระจาย haplotype ของไม้พะยูนที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน <i>trnS-trnG trnV-trnM</i> และ <i>trnC-petN1R</i> ของคลอโรพลาสต์จีโนม เข้าด้วยกัน (ก) และ haplotype network (ข)	68

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	=	Adenine
C	=	Cytocine
G	=	Guanine
T	=	Thymine
M	=	Molar
Kb	=	Kilobase
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxynucleotide
ddNTPs	=	dideoxynucleotide
π	=	Pi (Nucleotide diversity)
θ_w	=	Theta (Nucleotide diversity)
F_{ST}	=	Fixation Index
RAPD	=	Random Amplified Polymorphism DNA
SSR	=	Simple Sequence Repeat
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
ISSR	=	Inter Simple Sequence Repeat
SNP	=	Single Nucleotide Polymorphism
INDEL	=	Insertion / Deletion

การประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) โดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จีโนม

Assessment of Genetic Diversity and Genetic Structure of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre using DNA Data from Chloroplast Genome

คำนำ

พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) เป็น ไม้ยืนต้นที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจในอันดับต้นๆของไทย มีแหล่งกำเนิดในประเทศกัมพูชา เวียดนาม ลาว และไทย สำหรับประเทศไทยมีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในป่าผสมผลัดใบและป่าดิบแล้งที่สูงจากระดับน้ำทะเล 50 ถึง 200 เมตร พบได้ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นส่วนใหญ่ รวมถึงภาคตะวันออกและภาคกลางของประเทศ (Niyomdham, 2002) พะยุงจัดได้ว่าเป็น ไม้มุงคลขึ้นสูงของไทย และด้วยคุณสมบัติที่ดีของไม้พะยุงในหลายๆด้าน เช่น เนื้อไม้ที่มีสีน้ำตาลแดงงาม ชักเงาดี และมีความคงทนแข็งแรง จึงถูกนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในลักษณะของไม้แปรรูปในการก่อสร้างและทำเฟอร์นิเจอร์ เครื่องดนตรี เครื่องมือต่างๆ ปัจจุบัน ไม้พะยุงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศเป็นอย่างมากจึงมีราคาค่อนข้างสูงและถือได้ว่าเป็นไม้ที่มีราคาแพงที่สุดในโลก ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ไม้พะยุงถูกลักลอบตัดจากป่าธรรมชาติเป็นจำนวนมาก โดยส่งผลให้ไม้พะยุงลดปริมาณลงอย่างรวดเร็ว และอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และโครงสร้างทางพันธุกรรม (genetic structure) ซึ่งมีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เป็นอย่างยิ่ง

ในการอนุรักษ์ไม้พะยุงควรมีมาตรการในการป้องกันการลักลอบตัดไม้พะยุงเป็นลำดับแรก และต่อมาควรมีการวางแผนจัดการเพื่ออนุรักษ์ไม้พะยุงได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม ซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ประชากรสามารถนำไปเป็นแนวทางในการอนุรักษ์ได้ โดยในการศึกษาดังกล่าวจำเป็นต้องทราบถึงระดับความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างทางพันธุกรรม การศึกษครั้งนี้จึงได้ประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยุงโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์จีโนม

และเนื่องด้วยปัญหาการขิดไม้พะยุงที่เป็นของกลางนั้นไม้ทราบแหล่งที่มาที่แน่ชัดซึ่งยากต่อการตรวจสอบ การศึกษานี้จึงได้พัฒนาเครื่องมือในระดับโมเลกุลเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น

และเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ต่อการบ่งชี้แหล่งกำเนิดหรือแหล่งที่มาของไม้พะยุงในอนาคต และด้วยลักษณะไม้ของกลางนั้นมักอยู่ในรูปไม้ท่อนและไม้แปรรูป ซึ่งการตรวจสอบแหล่งที่มา หรือการพิสูจน์หลักฐานต่างๆในระดับโมเลกุลจำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอจากส่วนของเปลือกไม้และเนื้อไม้ จึงได้ทดสอบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากส่วนของเปลือกและเนื้อไม้พะยุงที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ ประโยชน์ดังกล่าวในอนาคต



วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากส่วนของเปลือกไม้ชั้นใน เนื้อไม้ส่วนกระพี้ และใบของต้นพะยูน
2. เพื่อประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยูนโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอจากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนม
3. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในด้านการบ่งชี้แหล่งกำเนิดหรือแหล่งที่มาของไม้พะยูนในอนาคต

การตรวจเอกสาร

ลักษณะโดยทั่วไปของไม้พะยูน

พะยูน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dalbergia cochinchinensis* Pierre จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) อนุวงศ์ Papilionoideae มีวิสัยเป็นไม้ยืนต้น (tree) พะยูน เป็นชื่อพื้นเมืองอย่างเป็นทางการ และมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปตามท้องถิ่นต่างๆ เช่น กระยง กระยง (เขมร-สุรินทร์) ขะยง (อุบลราชธานี) แดงจีน (ปราจีนบุรี) ประดู่ตม ประดู่หน้า (จันทบุรี) ประดู่ลาย (ชลบุรี) ประดู่เสน (ตราด) พะยูนไหม (สระบุรี) หัวลิเมาะ (จีน) (Niyomdham, 2002)

พะยูนมีแหล่งกำเนิดในประเทศเวียดนาม ลาว กัมพูชา และไทย สำหรับในประเทศไทย พบได้ทางภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศ มีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในป่าผสมผลัดใบและป่าดิบแล้งที่สูงจากระดับน้ำทะเล 50-200 เมตร (Niyomdham, 2002) สำหรับทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือส่วนใหญ่พบได้แถบเทือกเขาภูพาน และเทือกเขาพนมดงรัก ตั้งแต่จังหวัดนครพนม สกลนคร กาฬสินธุ์ มุกดาหาร อุบลราชธานี ศรีสะเกษ สุรินทร์ และบุรีรัมย์ โดยส่วนใหญ่อยู่ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตามแนวชายแดน ไทย-ลาว และไทย-กัมพูชา (สำนักงานความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ กรมป่าไม้, 2555)

พะยูนเป็นไม้ผลัดใบที่มีขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่ มีความสูงถึง 25 เมตร เรือนยอดมีพุ่มใบกว้าง มีใบเป็นใบประกอบแบบขนนกชั้นเดียวปลายคี่ที่มีใบย่อยจำนวน 7-9 ใบ ใบย่อยเรียงสลับเป็นรูปไข่กว้าง (ovate) ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม ดอกออกเป็นช่อแบบแยกแขนง เกิดตามซอกใบหรือปลายกิ่ง ดอกมีขนาดเล็กสีขาว แสดงดังภาพที่ 1 (ก) ออกดอกช่วงเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม ผลแห้งเป็นรูปฝักขอบขนานมีจำนวน 1-4 เมล็ด แสดงดังภาพที่ 1 (ข) เมล็ดแบนสีน้ำตาลแดง ฝักแก่ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน เปลือกเรียบสีเทา ลอกเป็นแผ่นบาง แสดงดังภาพที่ 1 (ค) ส่วนระบบรากเป็นระบบรากแขนง รากแก้วเป็นรากแกนหลักที่มีรากแขนงแตกย่อยออกไปเป็นไม้ที่มีระบบรากค่อนข้างลึก รากฝอยมีปมรากแบบถั่วช่วยในการตรึงก๊าซไนโตรเจน (ชัยสิทธิ์ และคณะ, 2536) ลักษณะเนื้อไม้ กระพี้ (sapwood) ส่วนใหญ่มีสีขาว มีความกว้าง 40-50 มิลลิเมตร ส่วนแก่น (heartwood) มีสีม่วงอ่อน (light rose purple) ไปจนถึงสีม่วงแดง (burgundy) โดยมีริ้วลายสีน้ำตาลดำหรือสีดำ แสดงดังภาพที่ 1 (ง) เป็นไม้ที่ทนทานและแข็งแรง คุณสมบัติเหล่านี้ทำให้เป็นที่สนใจและมีความต้องการในปริมาณที่สูง โดยเป็นที่รู้จักกันในชื่อของ Thailand rosewood หรือ Siamese Rosewood (Keating and Bolza, 1982)



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานของต้นพะยูงส่วน ใบและดอก (ก) ฝัก (ข) เปลือกและลำต้น (ค) และเนื้อไม้ (ง)

ที่มา : ภาพ (ง) (สยามรัฐ, 2555)

ปัญหาการลักลอบตัดไม้พะยูงในปัจจุบัน

พะยูง เป็นไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจในอันดับต้นๆของไทย ด้วยคุณสมบัติของเนื้อไม้ในหลายๆด้านทั้งลวดลายงดงาม ชักเงาได้ดี มีความคงทนแข็งแรง และยังถือได้ว่าเป็นไม้มงคลชั้นสูงที่มีความเชื่อว่า หากผู้ใดมีไว้ครอบครองจะเกิดความเป็นสิริมงคล จึงทำให้เป็นที่ต้องการทั้งในและต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศจีน ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นความนิยมไม้พะยูง โดยประเทศจีนนำเข้าไม้

พะยุงไปซ่อมแซมตกแต่งพระราชวังระหว่างที่เป็นเจ้าภาพการแข่งขันกีฬาโอลิมปิกปี 2551 นับแต่นั้นมาราคาไม้พะยุงจึงสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งปัจจุบันถือได้ว่าไม้พะยุงเป็นไม้ที่มีราคาแพงที่สุดในโลก และด้วยปริมาณความต้องการของไม้พะยุงมีมากกว่าจำนวนต้นพะยุงที่มีอยู่ จึงเป็นสาเหตุให้มีการลักลอบตัดไม้พะยุงในอัตราสูง (เพลิน, 2555)

จากข้อมูลการสุรพรายงานสถิติคดีเกี่ยวกับป่าไม้ ของหน่วยงานในสังกัดกรมกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ที่พบการกระทำผิดเกี่ยวกับไม้พะยุง ปีงบประมาณ 2555 (ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2554-30 กันยายน 2555) พบว่ามีจำนวนคดีทั้งสิ้น 1,185 คดี ผู้ต้องหา 750 ราย ยึดไม้ของกลางได้ 10,825 ท่อน/แผ่น คิดเป็นปริมาตรรวม 880.85 ลูกบาศก์เมตร มูลค่ารวม 132,127,335 บาท ซึ่งมูลค่าไม้พะยุงประเมินราคาโดยเฉลี่ย 150,000 บาทต่อลูกบาศก์เมตร โดยพื้นที่อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย จังหวัดอุบลราชธานี มีจำนวนคดีมากที่สุด 142 คดี รองลงมาคืออุทยานแห่งชาติภูผายล จังหวัดสกลนคร 133 คดี ส่วนอุทยานแห่งชาติภูพานมีมูลค่ารวมมากที่สุดถึง 21,830,000 บาท (สำนักป้องกันปราบปราม และควบคุมไฟป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2555)

สหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ (International Union of conservation or Nature and Natural Resources: IUCN) ได้จัดสถานะให้ไม้พะยุงอยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (Vulnerable) (IUCN, 2009) ส่วนในประเทศไทย กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ได้มีการผลักดันการขึ้นทะเบียนไม้พะยุงไว้ในบัญชีอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: CITES) เพื่อป้องกันไม่ให้มีการเคลื่อนย้ายและการค้าระหว่างประเทศ โดยจะพยายามผลักดันเข้าสู่บัญชี หมายเลข 1 ถือเป็นชนิดพันธุ์ของสัตว์ป่าและพืชป่า ที่ห้ามค้าโดยเด็ดขาด เนื่องจากใกล้สูญพันธุ์ ยกเว้นเพื่อการศึกษาวิจัย หรือเพาะพันธุ์ ซึ่งเรื่องนี้จะมีการเสนอในการประชุมไซเตสครั้งที่ 16 ที่ประเทศไทยจะเป็นเจ้าภาพในปี 2556 (นนทวรรณ, 2555)

สถานการณ์ดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นถึงปัญหาของไม้พะยุงในประเทศไทยอยู่ในสถานะล่อแหลมต่อการสูญเสียมูลค่าทางพันธุกรรม เนื่องมาจากการลดจำนวนลงของไม้พะยุงในธรรมชาติ ซึ่งต้นที่มีพันธุกรรมที่ดีอาจสูญไปจากการบุกรุกตัดไม้ นอกจากนี้ข้อจำกัดของไม้ชนิดนี้คือเป็นไม้ที่โตช้า และไม่มีข้อมูลแน่ชัดเกี่ยวกับช่วงอายุการตัดฟันและอัตราผลผลิต ไม้พะยุงจึงไม่ได้รับความสนใจในการปลูกสร้างสวนป่าอย่างจริงจัง (ชัยสิทธิ์และคณะ, 2536)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) และโครงสร้างทางพันธุกรรม (Genetic structure)

ปัจจุบันทรัพยากรป่าไม้ของประเทศไทยถูกทำลายและลดลงอย่างต่อเนื่อง ขณะนี้พื้นที่ป่าเหลืออยู่เพียง 30.92 เปอร์เซ็นต์ (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2550) จึงได้มีการตระหนักถึงความสำคัญของทรัพยากรธรรมชาติและการอนุรักษ์ทรัพยากรป่าไม้ ทำให้มีการศึกษาระบบนิเวศด้านป่าไม้เพิ่มมากขึ้น แต่ถึงอย่างไรก็ตามการศึกษาด้านพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ป่าในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาวิจัยในสาขาอื่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ป่าในแต่ละชนิดถือว่าเป็นองค์ประกอบที่สำคัญซึ่งเป็นพื้นฐานที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการและการมีโอกาสรอดและปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ป่าจึงถือได้ว่าเป็นหัวใจหลักในการพัฒนากลยุทธ์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์ทรัพยากรทางชีวภาพด้านป่าไม้ให้มีประสิทธิภาพ (สุจิตรา, 2551)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นความแปรผันของยีนหรือหน่วยทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆภายใต้ประชากรที่ศึกษาทั้งในระดับชนิด (species variation) และระดับประชากร (population variation) ที่ระดับประชากรแบ่งได้เป็นภายในประชากร (intra-population variation) และระหว่างประชากร (inter-population variation) โดยประชากรแต่ละชั่วรุ่นของการสืบพันธุ์จะมีลักษณะที่แปรผันไปจากเดิมไม่มากนักน้อย ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมใช้บอกถึงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ โดยเกี่ยวข้องกับความสามารถในการอยู่รอดหรือการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต (Hedrick, 2011; Frankham *et al.*, 2004) ความหลากหลายทางพันธุกรรมถือเป็นพื้นฐานทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม และเป็นข้อมูลจำเป็นในด้านพันธุศาสตร์เพื่อการอนุรักษ์ (Hanski and Gilpin, 1997)

โดยปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น ขนาดประชากร (population size) การกลายพันธุ์ (mutation) การเคลื่อนย้ายยีน (gene flow) การคัดเลือกทางธรรมชาติ (natural selection) ระบบสืบพันธุ์ (reproductive system) (Lowe *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังรวมถึงปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรด้วย เช่น genetic drift การคัดเลือกในสภาวะกดดัน (selective pressure) และการปรับตัวเพื่ออยู่ในถิ่นอาศัย (adaptations to habitats) สำหรับระบบสืบพันธุ์ของพืชถือได้ว่ามีความสำคัญต่อโครงสร้างของประชากร กล่าวคือพืชที่มีการผสมตัวเอง (self-pollination) จะเกิด gene flow ระหว่างประชากรได้น้อย ทำให้มีความหลากหลายทาง

พันธุกรรมต่ำ ในขณะที่การผสมข้าม (outcrossing) จะเกิด gene flow ได้มากกว่า ทำให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างประชากรน้อยลง จึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่า (Glémin *et al.*, 2006; Pleines *et al.*, 2009)

ประชากรที่มีขนาดใหญ่เมื่อมีการผสมพันธุ์แบบสุ่ม จะทำให้ความถี่ของยีน และจีโนไทป์ในชั่วลูกคงที่ตลอดไป ประชากรที่มีความถี่ของยีน และจีโนไทป์คงที่ เรียกว่า ประชากรสมดุล (equilibrium population) และคุณสมบัติของประชากรที่อยู่ในสภาพสมดุลตามกฎฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) ได้แก่ ประชากรมีขนาดใหญ่ จับคู่ผสมกันโดยสุ่ม ไม่มีการอพยพ (migration) ไม่มีการกลายพันธุ์ (mutation) ไม่มีการคัดเลือก (selection) เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะที่ศึกษามีตำแหน่งอยู่บนออโตโซม การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเป็นไปอย่างปกติ (ประดิษฐ์, 2550)

พันธุศาสตร์ประชากร เป็นการศึกษาความผันแปร (Genetic variation) หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรต่างๆของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ โดยศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมหรือโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร (วิสุทธ์, 2536; สุรินทร์, 2552)

การประเมินความหลากหลายทางและโครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

การศึกษาวิจัยพันธุศาสตร์ด้านป่าไม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) สามารถนำไปใช้ประโยชน์หลายอย่างด้วยกัน เช่น สามารถประเมินระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อนำไปประกอบการวางแผนในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช เข้าใจระบบการสืบพันธุ์เพื่อตรวจสอบคู่อัตราการผสมตัวเอง เพื่อใช้ในการพิจารณาว่าควรเก็บเมล็ดจากต้นใดหรือประชากรใดอย่างไรเพื่อใช้ในการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ สามารถใช้ตรวจสอบแหล่งกำเนิดชนิดและสายพันธุ์ และใช้เป็นเครื่องหมายที่ช่วยในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการซึ่งเป็นลักษณะที่ดีของพันธุ์ไม้ที่มีค่าทางเศรษฐกิจเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม (สุจิตรา, 2551)

เครื่องหมายทางโมเลกุล แบ่งได้เป็น 2 ระดับ ได้แก่ ระดับโปรตีนซึ่งเป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีน และระดับดีเอ็นเอซึ่งเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งหนึ่งๆบน โครโมโซม (nuclear DNA) และดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ ซึ่งได้แก่ ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) และคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความผันแปร (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเรียกว่าเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545)

เครื่องหมายดีเอ็นเอแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้หลักการ hybridization และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้หลักการในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) (สุรินทร์, 2545) ตัวอย่างของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อาศัยหลักการ hybridization ได้แก่ เครื่องหมาย RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) และตัวอย่างของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อาศัยหลักการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR หรือวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ได้แก่ เครื่องหมาย RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) เครื่องหมาย SSR (Simple Sequence Repeat) เครื่องหมาย AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) และเครื่องหมาย SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) (สุรินทร์, 2552)

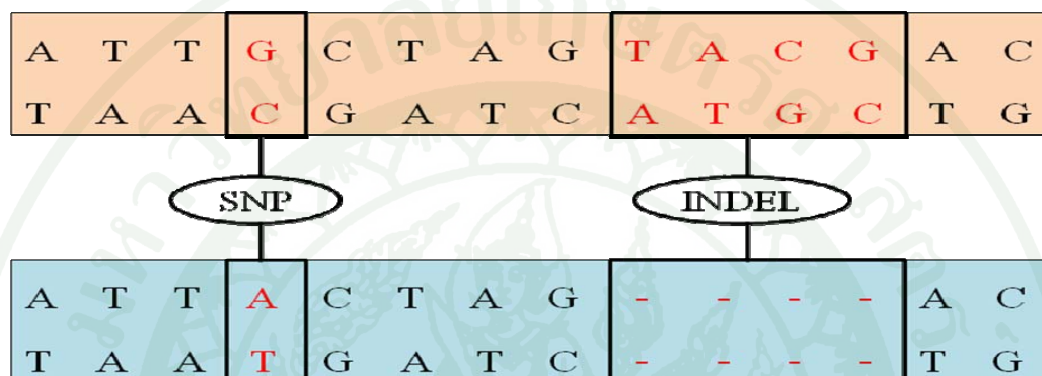
ค่าต่างๆที่ใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากรที่เกี่ยวข้อง เช่น Mean observed heterozygosity (H_o) Percentage of polymorphic loci (P) allelic diversity หรือ allelic richness (A) Nei's gene diversity (H_T) และ Shannon's Index (H) (Lowe *et al.*, 2004)

สำหรับค่าทางสถิติที่ใช้อธิบายโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรของสิ่งมีชีวิตที่สำคัญได้แก่ F_{ST} ซึ่งใช้บอกถึงระดับ gene flow ที่เกิดขึ้นของประชากรของสิ่งมีชีวิต และประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากร (genetic differentiation) โดยวัดจากความแตกต่างของแต่ละประชากรย่อยเปรียบเทียบกับประชากรรวมทั้งหมด (Hedrick, 2011)

ลักษณะความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การตรวจสอบความผันแปรด้วยการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ถือเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่งที่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้

การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นการกลายพันธุ์แบบ point mutation เกิดได้ 2 รูปแบบคือ การเปลี่ยนแปลงการแทนที่เบส (base substitution) และการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนน้อยๆ (insertion/deletion : INDEL) สำหรับการกลายพันธุ์แบบแทนที่เบสที่มีการแทนที่เพียง 1 เบสที่ตำแหน่งหนึ่ง เรียกว่า SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) (สุรินทร์, 2552) แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การเกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation 2 แบบ ได้แก่ SNP และ INDEL

การเปลี่ยนแปลงโดยการแทนที่เบสสามารถเกิดได้ 2 แบบคือ แบบ transition และแบบ transversion แบบ transition เป็นการแทนที่เบส purine ด้วยเบส purine (เช่นแทนที่เบส A ด้วยเบส G) หรือแทนที่เบส pyrimidine ด้วยเบส pyrimidine (เช่นแทนที่ C ด้วย T) และแบบ transversion เป็นการแทนที่เบส purine ด้วยเบส pyrimidine (เช่นแทนที่เบส A ด้วยเบส C) หรือแทนที่เบส pyrimidine ด้วยเบส purine (เช่นแทนที่เบส T ด้วยเบส G) (สมพร, 2547)

ขั้นตอนหนึ่งในการตรวจสอบความผันแปรด้วยการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์คือการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งวิธีหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยหลักการแล้วจะใช้ electrophoresis ในการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ ทว่าไม่มีวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์สองวิธี คือ วิธี Chemical degradation method และวิธี Chain termination method หรือ Enzymatic synthesis method ซึ่งสองวิธีนี้ถือเป็นหลักการพื้นฐานในการพัฒนาเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน (Surzycki, 2000) วิธี Chemical degradation method ถูกค้นพบโดย Maxam and Gilbert (1977) เป็นวิธีที่ใช้สารเคมีที่มีความจำเพาะในการตัดสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เบสชนิดต่างๆ กัน โดยที่ปลายข้างหนึ่งของดีเอ็นเอจะถูกติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ^{32}P ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งจะเป็นนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งต่างๆ ซึ่งถูกตัดด้วยสารเคมีที่มี

ความจำเพาะกับชนิดเบสของแต่ละนิวคลีโอไทด์ โดยปฏิกิริยาการตัดสายโพลีนิวคลีโอไทด์นี้จะดำเนินการภายใต้ระยะเวลาที่ทำให้เกิดการตัดที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้ได้ชิ้นโพลีนิวคลีโอไทด์ขนาดต่างๆ ไล่เรียงกัน โดยมีโอกาสที่จะพบชิ้นโพลีนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดแตกต่างกันเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ในทุกๆ ตำแหน่งของสายโพลีนิวคลีโอไทด์นั้น ผลที่ได้จากปฏิกิริยาการตัดนี้สามารถนำมาวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธี electrophoresis ทำให้ทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของสายดีเอ็นเอที่ศึกษาได้ ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือ Chain termination method คิดค้นโดย Sanger *et al.* (1977) หลักการของวิธีนี้ภายใต้ปฏิกิริยา PCR โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจะสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากการใช้ primer ที่เข้าจับกับบริเวณเฉพาะของสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทำให้เกิดการเข้าร่วมของนิวคลีโอไทด์สองประเภทคือแบบปกติ (3' deoxynucleotide, dNTPs) และแบบ analog (2' 3' dideoxynucleotide, ddNTPs) จากการใช้ ddNTPs จะทำให้เกิดการสิ้นสุดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์สายโพลีนิวคลีโอไทด์สายใหม่ตรงตำแหน่งเบสที่มี ddNTPs ไปต่อตรงตำแหน่งคู่สมจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยจะเกิดขึ้นร่วมกับการเกิดปฏิกิริยาโดยปกติซึ่งเป็นการเข้ามาต่อของ dNTPs ผลของปฏิกิริยาที่ได้ทำให้เกิดการสังเคราะห์สายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดแตกต่างกันต่อเนื่อง โดยมีโอกาสพบความแตกต่างในทุกๆ หนึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาไปอย่างมาก มีเทคนิคใหม่ๆ เกิดขึ้นที่ทำให้สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เร็วขึ้นและได้ปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มากขึ้น ซึ่งเรียกเทคโนโลยีนี้ว่าเป็น next-generation sequencing เทคนิคเหล่านี้ได้มีการพัฒนาโดยบริษัทเอกชนที่ทำการค้า เช่น Illumina GA IIx (Solexa) Roche GS-FLX (Pyrosequencing by 454) และ Applied Biosystems ABI SOLiD (ซิน, 2553)

ตัวอย่างการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี pyrosequencing มีขั้นตอนโดยการนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมาใช้เป็นต้นแบบสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สมที่ได้ออกแบบ primer ไว้แล้ว โดยมีหลักการในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจาก primer โดยใส่ dNTP ครั้งละหนึ่งชนิด ถ้านิวคลีโอไทด์ที่ใส่ลงไปไม่เข้าเบสคู่สมจะไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ ทำให้ไม่สามารถนำไปสังเคราะห์ได้จึงไม่มีผลเกิดขึ้น แต่ถ้านิวคลีโอไทด์ที่ใส่ลงไปเป็นเบสคู่สมกับ ดีเอ็นเอต้นแบบจะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจาก primer และได้ผลที่เหลือคือ pyrophosphate (PPi) ซึ่งจะถูกนำไปสังเคราะห์เป็น ATP โดยเอนไซม์ sulfuryase และ ATP ที่เกิดขึ้นจะนำไปใช้โดยเอนไซม์ luciferase ทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้น ทั้ง dNTP และ PPi ที่เหลือจะถูกทำลายโดยเอนไซม์ apyrase การทำ pyrosequencing ต้องใช้เครื่องอัตโนมัติ แต่ละรอบใส่ dNTP เพียงหนึ่งชนิด ถ้าครบรอบไม่มีปฏิกิริยาใดๆ แสดงว่านิวคลีโอไทด์ที่ใส่ลงไปไม่ตรงกับเบสคู่สม

เปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ชนิดใหม่ในรอบต่อไป ถ้าเป็นชนิดที่ตรงกับที่ต้องการจะเกิดการเรืองแสงขึ้น โดยถ้ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันอยู่ติดกัน จะมีสัญญาณการเรืองแสงเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ซึ่งจะตรวจสอบได้จากความสูงของ peak ที่เพิ่มขึ้น วิธีนี้จึงสามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวได้ (สุรินทร์, 2552)

ค่าต่างๆที่ใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มีดังต่อไปนี้

- Number of haplotypes คือ จำนวนรูปแบบดีเอ็นเอหรือ haplotype ที่พบทั้งหมด
- Haplotype diversity: h (Nei, 1987) คือ ค่า haplotype ของตัวอย่างใดๆที่มีความแตกต่างกันในกลุ่มประชากร คำนวณได้จากสูตร

$$h = \left(\frac{n}{n-1} \right) \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

เมื่อ n คือ จำนวนตัวอย่าง

k คือ จำนวน haplotype

p_i คือ ความถี่ของแต่ละ haplotype

- Nucleotide diversity: π (Nei, 1987) เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละคู่ตัวอย่าง คำนวณได้จากสูตร

$$\pi = \left(\frac{1}{m} \right) (\pi^{\wedge})$$

เมื่อ m คือ $[n(n-1)/2]$ n แทนจำนวนตัวอย่าง

$\pi^{\wedge}$ คือ ผลรวมของจำนวนที่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละคู่ตัวอย่างต่อความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด

- Nucleotide diversity: θ_w (Watterson, 1975) เป็นค่าความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ที่ขึ้นกับจำนวนตำแหน่งที่มี polymorphic ในตัวอย่างทั้งหมด คำนวณได้จากสูตร

$$\theta_w = \left(\frac{S_n}{a_n} \right)$$

เมื่อ S_n คือ สัดส่วนของจำนวนตำแหน่งที่มี polymorphic ต่อจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด

$$a_n \text{ คือ } 1+1/2+1/3+\dots+1/(n-1)$$

n คือ จำนวนตัวอย่าง

ทฤษฎีความสมดุลทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล (Neutral theory)

ทฤษฎีความสมดุลทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล “Neutral theory” ได้ถูกเสนอไว้เมื่อปลายปี 1968 โดยนาย Motoo Kimura เป็นทฤษฎีที่กล่าวถึง รูปแบบโดยทั่วไปของความผันแปรในระดับโมเลกุลที่อธิบายได้จากการกระทำร่วมกันระหว่าง mutation และ genetic drift (Kimura, 1983) ซึ่งการทดสอบสมมติฐานของทฤษฎีนี้ถือเป็นข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ประชากร

genetic drift เป็นการเปลี่ยนแปลงความถี่ของอัลลีลหรือความผันแปรในประชากรของสิ่งมีชีวิต เนื่องมาจากประชากรขนาดเล็กที่มีการผสมแบบสุ่ม ทำให้ประชากรในรุ่นถัดไปไม่คงที่เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่ของอัลลีล โดยมักส่งผลให้เกิดการ fix หรือหายไปของอัลลีล และมีโอกาสเกิดการลดลงของ heterozygote ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง ส่วนการเกิด mutation โดยส่วนใหญ่จะมีโอกาสทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงขึ้น เนื่องจากมักเพิ่ม heterozygote ดังนั้นเมื่อเหตุการณ์เป็นปกติหรือมีสมดุลทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต การเกิด mutation และ genetic drift จะมีอัตราที่สมดุลกัน (Kimura, 1983)

Tajima's D (Tajima, 1989) เป็นค่าทางสถิติที่ใช้การทดสอบสมมติฐานเพื่ออธิบายทฤษฎี “Neutral theory” โดยวิเคราะห์ได้จากข้อมูลที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งใช้ข้อมูลความผันแปรภายในสปีชีส์ เป็นการทดสอบความถี่ของจำนวนตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปร (segregating site) และคำนวณด้วยค่าพารามิเตอร์ของ nucleotide diversity สองค่าได้แก่ π (Nei, 1987) และ θ_w (Watterson, 1975)

โดยถ้าประชากรอยู่ภายใต้สมดุล ; $\pi \approx \theta_w$

; $D \sim \pi - \theta_w$

หรืออาจกล่าวได้ว่า Tajima's D ควรมีค่าประมาณ 0 ประชากรจึงจะอยู่ภายใต้ทฤษฎี Neutral theory ถ้า D น้อยกว่า 0 แสดงว่าความผันแปรที่มีความถี่สูงๆ มากกว่าความผันแปรที่มีความถี่ต่ำๆ (high frequency variants > low frequency variants) โดยมีผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร (population expansion) และถ้า D มากกว่า 0 แสดงว่าความผันแปรที่มีความถี่ต่ำๆ มากกว่าความผันแปรที่มีความถี่สูงๆ (low frequency variants > high frequency variants) โดยมีผลทำให้เกิดการลดลงของประชากรอย่างรวดเร็ว (population bottleneck)

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์เพื่ออธิบายถึงทฤษฎี “Neutral theory” ยังมี statistical tests อื่นๆ เช่น McDonald-Kreitman (MK) Hudson-Kreitman-Aguade (HKA) และ Ewen-Waterson Test (Hedrick, 2011)

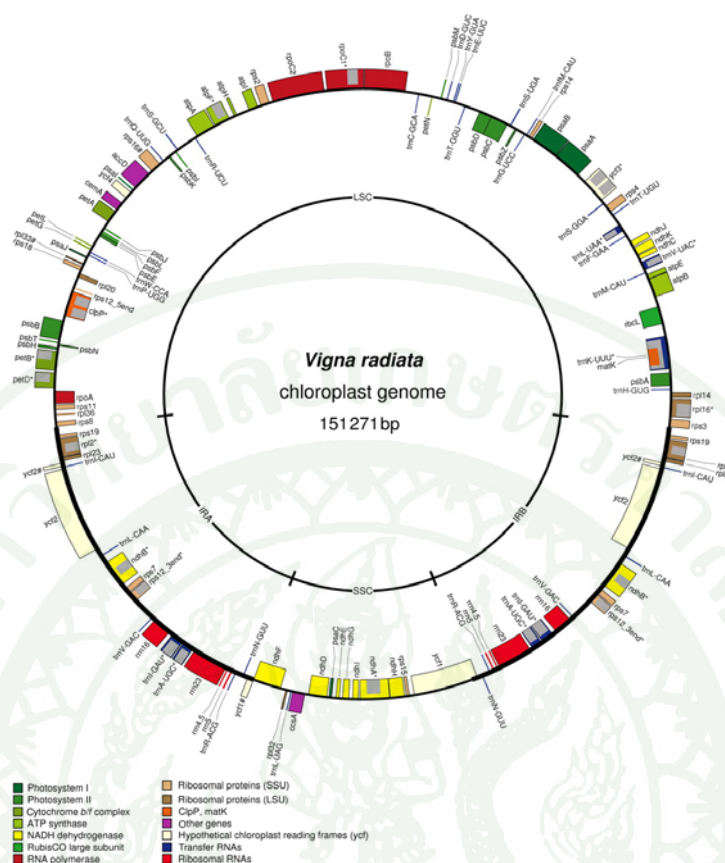
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของไม้พะยูนและไม้อื่นๆ ในสกุลพะยูน

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูนที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ได้แก่ การพัฒนาเครื่องหมาย microsatellite ในไม้พะยูนโดย สุจิตราและคณะ (2552) การศึกษาของ Soonhuae *et al.* (1994) โดยประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและระบบสืบพันธุ์ของไม้พะยูนในประเทศไทยด้วยการวิเคราะห์ Isozyme 18 ตำแหน่งจาก 12 enzyme นอกจากนี้ Hien and Phong (2012) ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูนในประเทศเวียดนามโดยใช้เครื่องหมาย RAPD และ ISSR ส่วนงานวิจัยด้านการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ในสกุลพะยูนที่มีรายงานอื่นๆ ได้แก่ Andrianoelina *et al.* (2006) ได้ใช้เครื่องหมาย RAPD และเครื่องหมาย SSR จากส่วนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้น *D. monticola* ซึ่งเป็นไม้ยืนต้นที่จัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในมาดากัสการ์ รวมถึง Rout *et al.* (2003) ได้ใช้เครื่องหมาย RAPD ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของพันธุ์ไม้ต่างๆ ในสกุลพะยูนจากประเทศอินเดีย นอกจากนี้ Juchum *et al.* (2007) ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากร Rosewood (*D. nigra*) ในป่าธรรมชาติของประเทศบราซิลโดยใช้เครื่องหมาย RAPD เช่นเดียวกัน

คลอโรพลาสต์จีโนม (Chloroplast genome) และการถ่ายทอดสารพันธุกรรมในคลอโรพลาสต์ (Inheritance of chloroplast DNA)

โดยทั่วไปในเซลล์ของยูคาริโอต (eukaryote) สามารถพบดีเอ็นเอได้ทั้งในนิวเคลียส (nucleus) และในออร์แกเนลล์ 2 ชนิด ได้แก่ ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และพลาสติด (plastid) จีโนม (genome) ดีเอ็นเอจึงมีอยู่ 3 แหล่ง คือ จีโนมในนิวเคลียส (nuclear genome) จีโนมในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial genome) ซึ่งพบทั้งในเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ และจีโนมในพลาสติดหรือในคลอโรพลาสต์ (chloroplast genome) ซึ่งพบเฉพาะในเซลล์พืช คลอโรพลาสต์จีโนมมีลักษณะโมเลกุลเป็นวงแหวนเกลียวคู่ (double stranded circular DNA) มีขนาดประมาณ 120- 220 กิโลเบส จำนวนคลอโรพลาสต์ในแต่ละเซลล์มีได้มากถึง 40 อัน แต่ละอันมีดีเอ็นเอประมาณ 20-40 โมเลกุล รวมจำนวนดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ในแต่ละเซลล์อาจมีมากถึงประมาณ 800 - 1,600 โมเลกุล คลอโรพลาสต์จีโนมของพืชมีดอก (angiosperm) โดยทั่วไปประกอบด้วยดีเอ็นเอส่วนที่เป็น large single - copy region (LSC) ส่วนที่เป็น small single - copy region (SSC) และส่วนที่เป็นชุดซ้ำ (inverted repeat, IR) ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างส่วนที่เป็น LSC และส่วนที่เป็น SSC ในทิศทางกลับกัน (สุรินทร์, 2552) ตัวอย่างคลอโรพลาสต์จีโนมในพืชแสดงดังภาพที่ 3

คลอโรพลาสต์จีโนมแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามหน้าที่ ได้แก่ กลุ่มที่เป็นยีนที่สามารถ code โปรตีนได้ (protein-coding gene) กลุ่มที่เป็น introns และกลุ่มที่เป็น intergenic spacers ซึ่งสองกลุ่มหลังเป็นส่วนที่ไม่ใช่ยีนเรียกว่า non-coding regions (Shaw *et al.*, 2007) สำหรับส่วนที่เป็นยีนโดยทั่วไปในพืชดอกมีประมาณ 87-183 ยีน (Sugiura *et al.*, 1998) โดยแบ่งยีนเป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสและแปลรหัสพันธุกรรม ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง และยีนที่ code โปรตีนต่างๆ เช่น กรดไขมัน กรดอะมิโน และสารที่มีสีรงควัตถุธรรมชาติ (pigments) เป็นต้น (Kapoor and Sugiura, 1998) สำหรับบริเวณ non-coding regions Shaw *et al.* (2005, 2007) ได้รายงานถึงความผันแปรของตำแหน่งหรือบริเวณ non-coding regions ในคลอโรพลาสต์จีโนมที่ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาด้านอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของพืช (plant molecular systematic)



ภาพที่ 3 โครงสร้างคลอโรพลาสต์จีโนมของพืชวงศ์ถั่ว *Vigna radiata*

ที่มา : Tangphatsornruang *et al.* (2010)

การเกิด mutation ในส่วน non-coding regions ส่วนใหญ่มักไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในโปรตีน ซึ่งมีผลน้อยมากหรือไม่มีผลต่อความสามารถอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต (Frankham *et al.*, 2004) ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ส่วน non-coding regions ถูกนำไปใช้ในการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน (taxonomy) นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ภายในระดับสปีชีส์ (intraspecific) ในด้านพันธุศาสตร์ประชากรและด้าน phylogeography ที่เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางภูมิศาสตร์กับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (Pleines *et al.*, 2009) และยังถือได้ว่าอินทรอนและอินเทอเจนนิกสเปเซอร์เป็นแหล่งข้อมูลด้านพันธุกรรมที่สำคัญต่อการศึกษาวิวัฒนาการของพืช (Borsh and Quandt, 2009)

พืชมีดอกชั้นสูงโดยทั่วไปมีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมในคลอโรพลาสต์จากแม่เพียงฝ่ายเดียว (maternal inherited หรือ uniparental inheritance) เนื่องจากเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียจะมี cytoplasm ซึ่งมี organelle ต่างๆ ได้แก่คลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียรวมอยู่ด้วย ส่วนเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้มักมีเฉพาะนิวเคลียส ซึ่งเป็นข้อดีในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร เพราะผู้ที่สืบเชื้อสายมาจากบรรพบุรุษฝ่ายแม่ จะมีรูปแบบของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียเหมือนกันทั้งหมด จีโนมในคลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็น haploid จึงเรียกรูปแบบของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ว่า haplotype ทั้งนี้การถ่ายทอดพันธุกรรมจากทางแม่ของพืชหลายชนิดมีแบบแผนที่แตกต่างกัน ในพืชชั้นสูงมีการถ่ายทอดคลอโรพลาสต์ผ่านทางเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย 75 เปอร์เซ็นต์ และถ่ายทอดทั้งทางเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียและเพศผู้ 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้แก่พืชพวกเมล็ดเปลือย (gymnosperm) (สุรินทร์, 2552) การถ่ายทอดดีเอ็นเอของนิวเคลียสจะส่งผ่านไปยังรุ่นลูกหลานทั้งทางละอองเรณูและทางเมล็ดซึ่งได้จำนวนสำเนาต่อเซลล์ (copy number) หนึ่งสำเนาจากพ่อและอีกหนึ่งสำเนาจากแม่ ส่วนถ่ายทอดดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ในพืชมีดอกนั้นจะส่งผ่านทางเมล็ดเท่านั้นซึ่งได้สำเนาต่อเซลล์จำนวนมากจากแม่ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ความผันแปรของดีเอ็นเอจากส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนมสะท้อนถึงโครงสร้างทางด้านภูมิศาสตร์ได้ในระดับสูง (highly geographically structured) มากกว่าความผันแปรที่พบในนิวเคลียร์จีโนม (Nielsen and Kjaer, 2008)

ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์จีโนมในพืชมีดอกมีลักษณะเป็น haploid และถ่ายทอดจากแม่ฝ่ายเดียว ขนาดของประชากรที่ใช้ศึกษาจึงน้อยกว่าเมื่อตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอจากนิวเคลียส (สุรินทร์, 2552) รวมถึงดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ไม่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนและรวมตัวกันใหม่ (recombination) ดีเอ็นเอรุ่นลูกจึงมีจีโนมในคลอโรพลาสต์เหมือนแม่เสมอ (Nielsen and Kjaer, 2008) ทั้งนี้ Nielsen and Kjaer (2008) ได้สรุปลักษณะทางพันธุกรรมของคลอโรพลาสต์จีโนม ไมโทคอนเดรียลจีโนม และนิวเคลียร์จีโนมดังตารางที่ 1

การที่มีความซับซ้อนของการถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานที่น้อยกว่าจึงทำให้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์จีโนมถูกนำไปใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในลักษณะต่างๆ เช่น ใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ใช้ในการศึกษากระบวนการเกิด gene flow หรือการกระจายของเมล็ด (seed migration) หรือใช้ตรวจสอบการแยกเป็นกลุ่มย่อยๆ ของประชากร (colonization) (Petit *et al.*, 2003) รวมทั้งยังนำไปใช้ในการติดตามหรือระบุแหล่งที่มาของต้นไม้ได้อีกด้วย เนื่องจากสามารถสะท้อนถึงโครงสร้างทางภูมิศาสตร์ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับส่วนของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (Petit *et al.*, 1993) นอกจากนี้ส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม ยังมีจำนวน

ตารางที่ 1 ลักษณะของคลอโรพลาสต์จีโนม ไมโทคอนเดรียลจีโนม และนิวเคลียร์จีโนมของพืชมีดอก (flowering plant)

คุณสมบัติ	จีโนม		
	ไมโทคอนเดรีย	คลอโรพลาสต์	นิวเคลียส
- ขนาด	ขนาดเล็ก	ขนาดเล็ก	ขนาดใหญ่
- Level of ploidy	haploid	haploid	diploid-polyploid
- ความผันแปรของเครื่องหมาย	ต่ำ	ต่ำ	สูง
- รูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในพืชมีดอก (flowering plant)	ทางแม่	ทางแม่	ทางพ่อและทางแม่
- โครงสร้างทางภูมิศาสตร์	สูง	สูง	ต่ำ
- จำนวนสำเนาของยีน (gene copy)	จำนวนมาก	จำนวนมาก	สอง หรือมากกว่า
- การเกิด recombination	ไม่เกิด	ไม่เกิด	เกิด

สำเนาต่อเซลล์ที่มาก ดังนั้นส่วนของยีนเป้าหมายที่ทำการศึกษาก็จะมีจำนวนมากตาม ทำให้มีโอกาสประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่ายกว่าส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียร์จีโนม (Sarapää, 1988; Nielsen and Kjaer, 2008)

ตัวอย่างของการศึกษาที่เกี่ยวกับคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอในด้านพันธุกรรมไม้ป่า ได้แก่ Ribeiro *et al.* (2010) ได้ศึกษา phylogeography ของไม้ Brazilian rosewood (*D. nigra*) ที่อยู่ในวงศ์ถั่ว ซึ่งเป็นไม้ที่ใกล้สูญพันธุ์ในป่าแถบแอตแลนติกของประเทศบราซิล โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน non-coding region ของคลอโรพลาสต์จีโนม (*trnV-trnM* และ *trnL* intron) ส่วน Cloutier *et al.* (2005) ได้ศึกษา phylogeography ของ *Carapa guianensis* จากป่าแถบลุ่มแม่น้ำ amazon โดยดูความแตกต่างของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ซึ่งแสดงถึงขอบเขตการแพร่กระจายเมล็ดและลักษณะการเกิด gene flow ของพันธุ์ไม้ชนิดดังกล่าวที่มีน้ำเป็นตัวกลางในการแพร่กระจายเมล็ดพันธุ์ Caver *et al.* (2005) ได้ศึกษาผลความแตกต่างจากคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ โดยแสดงถึงแหล่งกำเนิดของประชากร *Vochysia ferruginea* ระหว่างพื้นที่ชุ่มน้ำแถบแอตแลนติก และพื้นที่ชุ่มน้ำแถบแปซิฟิกในคอ스타ริกา Collevatti *et al.* (2003) ได้รายงานถึงข้อมูลด้าน phylogeography ของ *Caryocar brasiliense* ซึ่งเป็นพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ โดยศึกษาความแตกต่างของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอและระดับความแตกต่างของวิวัฒนาการทางพันธุกรรม ซึ่งวิเคราะห์ผล

จากความแตกต่างของ haplotype ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และmicrosatellite นอกจากนี้ Chuayjaeng (2005) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากคลอโรพลาสต์จีโนมในข้าวปลูก (cultivated rice) และข้าวป่า (wild rice) เพื่อทำให้เกิดความชัดเจนถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Oryza* species โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment - Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-RF-SSCP) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการระบุแหล่งที่มาของไม้

ไม้ป่าหลายชนิดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสูง ซึ่งสามารถใช้ในการติดตามแหล่งที่มาของไม้ที่มีชีวิตรวมถึงไม้ท่อนและไม้แปรรูปได้ ความก้าวหน้าในการสกัดดีเอ็นเอในเนื้อเยื่อที่มีชีวิตรวมถึงเนื้อไม้และผลิตภัณฑ์จากเนื้อไม้ ทำให้สามารถทดสอบแหล่งที่มาของกล้าไม้ในการปลูกสร้างสวนป่าหรือไม้ท่อนได้ ซึ่งสิ่งสำคัญในการพิสูจน์หลักฐานเพื่อติดตามแหล่งที่มาของไม้คือ การใช้เครื่องมือในระดับโมเลกุลที่สามารถนำไปทดสอบแหล่งกำเนิดของส่วนสืบพันธุ์ที่ใช้ในการปลูกสร้างสวนป่า และทดสอบไม้ท่อนและผลิตภัณฑ์จากไม้ที่เป็นธุรกิจด้านการค้าในระดับนานาชาติ (Finkeldey *et al.*, 2010)

ข้อมูลดีเอ็นเอสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการบ่งชี้แหล่งที่มาของไม้ หรือเพื่อทำให้เกิดความชัดเจนในการติดตามแหล่งที่มาของไม้ ผิดกฎหมายได้ทางหนึ่ง ข้อมูลดีเอ็นเอที่ใช้ในการติดตามแหล่งที่มาของไม้มี 2 ประเภท ได้แก่ ข้อมูลที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequence data) และข้อมูลที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอหรือจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่างๆ (DNA fragment marker) สำหรับข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นวิธีที่ใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างในช่วงตำแหน่งของดีเอ็นเอที่เลือกมาศึกษา ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่างๆกัน เป็นวิธีที่ใช้การเปรียบเทียบขนาดหรือความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งเกิดจากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะหรือการเพิ่มปริมาณส่วนของ microsatellite (Nielsen and Kjaer, 2008) ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการบ่งชี้แหล่งที่มาของไม้ได้แก่ ในปี 2002 ได้มีการร่วมกันของห้องปฏิบัติการจากยุโรปจำนวน 16 แห่ง โดยศึกษาความแตกต่างจากส่วนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของไม้โอ๊กขาวในยุโรป (Petit *et al.*, 2002) นอกจากนี้ Deguilloux *et al.* (2003) ได้ศึกษาการระบุแหล่งที่มาทางภูมิศาสตร์ของไม้โอ๊กขาวในยุโรป โดยแสดงถึงความแตกต่างจากส่วนคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอที่บอกโครงสร้างความสัมพันธ์ทางภูมิศาสตร์ที่มีความชัดเจนแน่นอนของความแตกต่างระหว่างประชากรทางภาคตะวันตกและประชากรทางภาคตะวันออก Deguilloux *et al.* (2004) ได้ติดตามหรือระบุแหล่งที่มาของตัวอย่างต่างๆจากไม้โอ๊ก เพื่อใช้ในการควบคุม

แหล่งที่มาของไม้อ้อยในอุตสาหกรรมทำถังเบียร์ของประเทศฝรั่งเศส นอกจากนี้ Tnah *et al.* (2009) ได้วิเคราะห์ข้อมูล haplotypes จากคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ เพื่อช่วยติดตามแหล่งที่มาของไม้ตะเคียนชันตาแมว (*Neobalanocarpus heimii*) ในแถบคาบสมุทรมมาเลเซีย

การสกัดดีเอ็นเอจากส่วนต่างๆของพืช

ปัญหาของการสกัดดีเอ็นเอถือเป็นเรื่องสำคัญในงานด้านชีววิทยาพันธุศาสตร์พืช (Ribeiro and Lovato, 2007) ได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการสกัดดีเอ็นเอที่ถูกตีพิมพ์เป็นจำนวนมาก เช่น Doyle and Doyle (1990); Scott and Playford (1996); Sharma *et al.* (2002); Novaes *et al.* (2009); Ribeiro and Lovato (2007) ทั้งนี้การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เพียงวิธีเดียวที่เหมาะสมสำหรับทุกพืชนั้นเป็นไปได้ยากเนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีปริมาณสารที่แตกต่างกัน (Loomis, 1974) โดยพืชหลายชนิดมีสารที่จำเพาะพวก polysaccharide polyphenol และสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) อื่นๆ ในปริมาณสูง ซึ่งสารเหล่านี้จะไปจับกับ nucleic acid ระหว่างการสกัดดีเอ็นเอและไปขัดขวางปฏิกิริยาอื่นๆที่ตามมา (Pirttilä *et al.*, 2001)

โดยทั่วไปแล้วการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ของพืชใช้ส่วนของใบซึ่งเป็นแหล่งดีเอ็นเอ (Novaes *et al.*, 2009) การสกัดดีเอ็นเอส่วนใหญ่แนะนำให้สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชที่สด เช่น ใบพืช ตาพืช ราก เนื้อเยื่อแคมเบียม และเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆของพืชที่มีชีวิต ซึ่งสามารถทำได้ง่ายกว่าส่วนของเนื้อไม้ (Deguilloux *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างใบจากต้นที่มีความสูงมากๆ หรืออยู่ในพื้นไกลและเข้าถึงลำบากนั้นมักทำได้ยากและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย อาจจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างแห้งหรือกิ่งแห้ง วิธีสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชที่แห้งจึงมีความจำเป็น (Novaes *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2002) รวมถึงดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบที่ถูกทำให้แห้งหรือวัสดุที่เก็บใน silica gel และนำมาจากพิพิธภัณฑ์พืช (herbarium) การสกัดจากตัวอย่างเหล่านี้จะทำให้ได้คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ค่อนข้างต่ำ (Ribeiro and Lovato, 2007)

ในปัจจุบันเนื้อไม้ได้กลายเป็นเนื้อเยื่อที่มีความเหมาะสมในการพิสูจน์หลักฐานและเพื่อควบคุมธุรกิจที่เกี่ยวกับการค้าไม้ โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อไม้นั้นต้องมีคุณภาพและปริมาณเพียงพอสำหรับการทำ PCR และมีรูปแบบความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถแยกแยะระหว่างชนิดและภายในชนิดได้ รวมถึงสามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่างพื้นที่ได้ (Rachmayanti *et al.*, 2006) โดยอุปสรรคสำคัญ 2 สิ่งในการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้อไม้คือ สารในเนื้อไม้ที่ไปยับยั้งการทำ PCR (Lee and Cooper, 1995)

และคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอตำที่ได้อีกกลับคืนมาจากไม้ที่ตายแล้ว ซึ่งเป็นผลมาจากการสลายของดีเอ็นเอเป็นชิ้นเล็กๆในเนื้อเยื่อที่ตายแล้วเช่น ไม้หลังจากตัด โคนต้น (Deguilloux *et al.*, 2002) ตัวอย่างการศึกษาด้านการสกัดดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องได้แก่

Deguilloux *et al.* (2002) ได้ทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียจากดีเอ็นเอของต้นโอ๊กที่สกัดได้จากส่วนต่างๆ ของท่อนไม้ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากทุกส่วนของไม้คือ แกมเบียม กระพี้ทั้งด้านในและด้านนอก บริเวณที่อยู่ระหว่างกระพี้และแก่นไม้ และส่วนของแก่นไม้ ยกเว้นเฉพาะส่วนของเปลือกนอกไม้

Rachmayanti *et al.* (2006) ได้สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อไม้ของพืชวงศ์ Dipterocarpaceae ซึ่งจัดได้ว่าไม้ในวงศ์นี้มีความสำคัญในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่แตกต่างกันและเปรียบเทียบเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมจากตัวอย่างเนื้อไม้ของประชากรในป่าธรรมชาติและของเนื้อไม้ที่ผ่านกระบวนการทางอุตสาหกรรม

Ribeiro and Lovato (2007) ได้วิเคราะห์เปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในตัวอย่างใบสดและตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (herbarium specimens) ของไม้สกุล *Dalbergia* ซึ่งผลแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างพรรณไม้แห้งมีคุณภาพดีเอ็นเอที่ดีกว่าตัวอย่างใบสดซึ่งเป็นผลจากรูปแบบการเก็บและการรักษาตัวอย่าง และพบว่าตัวอย่างพรรณไม้แห้งทั้งหมด 54 ตัวอย่างสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR สำเร็จเพียง 8 ตัวอย่าง

Novaes *et al.* (2009) ได้พัฒนาวิธีสกัดดีเอ็นเอจากไม้ในวงศ์ถั่วในแถบป่าแอตแลนติกและCerrado ที่ได้ดัดแปลงวิธีสกัดดีเอ็นเอจาก CTAB คุณภาพดีเอ็นเอจากเปลือกไม้ที่ได้ทุกๆชนิดได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากใบสูงกว่าจากเปลือกเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ความบริสุทธิ์ให้ผลไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเปลือกแช่เย็นและที่ทำให้แห้งจาก silica gel ให้ผลทั้งคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างจากต้นพะยูน
 - 1.1 สารดูดความชื้น (silica gel)
 - 1.2 ถุงซิพขนาด 3.5 นิ้ว x 5 นิ้ว
 - 1.3 มีดสำหรับถากเปลือกและเนื้อไม้
 - 1.4 สมุดจดบันทึก ปากกา ดินสอ
 - 1.5 ปากกา permanent
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ
 - 2.1 หลอดทดลอง (microtube) ขนาด 0.2 0.5 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร
 - 2.2 ถุงมือยาง เซมเพอร์การ์ด (SemperGuard)
 - 2.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath incubator; Taiyo, Japan)
 - 2.4 โกร่งบดตัวอย่าง
 - 2.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Sigma รุ่น 2K15; USA)
 - 2.6 ชุดฉายแสงและถ่ายภาพดีเอ็นเอ (DNA photodocumentation)
 - 2.7 เครื่องชั่งสาร (รุ่น CP323S; Sartorius. USA)
 - 2.8 ชุดแยกขนาดดีเอ็นเอ (gel electrophoresis)
 - 2.9 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer : NanoDrop 2000)
 - 2.10 เครื่อง PCR รุ่น PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research)
 - 2.11 เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA)

วิธีการ

1. การทดสอบวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากส่วนเปลือกไม้ เนื้อไม้และใบของต้นพะยูน

1.1 ส่วนต่างๆของต้นพะยูนที่ใช้ทดสอบ

ตัวอย่างส่วนของต้นพะยูนที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ เปลือกไม้ชั้นใน เนื้อไม้ส่วน กระพี้ และใบ รวม 13 ตัวอย่างที่เก็บในสภาพต่างกันคือ เก็บในสารดูดความชื้น (silica gel) เก็บที่ อุณหภูมิห้อง และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ดังตารางที่ 2

1.2 วิธีต่างๆที่ใช้สกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างจากต้นพะยูน

ตัวอย่างเปลือกไม้ชั้นใน เนื้อไม้ส่วนกระพี้ ชูด้วยมีดให้มีขนาดเล็กที่สุดและชั่ง 100 มิลลิกรัม ตัวอย่างใบชั่ง 75 มิลลิกรัม และนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีต่างๆ รวม 6 วิธีดังนี้

วิธีที่ 1 วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) ตามแนวทางของ Ribeiro and Lovato (2007)

วิธีที่ 2 วิธีประยุกต์ของ Jobes *et al.* (1995) ตามแนวทางของ Ribeiro and Lovato (2007)

วิธีที่ 3 วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) ตามแนวทางของ Ribeiro and Lovato (2007)

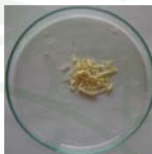
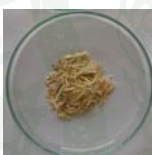
วิธีที่ 4 วิธีของ Novaes *et al.* (2009)

วิธีที่ 5 วิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002)

วิธีที่ 6 วิธีจากชุดสกัดสำเร็จรูป Dneasy Plant minikit (Qiagen)

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 6 วิธี มีดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2 ส่วนของต้นพะยูนและรูปแบบการเก็บตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่	ส่วนที่ใช้ทดสอบ	ภาพตัวอย่าง	รูปแบบการเก็บตัวอย่าง
1 2 3	เปลือกไม้ชั้นใน (1) เปลือกไม้ชั้นใน (2) เปลือกไม้ชั้นใน (3)		ใส่ใน silica gel ทันที
4 5 6	เนื้อไม้ส่วนกระพี้ (1) เนื้อไม้ส่วนกระพี้ (2) เนื้อไม้ส่วนกระพี้ (3)		
7 8 9	ใบไม้ (1) ใบไม้ (2) ใบไม้ (3)		
10 11	เปลือกไม้ชั้นใน (4) เปลือกไม้ชั้นใน (5)		
12 13	ใบ (6) ใบ (7)		
			อุณหภูมิห้อง
			-20 °C

วิธีที่ 1 สกัดดีเอ็นเอตามวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) ตามแนวทางของ Ribeiro and Lovato (2007) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

- 1) บดตัวอย่างด้วยโกร่งพร้อมไนโตรเจนเหลวจนตัวอย่างละเอียดเป็นผง
- 2) เติม extraction buffer (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM EDTA pH 8.0, 2% PVP) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติม 2% β -mercaptoethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน
- 3) บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 4) ตั้งที่อุณหภูมิห้อง และเติม chloroform : isoamyl-alcohol (CIA) (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันประมาณ 5 นาที
- 5)ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่

- 6) เติม CIA (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง
- 7) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่
- 8) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร
- 9) เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน
- 10) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และเทส่วนใสทิ้ง
- 11) ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง
- 12) ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์

วิธีที่ 2 สกัดดีเอ็นเอตามวิธีของประยุกต์ของ Jobes *et al.* (1995) ตามแนวทางของ Ribeiro and Lovato (2007) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

- 1) บดตัวอย่างด้วยโกร่งพร้อมไนโตรเจนเหลวจนตัวอย่างละเอียดเป็นผง
- 2) เติม extraction buffer (100 mM NaOAc, 100 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl, 2% PVP) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- 3) บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 4) เติม 20 % SDS ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 5) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่
- 6) เติม 5M KOAc ปริมาตร 1 ใน 3 ของส่วนใสที่ย้ายใส่หลอดใหม่ ผสมให้เข้ากันและเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 7) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่
- 8) เติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนใสที่ย้ายใส่หลอดใหม่ ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดและเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
- 9) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์
- 10) เติม 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของน้ำกลั่นที่ใช้ละลายตะกอน ผสมให้เข้ากันและเติม ethanol บริสุทธิ์ปริมาตร 2 เท่าของน้ำกลั่นที่ใช้ละลายตะกอน
- 11) บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 12) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์
- 13) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของน้ำกลั่นที่ใช้ละลายตะกอนอีกครั้ง และบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- 14)ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเทส่วนใสทิ้ง
- 15) ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 2-3 ครั้ง
- 16) ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์

วิธีที่ 3 สกัดดีเอ็นเอตามวิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) ตามแนวทางของ Ribeiro and Lovato (2007) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

- 1) บดตัวอย่างด้วยโกร่งพร้อมไนโตรเจนเหลวจนตัวอย่างละเอียดเป็นผง
- 2) เติม extraction buffer (5% PVP, 0.35 M D-Sorbitol, 5 mM EDTA, 50 mM Tris HCl pH 8.0, 0.1% bovine serum albumin) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10-15 นาที
- 3) ปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนด้วย wash buffer (50 mM Tris HCl pH 8.0, 25 mM EDTA, 0.35 M sorbitol) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และเติม 5% N-Lauroylsarcosine ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที
- 4) ทำซ้ำข้อ 3) ประมาณ 2-3 ครั้ง จนกว่าเมือกเหนียว ๆ จะหมด
- 5) เติม CTAB buffer (0.5 M Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA, 2.5 M NaCl, 0.02 M CTAB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 6) บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบแช่ที่ 55 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที
- 7) เติม CIA (24:1) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 8) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,00 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่
- 9) ทำซ้ำข้อ 7) และ ข้อ 8) อีก 1 ครั้ง
- 10) เติม 7.5 M NH_4OAC ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใสที่ได้ และ ethanol บริสุทธิ์ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสที่ได้ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน
- 11) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,00 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเทส่วนใสทิ้ง
- 12) ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol จำนวน 2 ครั้ง
- 13) ผึ่งให้ตะกอนแห้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์

วิธีที่ 4 สกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Novaes *et al.* (2009) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

- 1) บดตัวอย่างด้วยโกร่งพร้อมไนโตรเจนเหลวจนตัวอย่างละเอียดเป็นผง
- 2) เติม CTAB extraction buffer (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, PVP 2%) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติม 2% β -mercaptoethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- 3) ผสมให้เข้ากัน และเติม 20% SDS ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 4) บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบแช่ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 5) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที และเติม CIA (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมโดยพลิกหลอด 5 นาที
- 6) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่
- 7) เติม 10% CTAB ปริมาตร 140 ไมโครลิตร และ 5M NaCl ปริมาตร 280 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 8) ทำซ้ำข้อ 5) และ 6)
- 9) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสที่ย้ายใส่หลอดใหม่ และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน
- 10) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเทส่วนใสทิ้ง
- 11) ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol จำนวน 2-3 ครั้ง
- 12) ปล่อยให้ตะกอนแห้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์

วิธีที่ 5 สกัดดีเอ็นเอโดยประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

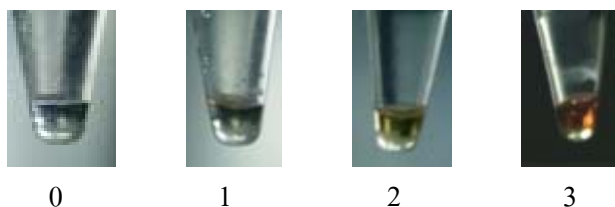
- 1) บดตัวอย่างด้วยโกร่งพร้อมไนโตรเจนเหลวจนตัวอย่างละเอียดเป็นผง
- 2) เติม Solution I (2.5M NaCl และ 1% N-Lauroylsarcosine) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมโดยพลิกหลอดให้เข้ากัน
- 3) ปั่นเหวี่ยงที่ 8,600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 4) ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ และเติม CIA (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส และผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอด
- 5) ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 6) ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่และเติม extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% CTAB) ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ผสมโดยพลิกหลอด

- 7) บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
- 8) เติม CIA (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสก่อนใส่ extraction buffer และปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 9) ย้ายส่วนใสใสหลอดใหม่และเติม 3M NaOAc ปริมาตร 1/30 เท่าของส่วนใสที่ได้ และเติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนใสที่ได้เช่นกัน ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอด
- 10) ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- 11) เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol จำนวน 2 ครั้ง
- 12) ปล่อยให้ตะกอนแห้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์

วิธีที่ 6 สกัดดีเอ็นเอตามแบบชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Dneasy Plant minikit (Qiagen) ขึ้นตอนตามวิธีการที่แนบมาพร้อมกับชุดสกัดสำเร็จรูป

1.3 ตรวจสอบผลวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากการวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR

วัดปริมาณและคุณภาพสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใน 1X TAE buffer และย้อมเจลดด้วย ethidium bromide เพื่อดูผ่านแสง ultraviolet โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1Kb DNA Ladder) และวัดปริมาณและคุณภาพสารละลายดีเอ็นเอด้วย spectrophotometer (NanoDrop 2000) โดยใช้ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรเพื่อวัดความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิก และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280} ratio) เพื่อวัดความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอจากสัดส่วนของกรดนิวคลีอิก (nucleic acids) และ โปรตีนในตัวอย่าง (Sambrook *et al.*, 1989) รวมถึงเปรียบเทียบสีของสารละลายดีเอ็นเอ โดยให้หมายเลขที่แสดงสีต่างๆ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 สีของสารละลายดีเอ็นเอ โดย 0 = สีใส 1 = สีเหลือง 2 = สีน้ำตาลอ่อน 3 = สีน้ำตาลเข้ม

ตารางที่ 3 ส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมและนิวเคลียร์จีโนมที่ใช้คัดเลือกและ primer ที่ใช้ทดสอบความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสารละลาย ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีต่างๆจากส่วนต่างๆของต้นพะยูน

ส่วนที่ใช้ศึกษา	ชื่อ primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'---- 3')	อุณหภูมิ annealing (° C)	ขนาด (คู่เบส)
<i>trnL</i> intron	<i>trnL</i> (UAA)5'exon	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	50	600
	<i>trnL</i> (UAA)3'exon	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC		
<i>ITS</i>	<i>ITS4</i>	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	52	750
	<i>ITS5</i>	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG		
<i>trnC</i> - <i>ycf6</i> spacer	<i>trnC</i>	CCA GTT CAA ATC TGG GTG TC	55	1,000
	<i>petN1R</i>	CCC AAG CAA GAC TTA CTA TAT CC		
<i>trnT</i> - <i>trnL</i> spacer	<i>trnT</i> (UGU)	CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT	50	1,350
	<i>trnL</i> (UAA)5'exon	TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC		

ทำ PCR เพื่อทดสอบความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากส่วนของคลอโรพลาสต์และนิวเคลียสจีโนม ใช้ส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนมจำนวน 3 ส่วน ได้แก่ *trnT-trnL* spacer และ *trnL* intron จาก Taberlet *et al.* (1991) และ *trnC-ycf6* spacer จาก Kress *et al.* (2005) และส่วนของนิวเคลียสจีโนมจำนวน 1 ส่วน ได้แก่ *ITS* จาก White *et al.* (1990) รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 3 โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นประมาณ 20-50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลาย forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร buffer ที่มีความเข้มข้น 10 เท่า (10x reaction buffer : 100mM Tris-HCL pH8.3, 15mM MgCl₂, 500mM KCl) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร dNTP mix (dATP dCTP dGTP และ dTTP) ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร BSA (10 mg/ml) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (RBC Taq DNA Polymerase) 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR รุ่น PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) โดยใช้โปรแกรมดังตารางที่ 4 และใช้อุณหภูมิ annealing ตามตารางที่ 3 จากนั้นตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นของ agarose 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer และย้อม gel ด้วย ethidium bromide นำไปส่องดูภายใต้แสง ultraviolet โดยเปรียบเทียบกับขนาดก๊อบดีเอ็นเอมาตรฐาน (1Kb DNA Ladder)

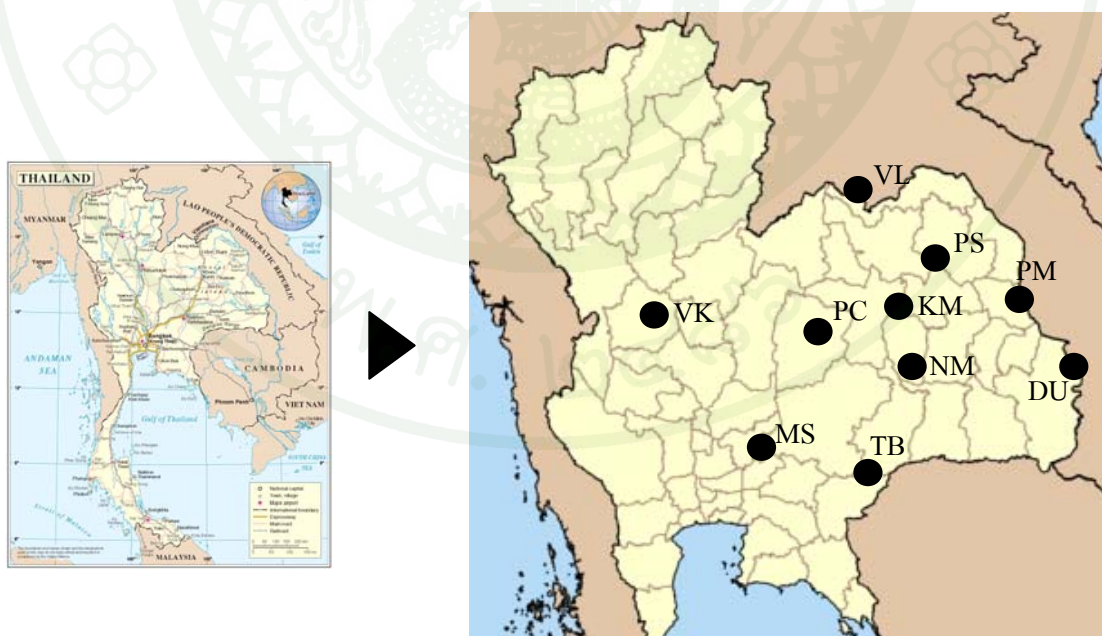
ตารางที่ 4 รายละเอียดโปรแกรมการทำ PCR ที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้สกัดด้วยวิธีต่างๆจากส่วนต่างๆของต้นพะยูง

ขั้นตอนต่างๆ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	1 นาที	30
Annealing	50-55	1 นาที	
Extention	72	2 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1

2. การศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยูน

2.1 ตัวอย่างและประชากรของไม้พะยูนที่ใช้ศึกษา

เก็บตัวอย่างใบหรือเปลือกชั้นในจากต้นพะยูนแบบสุ่มโดยมีระยะห่างระหว่างต้นมากกว่า 30 เมตร ประชากรละ 10-12 ต้น รวม 10 ประชากรจากประเทศไทยและลาว ต้นพะยูนจากประเทศไทยจำนวน 9 ประชากร ได้แก่ อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) อุทยานแห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์ (TB) ป่าดงนาทาม ซึ่งอยู่ในพื้นที่ป่าชุมชนและเป็นส่วนหนึ่งของอุทยานแห่งชาติผาแต้ม จ.อุบลราชธานี (DU) อุทยานแห่งชาติภูผาทิพย์ จ.มุกดาหาร (PM) อุทยานแห่งชาติ ภูผาเหล็ก จ.สกลนคร (PS) ป่าสงวนแห่งชาติ ป่าโคกข้าว อ.ชื่นชม จ.มหาสารคาม (KM) ป่าชุมชน โครดคงเค็ง อำเภอนาคู จ.มหาสารคาม (NM) อุทยานแห่งชาติภูแลนคา จ.ชัยภูมิ (PC) สวนป่าสถานีวิจัย จ.กำแพงเพชร ซึ่งนำเมล็ดพะยูนมาปลูกโดยมีแหล่งกำเนิดมาจากอำเภอโพธิ์พิสัย จ.หนองคาย (VK) และต้นพะยูนจากประเทศลาวจำนวน 1 ประชากร ได้แก่ ป่าสงวนเมืองเวียงจันทน์ (VL) แสดงดังภาพที่ 5 และตารางที่ 5 ในการเก็บตัวอย่างมีระยะห่างระหว่างประชากรมากกว่า 50 กิโลเมตร โดยตัวอย่างที่เก็บได้นำไปใส่ใน silica gel ทันที



ภาพที่ 5 ประชากรของไม้พะยูนที่ใช้ศึกษา

ที่มา : UN Cartographic Section (2004)

ตารางที่ 5 ประชากรของไม้พะยุงที่ใช้ศึกษา

ประชากร	ชื่อย่อ	จำนวนตัวอย่าง	พิกัดทางภูมิศาสตร์
อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี	MS	10	14°41'19"N 101°11'42"E
อุทยานแห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์	TB	11	14°10'07"N 102°34'56"E
ป่าชุมชนและส่วนหนึ่งของอุทยานแห่งชาติผาแต้ม ป่าดงนาทาม จ.อุบลราชธานี	DU	12	15°37'04"N 105°37'17"E
อุทยานแห่งชาติภูผาทิพย์ จ.มุกดาหาร	PM	11	16°42'36"N 104°45'17"E
อุทยานแห่งชาติภูผาเหล็ก จ.สกลนคร	PS	11	17°16'28"N 103°26'55"E
ป่าสงวนแห่งชาติ ป่าโคกข้าว อ.ชื่นชม จ.มหาสารคาม	KM	11	16°31'53"N 103°10'18"E
ป่าชุมชนโคกคงเค็ง อ.นาคูน จ.มหาสารคาม	NM	12	15°42'35"N 103°13'47"E
อุทยานแห่งชาติภูแล่นคา จ.ชัยภูมิ	PC	10	16°00'27"N 101°53'41"E
สวนป่าสถานีวัฒนวิชัย จ.กำแพงเพชร	VK	10	18°01'19"N 103°04'38"E
ป่าสงวนเมืองเวียงจันทน์ ประเทศลาว	VL	10	17°58'00"N 102°36'00"E
รวม		108	

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ และการวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างพะยูน

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบหรือเปลือกชั้นในของต้นพะยูนด้วยวิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) ตามขั้นตอนดังนี้

- 1) บดตัวอย่างด้วยโกร่งพร้อมไนโตรเจนเหลวจนตัวอย่างละเอียดเป็นผง
- 2) เติม Solution I (2.5M NaCl และ 1% N-Lauroylsarcosine) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา
- 3) ปั่นเหวี่ยงที่ 8,600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 4) ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ และเติม CIA (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใส และผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา
- 5) ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 6) ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่และเติม extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% CTAB) ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอด
- 7) บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
- 8) เติม CIA ปริมาตร 1 เท่าและปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 9) ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่และเติม 3M NaOAC ปริมาตร 1/30 เท่าของปริมาตรส่วนใสก่อนใส่ extraction buffer และเติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรส่วนใสก่อนใส่ extraction buffer เข่นกัน ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอด
- 10) ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- 11) เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol จำนวน 2 ครั้ง
- 12) ปล่อยให้ตะกอนแห้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์

และเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้นำไปวัดปริมาณและคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ผง agarose ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer และย้อมเจลด้วย ethidium bromide นำไปส่องดูภายใต้แสง ultraviolet โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1Kb DNA Ladder)

2.3 การคัดเลือกส่วน non-coding regions ของคลอโรพลาสต์จีโนมที่มีความผันแปร

คัดเลือกส่วน non-coding regions ของคลอโรพลาสต์จีโนมบริเวณ intron และ intergenic spacer จำนวน 8 ส่วนที่มีรายงานมาก่อนดังนี้ *trnL* intron และ *trnL-trnF* spacer จาก Taberlet *et al.* (1991) *psbB-psbF* spacer และ *trnS-trnG* spacer จาก Halmilton (1999) *psbA-trnH* spacer จาก Shaw *et al.* (2005) และ *rpl32-ndhF* spacer จาก Shaw *et al.* (2007) *trnV-trnM* spacer จาก Cheng *et al.* (2005) และ *trnC-ycf6* spacer จาก Kress *et al.* (2005) รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 6

สุ่มเลือกตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอจำนวน 1-2 ตัวอย่างต่อประชากรมาทดสอบเพื่อหาส่วน non-coding regions ที่มีความผันแปร โดยนำสารละลายดีเอ็นเอดังกล่าวมาทำ PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามขั้นตอนข้อที่ 2.4 และ 2.5 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างดังกล่าวถูกนำไปเปรียบเทียบที่ละส่วนด้วยโปรแกรม Bioedit 7.0.5.3 (Hall, 1999) เพื่อวิเคราะห์หาส่วน non-coding regions ที่มีความผันแปร

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วน non-coding regions จากคลอโรพลาสต์จีโนมที่มีโพลีโมर्फิซึมได้แก่ส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* โดยนำทั้ง 3 ส่วนดังกล่าวไปใช้ทดสอบกับตัวอย่างทั้งหมด 108 ตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมต่อไป

2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR และการตรวจสอบผลผลิตที่ได้

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการทำ PCR โดยใช้ primer จากส่วน non-coding regions ของคลอโรพลาสต์จีโนมที่มีความผันแปรจำนวน 3 คู่ที่ได้คัดเลือกมาแล้วได้แก่ *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR มีดังนี้ สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้นประมาณ 20-50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลาย forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร buffer ที่มีความเข้มข้น 10 เท่า (10x reaction buffer : 100mM Tris-HCL pH8.3, 15mM MgCl₂, 500mM KCl) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร dNTP mix (dATP dCTP dGTP และ dTTP) ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (RBC Taq DNA Polymerase) 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเพิ่ม

ตารางที่ 6 ส่วน non-coding regions ของคลอโรพลาสต์จีโนมที่ใช้คัดเลือกและ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ส่วนที่ใช้ศึกษา	ชื่อ primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'---- 3')	อุณหภูมิ annealing (° C)
<i>trnL</i> intron	<i>trnL</i> (UAA)5' exon	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	55
	<i>trnL</i> (UAA)3' exon	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	
<i>trnL</i> - <i>trnF</i> spacer	<i>trnL</i> (UAA) 3' exon	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC	55
	<i>trnF</i> (GAA)	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	
<i>psbB</i> - <i>psbF</i> spacer	<i>psbB</i>	GTT TAC TTT TGG GCATGC TTC G	60
	<i>psbF</i>	CGC AGT TCG TCT TGG ACC AG	
<i>trnS</i> - <i>trnG</i> spacer	<i>trnS</i> (GCU)	GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC	57
	<i>trnG</i> (UCC)	GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C	
<i>psbA</i> - <i>trnH</i> spacer	<i>psbA</i>	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	58
	<i>trnH</i> (GUG)	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	
<i>rpl32</i> - <i>ndhF</i> spacer	<i>rpl32</i>	CCA ATA TCC CTT YYT TTT CCA A	52
	<i>ndhF</i>	GAA AGG TAT KAT CCA YGM ATA TT	
<i>trnV</i> - <i>trnM</i> spacer	<i>trnV</i>	TAC CTA CTA TTG GAT TTG AAC C	57
	<i>trnM</i>	GCT ATA CGG GCT CGA ACC	
<i>trnC</i> - <i>ycf6</i> spacer	<i>trnC</i>	CCA GTT CAA ATC TGG GTG TC	57
	<i>petN1R</i>	CCC AAG CAA GAC TTA CTA TAT CC	

หมายเหตุ Y และ M เป็น degenerate bases โดยที่ Y แทนเบส C และ T ส่วน M แทนเบส A และ C

ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR รุ่น PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) โดยใช้โปรแกรมดังตารางที่ 7 จากนั้นตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นของผง agarose 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer และย้อมเจลด้วย ethidium bromide นำไปส่องดูภายใต้แสง ultraviolet โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1Kb DNA Ladder)

ตารางที่ 7 รายละเอียดโปรแกรมการทำ PCR จากส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6*

ขั้นตอนต่างๆ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	1 นาที	30
Annealing	57	1 นาที	
Extention	72	1 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1

2.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

กำจัด primer และ dNTPs ที่หลงเหลือจากชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ซึ่งย่อยโดยใช้เอนไซม์ Exonuclease I และ FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas) ตามวิธีการที่แนบมา นำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการกำจัด primer และ dNTPs แล้วมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing ซึ่งใช้ primer เดียวกับการทำ PCR ในข้อ 2.4 โดยที่แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ตัวอย่างส่วนหนึ่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งบริษัทไบโอดีไซน์ (ประเทศไทย) และตัวอย่างอีกส่วนหนึ่งนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) ที่ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ กลุ่มงานพันธุกรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) ที่มีส่วนผสมดังนี้ สารละลายที่มีชิ้นดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาตร 1 ไมโครลิตร

primer ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร Ready Reaction mix (Big dye) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 5x Sequencing buffer ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาณน้ำกลั่นให้ครบ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR รุ่น PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) โดยใช้โปรแกรมดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 รายละเอียดโปรแกรมการทำ PCR เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ขั้นตอนต่างๆ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Denaturation	96	1 นาที	1
Denaturation	96	10 วินาที	30
Annealing	53	10 วินาที	
Extention	60	4 นาที	

ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ในรอบนี้นำมาทำความสะอาดดังขั้นตอนต่อไปนี้

- 1) ย้ายผลผลิตจาก PCR ที่ได้ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร
- 2) เตรียมสารละลายผสมต่อหนึ่งตัวอย่างดังนี้ ethanol 95% ปริมาตร 31.25 ไมโครลิตร 3M NaOAC pH 4.6-5.2 ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปริมาตร 7.25 ไมโครลิตร
- 3) นำสารละลายผสมในข้อ 2) ผสมกับผลผลิตจาก PCR ในข้อ 1)
- 4) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที
- 5) ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 6) ดูดส่วนใสทิ้งอย่างระวัง และเติม 70% ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 7) ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 8) เทส่วนใสทิ้งอย่างระวัง และตากตะกอนให้แห้งที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตะกอนที่ได้นำมาละลายด้วย formamide ปริมาตร 15 ไมโครลิตร และนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)

2.6 การวิเคราะห์ผล

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างที่ได้นั้นตรวจสอบด้วยโปรแกรม Bioedit 7.0.5.3 (Hall, 1999) ลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างถูกตัดส่วนที่เป็น primer ออกรวมถึงส่วนที่อยู่ติดกับ primer ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคลุมเครือออก จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างมาจัดเรียงเพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ให้มีตำแหน่งตรงกันมากที่สุด (alignment) โดยใช้โปรแกรม Bioedit 7.0.5.3 เช่นกัน

ทั้งนี้การวิเคราะห์ค่าต่างๆในส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* ได้วิเคราะห์ทั้งแบบแยกลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละส่วน และแบบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสามส่วนเข้าด้วยกัน การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบรวมทุกส่วนเข้าด้วยกันเนื่องจากการศึกษากระบวนการทางวิวัฒนาการจากส่วน noncoding region ของคลอโรพลาสต์จีโนมทั้งส่วนของ intron และ intergenic spacer มีรูปแบบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมผ่านทางแม่เท่านั้น จึงมีอัตราการกลายพันธุ์ค่อนข้างต่ำ (Soltis and Soltis, 1998) จึงได้พิจารณาให้ตำแหน่งต่างๆหรือบริเวณทั้งหมดของคลอโรพลาสต์จีโนมถือเป็นหนึ่งเดียว (Lei *et al.*, 2012) และในการศึกษานี้ได้วิเคราะห์แบบแยกและแบบรวมตำแหน่งที่เป็น INDEL โดยการวิเคราะห์แบบรวมตำแหน่งที่เป็น deletion และ insertion ร่วมด้วยเนื่องจาก Simmon and Ochoterena (2000) ได้อธิบายถึงการเกิด mutation และ INDEL จากส่วนดีเอ็นเอในพลาสต์ (plastid) มีโอกาสเกิดได้เท่าๆกันเนื่องจากวิวัฒนาการของดีเอ็นเอในส่วน plastid เกิดได้ช้า โดยตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องที่วิเคราะห์โดยรวมส่วน intron และ intergenic spacer ของคลอโรพลาสต์จีโนมเข้าด้วยกันและนำ INDEL เข้าร่วมวิเคราะห์ร่วมด้วย ได้แก่ Cheng *et al.* (2005); Artyukova *et al.* (2009); Ramos *et al.* (2009); Kuo *et al.* (2010); Novaes *et al.* (2010); Ribeiro *et al.* (2010); Yuan *et al.* (2011); Li *et al.* (2012)

คำนวณค่าต่างๆที่เกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม DnaSP version 5.10.01 (Librado and Rozas, 2009) ดังต่อไปนี้

- Number of haplotypes คือ จำนวนรูปแบบดีเอ็นเอหรือ haplotype ที่พบทั้งหมด
- Haplotype diversity: h (Nei, 1987) คือ ค่า haplotype ของตัวอย่างใด ๆ ที่มีความแตกต่างกันในกลุ่มประชากร คำนวณได้จากสูตร

$$h = \left(\frac{n}{n-1} \right) \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

เมื่อ n คือ จำนวนตัวอย่าง

k คือ จำนวน haplotypes

p_i คือ ความถี่ของแต่ละ haplotype

- ค่า nucleotide diversity: π (Nei, 1987) คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละคู่ตัวอย่าง คำนวณได้จากสูตร

$$\pi = \left(\frac{1}{m} \right) (\pi^{\wedge})$$

เมื่อ m คือ $[n(n-1)/2]$ n แทนจำนวนตัวอย่าง

$\pi^{\wedge}$ คือ ผลรวมของ จำนวนที่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละคู่ตัวอย่างต่อความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด

- Nucleotide diversity: θ_w (Watterson, 1975) เป็นค่าความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ที่ขึ้นกับจำนวนตำแหน่งที่มี polymorphic ในตัวอย่างทั้งหมด คำนวณได้จากสูตร

$$\theta_w = \left(\frac{S_n}{a_n} \right)$$

เมื่อ S_n คือ สัดส่วนของจำนวนตำแหน่งที่มี polymorphic ต่อจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด

a_n คือ $1+1/2+1/3+...+1/(n-1)$

n คือ จำนวนตัวอย่าง

ทดสอบทฤษฎีความสมดุลทางวิวัฒนาการ “Neutral theory” โดยวิเคราะห์ค่าทางสถิติว่าข้อมูลมีการเบี่ยงเบนไปจากสมดุลมากน้อยเพียงใด ด้วยโปรแกรม DnaSP version 5.10.01 (Librado and Rozas, 2009) ด้วยค่าต่อไปนี้

- Tajima's test (Tajima, 1989) เป็นการทดสอบค่าทางสถิติโดยพิจารณาจากค่า nucleotide diversity ของ π (Nei, 1987) และค่า nucleotide diversity ของ θ_w (Watterson, 1975)
- D^* (Fu and Li, 1993) เป็นการทดสอบค่าทางสถิติโดยพิจารณาจากค่าความแตกต่างระหว่างจำนวนตัวอย่างที่เกิด mutation แบบเดียวเพียงหนึ่งตัวอย่าง (singletons) และจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่เกิด mutation
- F^* (Fu and Li, 1993) เป็นการทดสอบค่าทางสถิติโดยพิจารณาจากค่าความแตกต่างระหว่างจำนวนตัวอย่างที่เกิด mutation แบบเดียวเพียงหนึ่งตัวอย่าง และจำนวนค่าเฉลี่ยของความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่างคู่ตัวอย่าง

วิเคราะห์โครงสร้างของประชากรด้วย AMOVA (Analysis of Molecular Variance Approach) โดยวิเคราะห์ค่า Fixation Index: F_{ST} และเปรียบเทียบค่า F_{ST} ระหว่างคู่ประชากร (pairwise difference) (Excoffier *et al.*, 1992) ด้วยโปรแกรม Arlequin version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) ทั้งแบบรวมข้อมูล INDEL และไม่รวมข้อมูล INDEL

สร้างแผนผัง haplotype ต่างๆลงในประชากร และสร้าง haplotype network ด้วยวิธี median-joining โดยใช้โปรแกรม Network 4.6.0.0 (<http://www.fluxusengineering.com>) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ haplotype ที่พบ โดยมีตัวอย่าง outgroup ได้แก่ *Dalbergia glomeriflora* (เก็ดขาว)

ผลและวิจารณ์

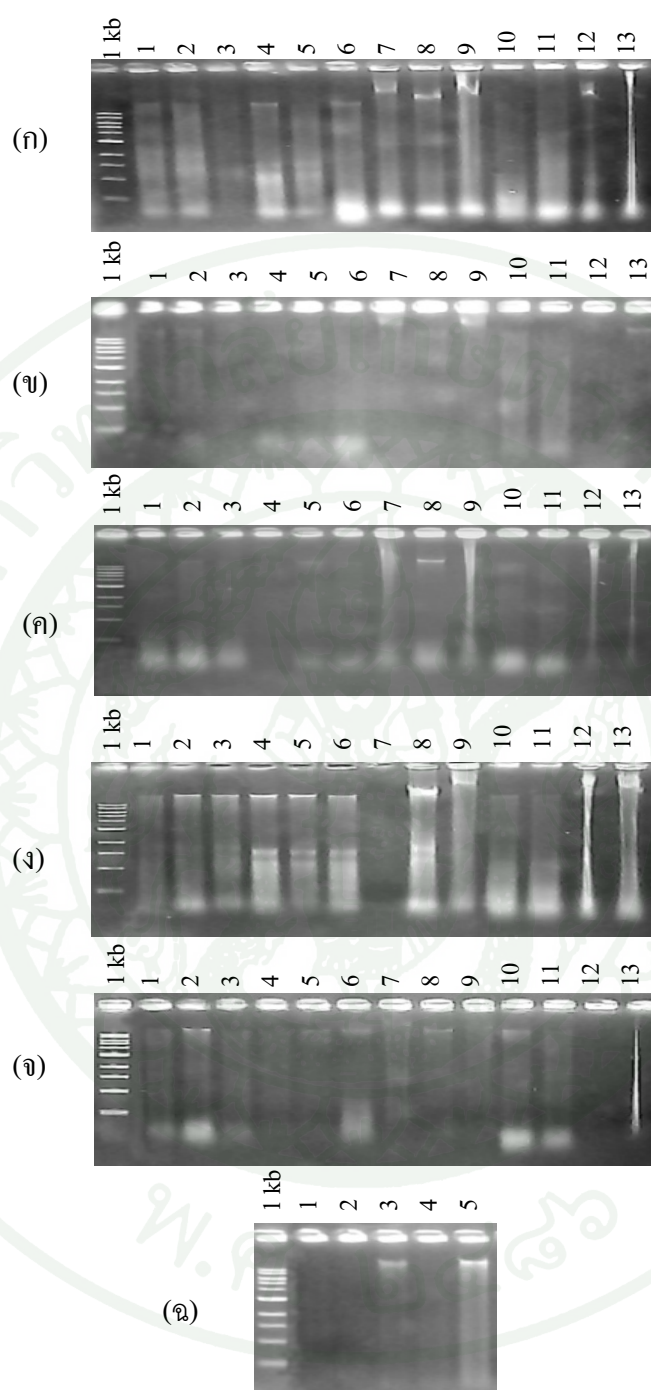
1. การทดสอบวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากส่วนเปลือกไม้ชั้นใน เนื้อไม้ส่วนกระพี้ และใบ ของ ต้นพะยุง

ด้วยปัญหาการสกัดดีเอ็นเอจากไม้พะยุงในปัจจุบัน ซึ่งไม้ส่วนใหญ่มีอยู่ในรูปไม้ท่อน การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากเปลือกไม้และเนื้อไม้ของต้นพะยุงจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อนำดีเอ็นเอที่ได้จากเปลือกและเนื้อไม้ไปใช้ในการตรวจสอบแหล่งที่มาหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของไม้พะยุง ซึ่งลักษณะสารละลายดีเอ็นเอที่มีคุณภาพที่ดีนั้น ไม่ควรมีการปนเปื้อนของสารประกอบต่างๆ เช่น polysaccharide polyphenol และสารทุติยภูมิอื่นๆ โดยคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอที่ดีจะมีโอกาสประสบความสำเร็จในการทำ PCR ได้มาก ซึ่งการทำ PCR ถือเป็นเทคนิคพื้นฐานที่สำคัญที่ใช้ในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม นอกจากนี้ข้อดีของการสกัดดีเอ็นเอจากเปลือกไม้และเนื้อไม้คือ ง่ายต่อการเก็บตัวอย่างกรณีที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างใบถึงหรือเมื่อเกิดโรคระบาดต่างๆจากใบ

ส่วนของต้นพะยุงได้แก่ เปลือกไม้ชั้นใน เนื้อไม้ส่วนกระพี้ และใบสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ทั้งหกวิธี โดยให้ปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอแตกต่างกัน ผลจากการวัดด้วยวิธี electrophoresis แสดงในภาพที่ 6 และผลจากการวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer แสดงในตารางที่ 9 ปริมาณดีเอ็นเอเมื่อวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer มีค่าตั้งแต่ 1.8 ถึง 2387.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) ให้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งแต่ 141.2 ถึง 2387.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนวิธีของ Novaes *et al.* (2009) และวิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) ให้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งแต่ 25 ถึง 627.8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนวิธีที่เหลือคือ วิธีประยุกต์ของ Jobes *et al.* (1995) วิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) และวิธีที่ใช้ชุดสกัด Dneasy Plant minikit (Qiagen) ให้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งแต่ 1.8 ถึง 446.9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร อย่างไรก็ตามปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer อาจไม่สอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ electrophoresis เนื่องจากสารละลายดีเอ็นเอในบางตัวอย่างมีสีน้ำตาล และบางตัวอย่างมีลักษณะเหนียวซึ่งเกิดจากสารทุติยภูมิที่ตกค้างอยู่ นอกจากนี้ยังรวมถึงปัจจัยอื่นๆเช่น การที่มีสาร CTAB ตกค้าง สารเหล่านี้อาจไปรบกวนการวัดค่าดูดกลืนแสงซึ่งทำให้ค่าที่ได้จากเครื่อง spectrophotometer ไม่ถูกต้องทั้งหมด (Drábková *et al.*, 2002) ซึ่งการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอจึงควรทำควบคู่กันไปทั้งการวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer และวัดด้วยวิธี electrophoresis

การวัดความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยทั่วไป สารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์จะมีค่าดูดกลืนแสงที่ A_{260}/A_{280} ประมาณ 1.8 ถ้ามีการปนเปื้อนโปรตีน หรือ phenol ค่า A_{260}/A_{280} จะน้อยกว่า 1.8 หรือถ้ามีการปนเปื้อนของ RNA ค่า A_{260}/A_{280} จะ ประมาณ 2.0 (Sambrook *et al.*, 1989) จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) ให้ปริมาณดีเอ็นเอในระดับสูง แต่เมื่อดูค่าความบริสุทธิ์ A_{260}/A_{280} มีค่าต่ำกว่า 1.8 มาก แสดงถึงการปนเปื้อนโปรตีนในปริมาณที่สูง รวมถึงสีของสารละลายดีเอ็นเอที่ค่อนข้างน้ำตาล ทั้งส่วนของ เปลือกไม้ เนื้อไม้ และใบ ซึ่งแสดงถึงมีการปนเปื้อนของสารประกอบ phenolic ใน ปริมาณสูงเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ แสดงในภาพที่ 6 (ก) สำหรับวิธีของ Novaes *et al.* (2009) ให้ค่า A_{260}/A_{280} ใกล้เคียง 2.0 แสดงได้ว่ามีสารละลายอาร์เอ็นเอปนอยู่ และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis แสดงให้เห็นแถบอาร์เอ็นเอที่อยู่ตรงกลาง gel ได้ชัดเจนดังภาพที่ 6 (ง) นอกจากนี้ ยังพบว่าสีของสารละลายดีเอ็นเอในส่วนของเปลือกไม้ยังคงเป็นสีน้ำตาลอยู่ แสดงได้ว่ามีการ ปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลิกหลงเหลืออยู่ ส่วนวิธีประยุกต์ของ Jobes *et al.* (1995) และวิธี ประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) ให้ค่าความบริสุทธิ์ A_{260}/A_{280} ส่วนใหญ่ต่ำกว่า 1.8 แสดงถึง คุณภาพดีเอ็นเอที่ไม่บริสุทธิ์เช่นกัน รวมถึงสีของสารละลายดีเอ็นเอมีสีเหลืองและสีน้ำตาลหลง เหลืออยู่ในบางตัวอย่าง ส่วนวิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) และวิธีที่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Dneasy Plant minikit (Qiagen) ให้สีของสารละลายดีเอ็นเอสีทุกตัวอย่าง แสดงว่าไม่มี สารประกอบฟีนอลิกหลงเหลืออยู่ อย่างไรก็ตาม 2 วิธีดังกล่าวให้ปริมาณดีเอ็นเอที่ค่อนข้างน้อยเมื่อ เปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของสารละลายดีเอ็นเอจากส่วนต่างๆที่ใช้สกัด พบว่าสารละลาย ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส่วนใบทั้งในสภาพที่เก็บในสารดูดความชื้นและเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส มี ความเหนียวและเป็นวุ้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวพบทุกวิธีที่สกัดจากตัวอย่างใบ แสดงให้เห็นว่าใบ พะยูนมีปริมาณสาร polysaccharide ค่อนข้างสูง สาร polysaccharide เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยเห็นได้จากการที่มีสารละลายดีเอ็นเอตกค้างอยู่ภายในหลุมด้านบนของ gel เมื่อเมื่อตรวจสอบ ด้วยวิธี electrophoresis โดยโมเลกุลเหล่านี้ไปเกาะกับดีเอ็นเอแล้วทำให้ไม่สามารถเคลื่อนตัวผ่าน gel ได้แสดงดังภาพที่ 6 ในตัวอย่างที่ 7 8 9 12 และ 13 ของทุกวิธี ยกเว้นวิธีที่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Dneasy Plant minikit (Qiagen) ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับที่ Ribeiro and Lovato (2007) กล่าวว่าใบไม้ ในสกุลพะยูน มีปริมาณสารทุติยภูมิในปริมาณสูงจึงทำให้สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มีลักษณะเป็น เมือกเหนียว ส่วนสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเปลือกไม้และเนื้อไม้ นั้นไม่มีลักษณะ เหนียว ซึ่งถือเป็นข้อดีที่สามารถนำไปใช้แทนใบจากต้นพะยูนได้



ภาพที่ 6 ปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอของตัวอย่างจากต้นพะยูนเมื่อสกัดด้วยวิธีต่างๆ
 วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) (ก) วิธีประยุกต์ของ Jobes *et al.* (1995) (ข)
 วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) (ค) วิธีของ Novaes *et al.* (2009) (ง)
 วิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) (จ) และวิธีตามแบบ Dneasy Plant minikit (Qiagen)
 (ฉ) โดยหมายเลขด้านบนบนแท่นส่วนต่างๆของพะยูนที่ใช้ทดสอบเรียงตามตารางที่ 2

ตารางที่ 9 ปริมาณและคุณภาพสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีต่างๆของตัวอย่างจากส่วนต่างๆของต้นพะยูน

วิธีสกัดดีเอ็นเอ	รูปแบบการเก็บตัวอย่าง	ส่วนที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/μl)	คุณภาพดีเอ็นเอ A260/A280	สี *	ผลการทำ PCR			
						<i>trnL</i> intron (600 bp)	<i>ITS</i> (700bp)	<i>trnC-ycf6</i> (1,000bp)	<i>trnT-trnL</i> (1,300bp)
วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990)	silica gel	(1) เปลือกไม้1	1363.2	0.91	3	/	/	/	-
	silica gel	(2) เปลือกไม้2	1223.3	1.15	3	/	/	/	-
	silica gel	(3) เปลือกไม้3	266.7	1.17	2	/	/	/	/
	silica gel	(4) เนื้อไม้1	352	1.92	0	/	/	/	/
	silica gel	(5) เนื้อไม้2	298.9	1.45	1	/	/	/	-
	silica gel	(6) เนื้อไม้3	921.6	0.94	2	/	/	/	-
	silica gel	(7) ใบ1	366.7	1.65	2	/	/	/	-
	silica gel	(8) ใบ2	386.4	1.55	2	/	/	/	-
	silica gel	(9) ใบ3	456.2	1.83	1	/	/	/	/
	อุณหภูมิห้อง	(10) เปลือกไม้4	1341.9	1.22	3	/	-	-	-
	อุณหภูมิห้อง	(11) เปลือกไม้5	2387.5	0.85	3	/	-	-	-
	-20°C	(12) ใบ6	141.2	1.77	0	/	/	/	/
	-20°C	(13) ใบ7	274.8	1.82	0	/	/	/	/

ตารางที่ 9 (ต่อ)

วิธีสกัดดีเอ็นเอ	รูปแบบการเก็บตัวอย่าง	ส่วนที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/μl)	คุณภาพดีเอ็นเอ A260/A280	ผลการทำ PCR				
						<i>trnL</i> intron (600 bp)	<i>ITS</i> (700bp)	<i>trnC-ycf6</i> (1,000bp)	<i>trnT-trnL</i> (1,300bp)
วิธีประยุกต์ของ Jobes <i>et al.</i> (1995)	silica gel	(1) เปลือกไม้1	64.4	1	0	/	/	-	-
	silica gel	(2) เปลือกไม้2	27.4	1.21	0	/	/	/	-
	silica gel	(3) เปลือกไม้3	14.1	1.07	0	/	/	/	/
	silica gel	(4) เนื้อไม้1	52.3	1.75	0	/	/	/	-
	silica gel	(5) เนื้อไม้2	43.3	1.8	0	/	/	/	-
	silica gel	(6) เนื้อไม้3	162.9	1.64	0	/	/	/	-
	silica gel	(7) ใบ1	16.9	1.55	0	/	/	/	/
	silica gel	(8) ใบ2	8.2	1.58	0	/	/	/	/
	silica gel	(9) ใบ3	23.9	1.67	0	/	/	/	/
	อุณหภูมิห้อง	(10) เปลือกไม้4	118.7	1.36	1	/	/	/	-
	อุณหภูมิห้อง	(11) เปลือกไม้5	81.1	1.16	0	/	-	/	-
	-20°C	(12) ใบ6	1.8	1.02	0	/	/	/	/
	-20°C	(13) ใบ7	7.1	1.36	0	/	/	/	/

ตารางที่ 9 (ต่อ)

วิธีสกัดดีเอ็นเอ	รูปแบบการเก็บตัวอย่าง	ส่วนที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/μl)	คุณภาพดีเอ็นเอ A260/A280	ผล	ผลการทำ PCR			
						<i>trnL</i> intron (600 bp)	<i>ITS</i> (700bp)	<i>trnC-ycf6</i> (1,000bp)	<i>trnT-trnL</i> (1,300bp)
วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996)	silica gel	(1) เปลือกไม้1	382	1.58	1	-	-	-	-
	silica gel	(2) เปลือกไม้2	409.7	1.68	1	/	/	/	-
	silica gel	(3) เปลือกไม้3	269.5	1.5	1	/	/	/	/
	silica gel	(4) เนื้อไม้1	67.7	0.89	0	/	/	/	/
	silica gel	(5) เนื้อไม้2	133.8	1.43	0	/	/	/	-
	silica gel	(6) เนื้อไม้3	139.4	1.32	0	/	/	/	/
	silica gel	(7) ใบ1	269.4	1.8	0	/	/	/	/
	silica gel	(8) ใบ2	256.7	1.95	0	/	/	/	/
	silica gel	(9) ใบ3	279.1	1.81	0	/	/	/	/
	อุณหภูมิห้อง	(10) เปลือกไม้4	594.9	1.6	2	/	-	/	-
	อุณหภูมิห้อง	(11) เปลือกไม้5	627.8	1.21	2	/	-	-	-
	-20°C	(12) ใบ6	107.8	1.75	0	/	/	/	/
	-20°C	(13) ใบ7	118.4	1.8	0	/	/	/	/

ตารางที่ 9 (ต่อ)

วิธีสกัดดีเอ็นเอ	รูปแบบการเก็บตัวอย่าง	ส่วนที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/μl)	คุณภาพดีเอ็นเอ A260/A280	ค่า λ *	ผลการทำ PCR			
						<i>trnL</i> intron (600 bp)	<i>ITS</i> (700bp)	<i>trnC-ycf6</i> (1,000bp)	<i>trnT-trnL</i> (1,300bp)
วิธีของ Novaes <i>et al.</i> (2009)	silica gel	(1) เปลือกไม้1	330.7	1.83	2	-	/	-	-
	silica gel	(2) เปลือกไม้2	500.4	1.94	2	/	/	/	-
	silica gel	(3) เปลือกไม้3	445.1	1.59	2	/	/	/	-
	silica gel	(4) เนื้อไม้1	335.6	1.93	0	/	/	/	/
	silica gel	(5) เนื้อไม้2	185.3	2.03	0	/	/	/	/
	silica gel	(6) เนื้อไม้3	331.7	1.9	0	/	/	/	/
	silica gel	(7) ใบ1	25.3	1.21	0	/	/	-	-
	silica gel	(8) ใบ2	441.4	2.01	0	/	/	/	/
	silica gel	(9) ใบ3	427.2	2.01	0	/	/	/	/
	อุณหภูมิห้อง	(10) เปลือกไม้4	495.3	1.66	2	/	/	-	-
	อุณหภูมิห้อง	(11) เปลือกไม้5	498.3	1.67	2	/	/	-	-
	-20°C	(12) ใบ6	524.1	1.73	0	/	/	/	/
	-20°C	(13) ใบ7	271.8	1.89	0	/	/	/	/

ตารางที่ 9 (ต่อ)

วิธีสกัดดีเอ็นเอ	รูปแบบการเก็บตัวอย่าง	ส่วนที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/μl)	คุณภาพดีเอ็นเอ A260/A280	ผล*	ผลการทำ PCR			
						<i>trnL</i> intron (600 bp)	<i>ITS</i> (700bp)	<i>trnC-ycf6</i> (1,000bp)	<i>trnT-trnL</i> (1,300bp)
วิธีประยุกต์ของ Sharma <i>et al.</i> (2002)	silica gel	(1) เปลือกไม้1	118.6	1.09	0	/	/	/	/
	silica gel	(2) เปลือกไม้2	236.5	1.48	0	/	/	/	/
	silica gel	(3) เปลือกไม้3	94.9	1.02	0	/	/	/	/
	silica gel	(4) เนื้อไม้1	16.7	1.44	0	/	/	/	/
	silica gel	(5) เนื้อไม้2	12.9	1.66	0	/	/	/	/
	silica gel	(6) เนื้อไม้3	76.7	1.8	0	/	/	/	/
	silica gel	(7) ใบ1	21.5	1.64	0	/	/	/	/
	silica gel	(8) ใบ2	16.7	1.65	0	/	/	/	/
	silica gel	(9) ใบ3	21.3	1.49	0	/	/	/	/
	อุณหภูมิห้อง	(10) เปลือกไม้4	446.9	1.53	0	/	/	/	/
	อุณหภูมิห้อง	(11) เปลือกไม้5	315.1	1.04	0	/	/	/	/
	-20°C	(12) ใบ6	4.9	1.29	0	/	/	/	/
	-20°C	(13) ใบ7	35.6	1.73	0	/	/	/	/

ตารางที่ 9 (ต่อ)

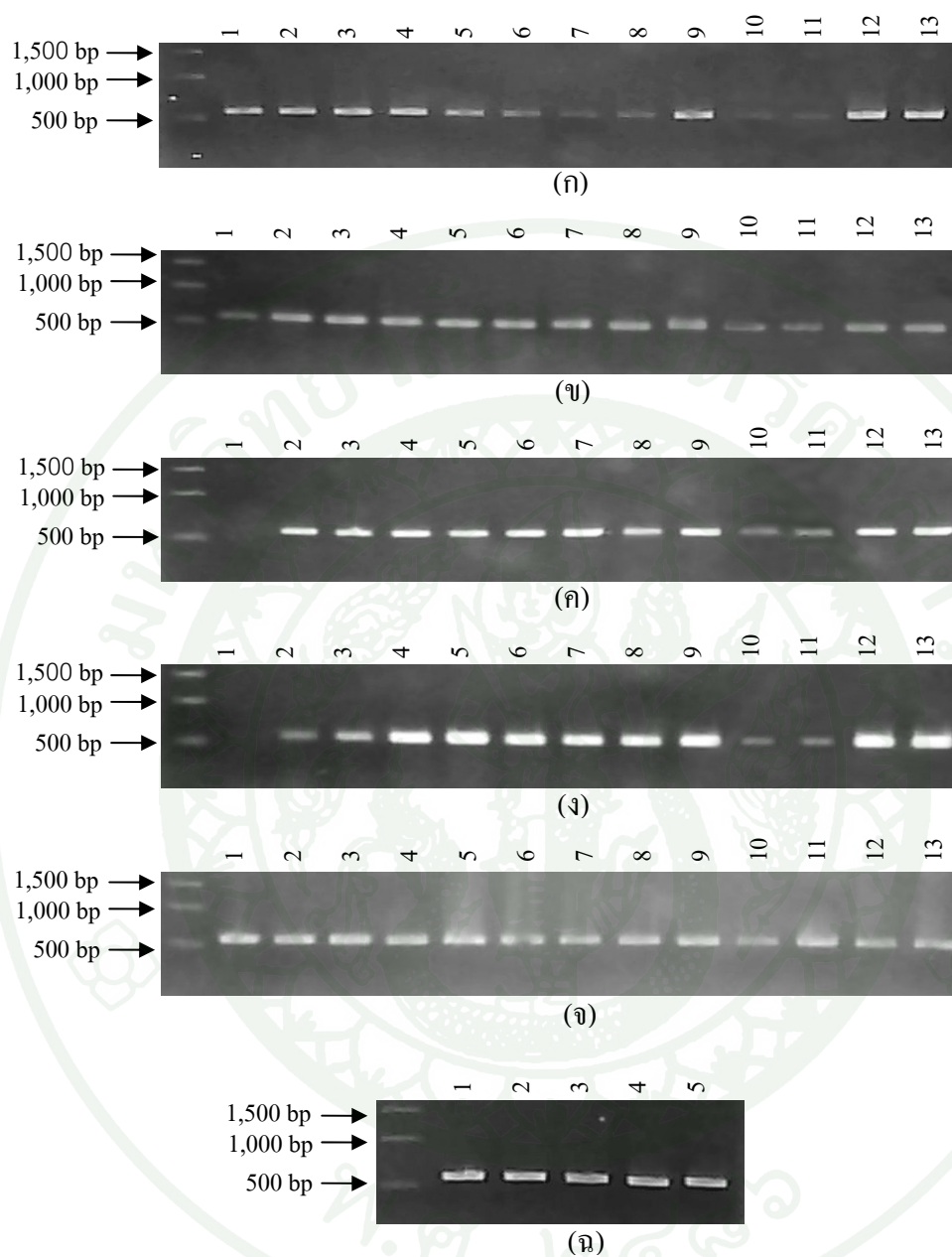
วิธีสกัดดีเอ็นเอ	รูปแบบการเก็บตัวอย่าง	ส่วนที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ	คุณภาพดีเอ็นเอ A260/A280	สี *	ผลการทำ PCR			
						<i>trnL</i> intron (600 bp)	<i>ITS</i> (700bp)	<i>trnC-ycf6</i> (1,000bp)	<i>trnT-trnL</i> (1,300bp)
QIAGEN KIT	silica gel	(1) เปลือกไม้1	28.9	1.55	0	/	/	/	/
	silica gel	(2) เนื้อไม้1	11.6	1.4	0	/	/	/	/
	silica gel	(2) ใบ1	25.9	1.64	0	/	/	/	/
	อุณหภูมิห้อง	(4) เปลือกไม้4	27.2	1.48	0	/	/	/	/
	-20°C	(5) ใบ6	86.6	1.75	0	/	/	/	/

หมายเหตุ * สีของสารละลายดีเอ็นเอ 0 = สีใส 1 = สีเหลือง 2 = สีน้ำตาลอ่อน 3 = สีน้ำตาลเข้ม

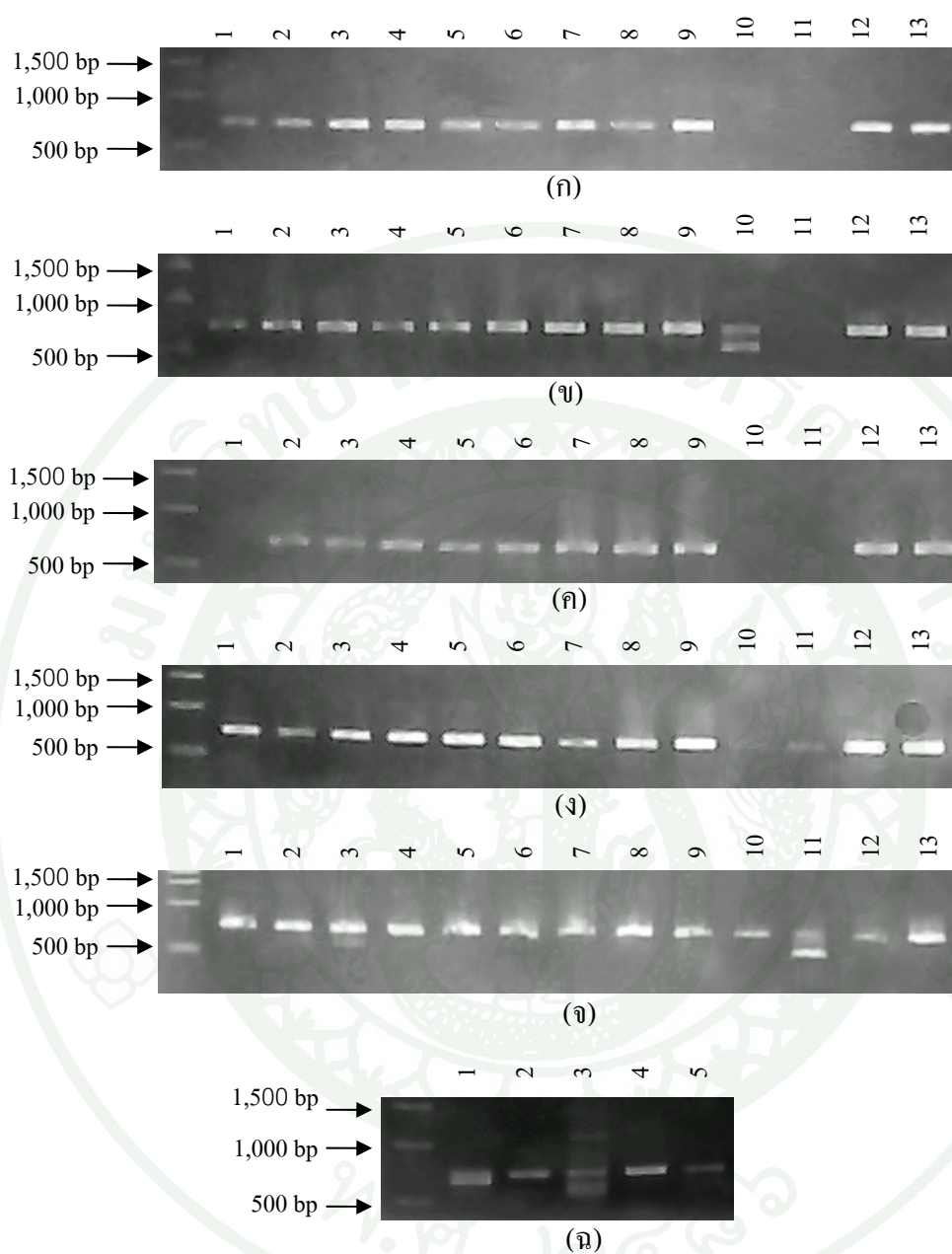
การทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เป็นวิธีวัดความสำเร็จของการสกัดดีเอ็นเอที่สำคัญ ผลการทำ PCR จากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมจำนวนสามส่วนและจากนิวเคลียร์จีโนมจำนวนหนึ่งส่วน สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งในส่วนคลอโรพลาสต์และนิวเคลียร์จีโนม ซึ่งความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างและในแต่ละวิธีสกัดแสดงดังภาพที่ 7-10 และตารางที่ 9

ผลการทดสอบพบว่าการทำ PCR ขนาดเล็กสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่ายกว่าการทำ PCR ขนาดใหญ่ โดยสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่ายกว่าส่วนของเปลือกไม้และเนื้อไม้ การที่ส่วนเปลือกไม้และเนื้อไม้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ยากกว่านั้นเนื่องมาจากคุณสมบัติของเปลือกและเนื้อไม้มีการสะสมของสารที่เป็นตัวยับยั้ง (inhibitors) ในปฏิกิริยาการทำ PCR เช่น คาร์โบไฮเดรตจากเซลลูโลส หรือฟีนอลจากลิกนิน (Andrew, 2007) โดยเฉพาะตัวอย่างเปลือกไม้ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องลักษณะตัวอย่างนี้เปรียบได้กับตัวอย่างไม้ที่ไม่มีชีวิต ซึ่งมีการสลายของดีเอ็นเอเป็นชิ้นเล็ก ๆ อยู่ตลอด (Deguilloux *et al.*, 2002) จึงทำให้โอกาสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ยิ่งทำได้ยากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละวิธีพบว่าวิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) และวิธีที่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Dneasy Plant minikit (Qiagen) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างคิดเป็น 100% ส่วนวิธีอื่นๆสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้คิดเป็นสัดส่วนต่างๆดังนี้ วิธีประยุกต์ของ Jobes *et al.* (1995) คิดเป็น 82.7% วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) และวิธีของ Novaes *et al.* (2009) คิดเป็น 78.8% และวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) คิดเป็น 76.9%

ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าวิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) มีความเหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชมะเขือเทศเนื่องจากประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างรวมถึงตัวอย่างที่อยู่ในสภาพไม้ท่อนหรือตัวอย่างไม้ที่ไม่มีชีวิต ส่วนวิธีที่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Dneasy Plant minikit (Qiagen) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลาสั้นและมีวิธีการไม่ยุ่งยาก ให้ผลที่มีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง



ภาพที่ 7 ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *trnL* intron ของดีเอ็นเอจากต้นพะยูนในแต่ละตัวอย่างที่ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอแตกต่างกันดังนี้
 วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) (ก) วิธีประยุกต์ของ Jobes *et al.* (1995) (ข)
 วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) (ค) วิธีของ Novaes *et al.* (2009) (ง)
 วิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) (จ) และวิธีตามแบบ Dneasy Plant minikit (Qiagen) (ฉ) โดยที่หมายเลขด้านบนแทนส่วนต่างๆของพะยูนที่ใช้ทดสอบเรียงตามตารางที่ 2



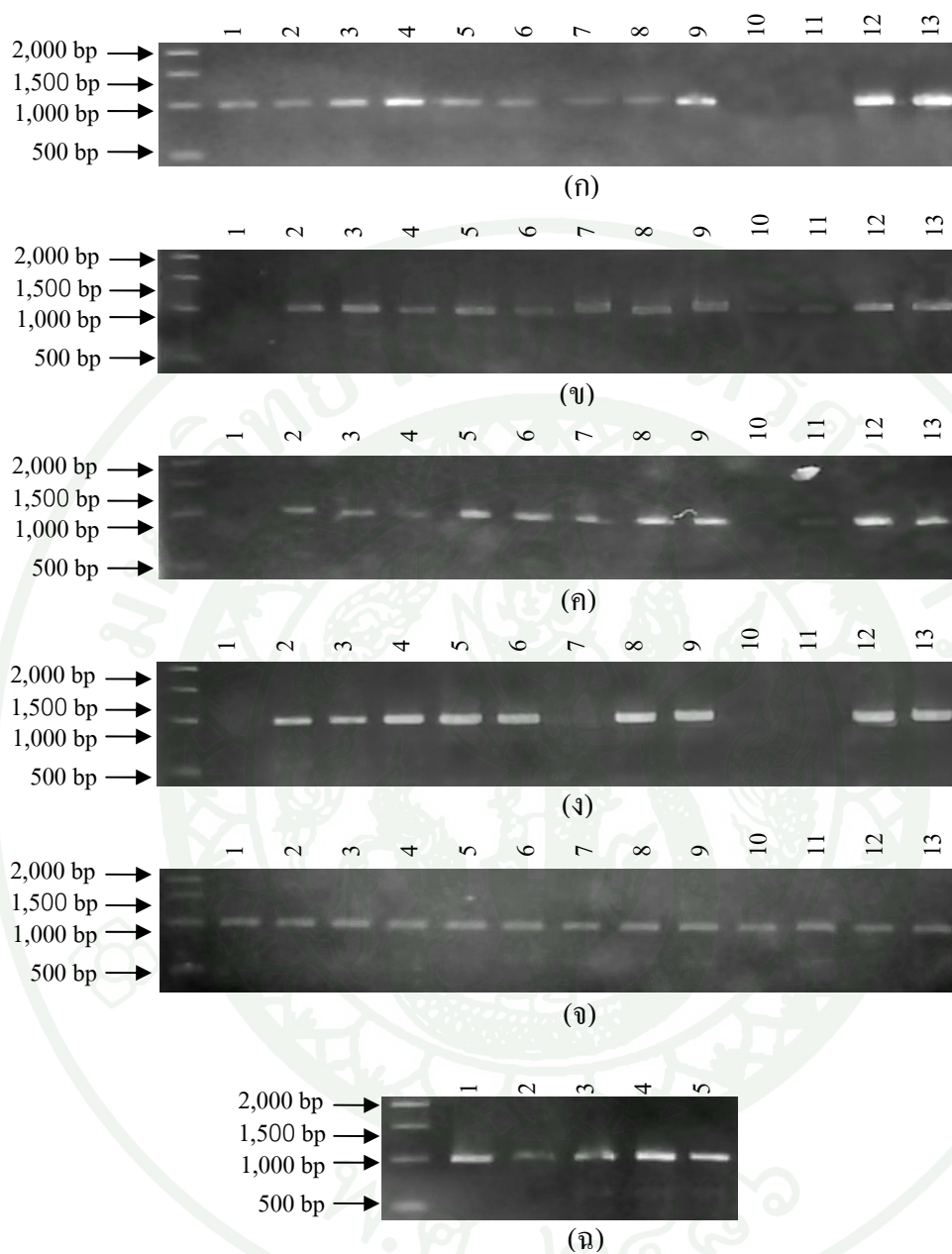
ภาพที่ 8 ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *ITS* ของดีเอ็นเอจากต้นพะยูนในแต่ละตัวอย่างที่ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอแตกต่างกันดังนี้

วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) (ก) วิธีประยุกต์ของ Jobes *et al.* (1995) (ข)

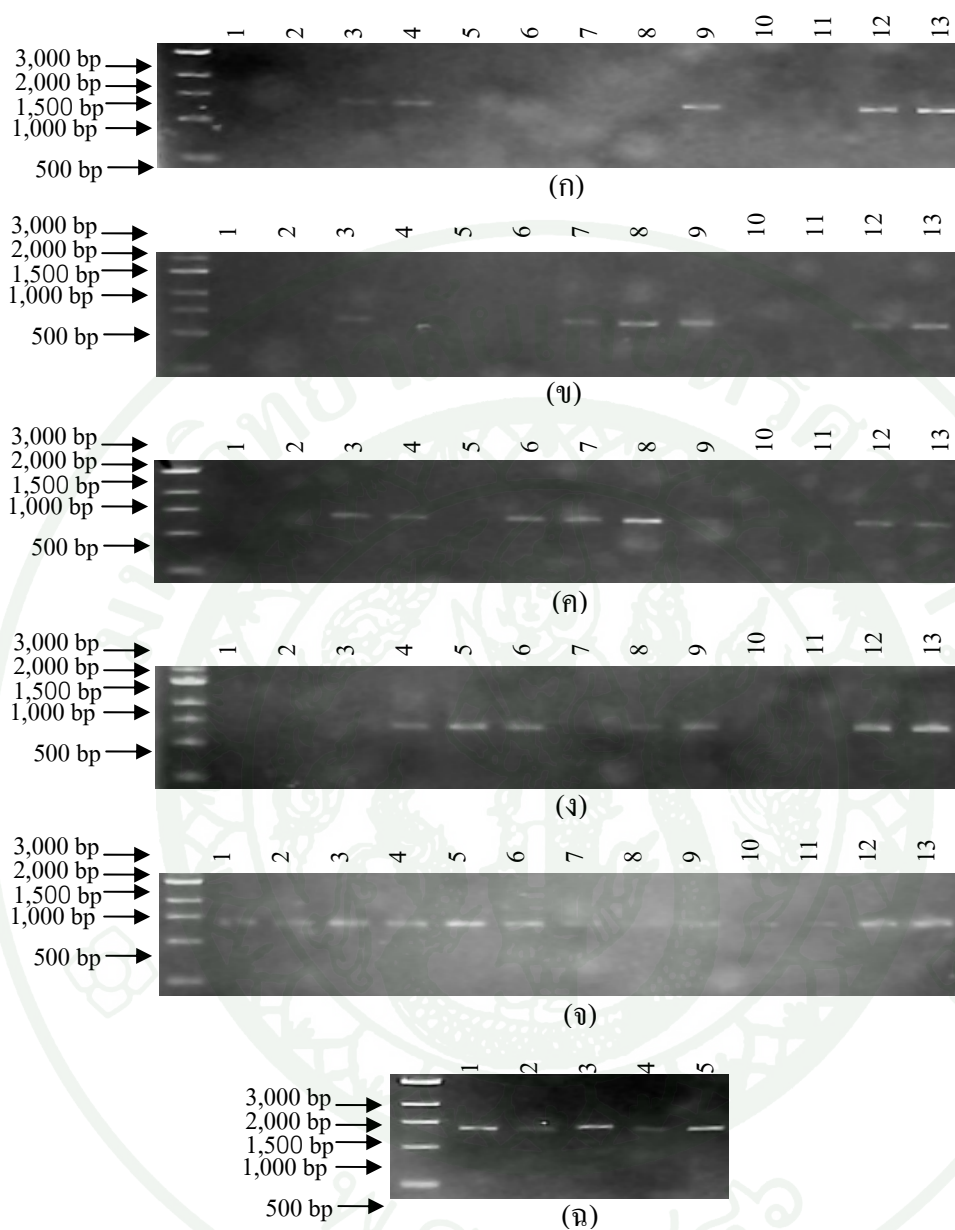
วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) (ค) วิธีของ Novaes *et al.* (2009) (ง)

วิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) (จ) และวิธีตามแบบ Dneasy Plant minikit

(Qiagen) (ฉ) โดยที่หมายเลขด้านบนแทนส่วนต่างๆของพะยูนที่ใช้ทดสอบเรียงตามตารางที่ 2



ภาพที่ 9 ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *trnC-ycf6* ของดีเอ็นเอจากต้นพะยูนในแต่ละตัวอย่างที่ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอแตกต่างกันดังนี้
 วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) (ก) วิธีประยุกต์ของ Jobes *et al.* (1995) (ข)
 วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) (ค) วิธีของ Novaes *et al.* (2009) (ง)
 วิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) (จ) และวิธีตามแบบ Dneasy Plant minikit (Qiagen) (ฉ) โดยที่หมายเลขด้านบนแทนส่วนต่างๆของพะยูนที่ใช้ทดสอบเรียงตามตารางที่ 2



ภาพที่ 10 ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *trnT-trnL* ของดีเอ็นเอจากต้นพะยูนในแต่ละตัวอย่างที่ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอแตกต่างกันดังนี้

วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) (ก) วิธีประยุกต์ของ Jobes *et al.* (1995) (ข)

วิธีประยุกต์ของ Scott and Playford (1996) (ค) วิธีของ Novaes *et al.* (2009) (ง)

วิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) (จ) และวิธีตามแบบ Dneasy Plant minikit

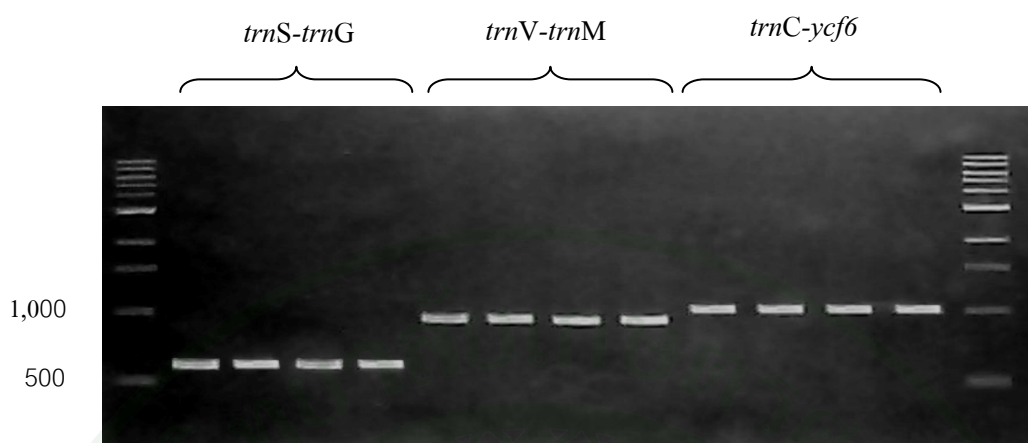
(Qiagen) (ฉ) โดยที่หมายเลขด้านบนแทนส่วนต่างๆของพะยูนที่ใช้ทดสอบเรียงตามตารางที่ 2

2. ความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยูน

การศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยูนโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมที่เป็น intron และ intergenic spacer ซึ่งคัดเลือกส่วนที่ใช้ศึกษาทั้งหมด 8 ส่วนที่เป็น universal ได้แก่ *trnL* intron *trnL-trnF* *psbB-psbF* *trnS-trnG* *psbA-trnH* *rpl32-ndhF* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการทำ PCR โดยมีขนาดแตกต่างกันดังตารางที่ 10 และผลที่ได้จากการทดสอบและวิเคราะห์พบว่ามีส่วนที่มีความผันแปร 3 ส่วน ได้แก่ส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* โดยผลการทำ PCR จาก 3 ส่วนดังกล่าวแสดงดังภาพที่ 11

ตารางที่ 10 ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากส่วนต่างๆของคลอโรพลาสต์จีโนมที่ใช้ศึกษาในไม้พะยูน

ส่วนที่ใช้ศึกษา	ขนาด (คู่เบส)
<i>trnL</i> intron	580
<i>trnL-trnF</i> spacer	450
<i>psbB-psbF</i> spacer	830
<i>trnS-trnG</i> spacer	600
<i>psbA-trnH</i> spacer	450
<i>rpl32-ndhF</i> spacer	900
<i>trnV-trnM</i> spacer	900
<i>trnC-ycf6</i> spacer	1,000



ภาพที่ 11 ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากส่วนต่างๆของคลอโรพลาสต์จีโนม ได้แก่ส่วน *trnS-trnG* ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ส่วน *trnV-trnM* ขนาดประมาณ 900 คู่เบส และส่วน *trnC-ycf6* ขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส จากตัวอย่างของไม้พะยุง

2.1 ความผันแปรของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6*

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากคลอโรพลาสต์จีโนมจำนวน 3 ส่วน ได้แก่ *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* ซึ่งตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน primer และส่วนที่ติดกับ primer ที่ไม่มีความชัดเจนออก โดยใช้ตัวอย่างพะยุงศึกษาทั้งหมด 108 ตัวอย่าง รวม 10 ประชากร ตำแหน่งต่างๆของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละส่วนที่มีความผันแปรเป็นดังนี้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน *trnS-trnG* มีความยาวรวม 469 นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่มีความผันแปรรวม 3 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นตำแหน่ง SNP ทั้งหมดดังนี้ ตำแหน่งที่ 136 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก T เป็น G (transversion) ตำแหน่งที่ 387 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก T เป็น C (transition) และตำแหน่งที่ 412 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น A (transition) แสดงดังตารางที่ 11 ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ข

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน *trnV-trnM* มีความยาวรวม 653-664 นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่มีความผันแปรรวม 3 ตำแหน่ง โดยเป็น SNP 1 ตำแหน่งและส่วนที่เป็น INDEL 2 ตำแหน่ง ตำแหน่ง SNP 1 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 621 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก

A เป็น C (transversion) และส่วนที่เป็น INDEL 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งแรกได้แก่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 128 ถึง 133 มี INDEL รวม 6 นิวคลีโอไทด์ และตำแหน่งที่สองได้แก่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 258 ถึง 262 มี INDEL รวม 5 นิวคลีโอไทด์ แสดงดังตารางที่ 12 ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ข

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน *trnC-ycf6* มีความยาวรวม 708 นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่มีความผันแปรรวม 4 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นตำแหน่ง SNP ทั้งหมด ได้แก่ ตำแหน่งที่ 206 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก T เป็น G (transversion) ตำแหน่งที่ 390 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก T เป็น G (transversion) ตำแหน่งที่ 701 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T (transition) และตำแหน่งที่ 702 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก T เป็น G (transversion) แสดงดังตารางที่ 13 ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ข

เมื่อวิเคราะห์รวมลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน มีความยาวรวม 1,830-1,841 นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่มีความผันแปรรวม 10 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่ง SNP 8 ตำแหน่ง และตำแหน่ง INDEL 2 ตำแหน่ง โดยส่วนที่มีความผันแปรสูงสุดได้แก่ *trnC-ycf6* แสดงดังตารางที่ 14 สำหรับตำแหน่ง SNP ทั้งหมดพบว่าเป็นแบบ transition รวม 3 ตำแหน่ง และเป็นแบบ transversion รวม 5 ตำแหน่ง ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นแบบ transversion มีจำนวนมากกว่าแบบ transition เนื่องจากในคลอโรพลาสต์จีโนมมีสัดส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ AT ที่สูงกว่า CG (Kelchner, 2000)

ตารางที่ 11 Haplotype ของส่วน *trnS-trnG* ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปร และการปรากฏในแต่ละประชากรของไม้พะยุง

haplotype	SNP	SNP	SNP	ประชากร										
	1	3	4											
	3	8	1											
	6	7	2	MS	TB	DU	PM	PS	KM	NM	PC	VK	VL	รวม
hSG1	T	T	G	8	11	10	6	11	10	11	12	10	10	99
hSG2	G	T	G	-	-	-	5	-	1	-	-	-	-	6
hSG3	T	C	G	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
hSG4	T	C	A	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
รวม				10	11	10	11	11	11	12	12	10	10	108

ตารางที่ 12 Haplotype ของส่วน *trnV-trnM* ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปร และการปรากฏในแต่ละประชากรของไม้พะยุง

haplotype	Indel	Indel	SNP	ประชากร										
	1	2	6											
	2	5	2											
	8	8	1	MS	TB	DU	PM	PS	KM	NM	PC	VK	VL	รวม
hVM1	a	b	A	2	6	10	11	11	9	7	12	10	10	88
hVM2	a	b	C	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
hVM3	0	0	A	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
hVM4	0	b	A	-	5	-	-	-	-	5	-	-	-	10
รวม				10	11	10	11	11	11	12	12	10	10	108

หมายเหตุ 0 แทนการเกิด INDEL โดยไม่ปรากฏลำดับนิวคลีโอไทด์

a แทนการเกิด INDEL โดยปรากฏลำดับนิวคลีโอไทด์ ACAATC

b แทนการเกิด INDEL โดยปรากฏลำดับนิวคลีโอไทด์ AGTAT

ตารางที่ 13 Haplotype ของส่วน *trnC-ycf6* ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปร และการปรากฏในแต่ละประชากรของไม้พะยุง

haplotype	SNP	SNP	SNP	SNP	ประชากร										
	2	3	7	7											
	0	9	0	0											
	6	0	1	2	MS	TB	DU	PM	PS	KM	NM	PC	VK	VL	รวม
hCN1	T	T	C	T	10	7	5	11	11	11	6	9	6	10	86
hCN2	T	G	C	T	-	4	-	-	-	-	5	-	-	-	9
hCN3	G	T	C	T	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
hCN4	T	T	C	G	-	-	5	-	-	-	-	-	4	-	9
hCN5	T	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	3
รวม					10	11	10	11	11	11	12	12	10	10	108

ตารางที่ 14 Haplotype ที่ได้จากการวิเคราะห์ร่วมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปร และการปรากฏในแต่ละประชากรของไม้พะยูน

haplotype	trnS-trnG			trnV-trnM			trnC-petN1R				ประชากร										
	SNP	SNP	SNP	InDel	InDel	SNP	SNP	SNP	SNP												
	1	3	4	1	2	6	2	3	7	7											
	3	8	1	2	5	2	0	9	0	0											
	6	7	2	8	8	1	6	0	1	2	MS	TB	DU	PM	PS	KM	NM	PC	VK	VL	รวม
H1	T	T	G	a	b	A	T	T	C	T	-	6	5	6	11	8	5	9	6	10	66
H2	G	T	G	a	b	A	T	T	C	T	-	-	-	5	-	1	-	-	-	-	6
H3	T	C	G	a	b	A	T	T	C	T	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
H4	T	C	A	a	b	A	T	T	C	T	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
H5	T	T	G	0	0	A	T	T	C	T	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
H6	T	T	G	0	b	A	T	G	C	T	-	4	-	-	-	-	5	-	-	-	9
H7	T	T	G	0	b	A	T	T	C	T	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H8	T	T	G	a	b	A	G	T	C	T	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
H9	T	T	G	a	b	A	T	T	C	G	-	-	5	-	-	-	-	-	4	-	9
H10	T	T	G	a	b	C	T	T	C	T	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
H11	T	T	G	a	b	A	T	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	3
รวม											10	11	10	11	11	11	12	12	10	10	108

หมายเหตุ 0 แทนการเกิด INDEL โดยไม่ปรากฏลำดับนิวคลีโอไทด์

a แทนการเกิด INDEL โดยปรากฏลำดับนิวคลีโอไทด์ ACAATC และ b แทนการเกิด INDEL โดยปรากฏลำดับนิวคลีโอไทด์ AGTAT

2.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยค่า haplotype diversity (h) และค่า nucleotide diversity (π) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์จีโนมส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* และที่รวมลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกันเป็นดังนี้

เมื่อวิเคราะห์ด้วยส่วน *trnS-trnG* ค่า h และค่า π ในแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 0-0.545 และ 0-0.00116 ตามลำดับ และวิเคราะห์รวมทุกตัวอย่างมีค่า 0.158 และ 0.00038 ตามลำดับ ประชากรที่มีค่า h และค่า π สูงสุดได้แก่ อุทยานแห่งชาติภูผาทีบ จ.มุกดาหาร (PM) แสดงดังตารางที่ 15

เมื่อวิเคราะห์ด้วยส่วน *trnV-trnM* ค่า h และค่า π ในแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 0-0.545 และ 0-0.00049 ตามลำดับ และวิเคราะห์รวมทุกตัวอย่างมีค่า 0.325 และ 0.00006 ตามลำดับ ประชากรที่มีค่า h สูงสุดได้แก่ ได้แก่ อุทยานแห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์ (TB) และประชากรที่มีค่า π สูงสุดได้แก่ ป่าโคกข่าว จ.มหาสารคาม (KM) แสดงดังตารางที่ 15

เมื่อวิเคราะห์ด้วยส่วน *trnC-ycf6* ค่า h และค่า π ในแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 0-0.621 และ 0-0.00099 ตามลำดับ และวิเคราะห์รวมทุกตัวอย่างมีค่า 0.354 และ 0.00054 ตามลำดับ ประชากรที่มีค่า h และค่า π สูงสุดได้แก่ ป่าโคกคงเค็ง อ.นาคูน จ.มหาสารคาม (NM) แสดงดังตารางที่ 15

เมื่อวิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน ค่า h และค่า π ในแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 0-0.697 และ 0-0.00056 ตามลำดับ และวิเคราะห์รวมทุกตัวอย่างมีค่า 0.608 และ 0.00033 ตามลำดับ ประชากรที่มีค่า h และค่า π สูงสุดได้แก่ ป่าโคกคงเค็ง อ.นาคูน จ.มหาสารคาม (NM) รองลงมาได้แก่ ป่าดงนาทาม จ.อุบลราชธานี (DU) และอุทยานแห่งชาติภูผาทีบ จ.มุกดาหาร (PM) รองลงมาอีกได้แก่ สวนป่า สถานีวนวัฒนวิจัย จ.กำแพงเพชร (VK) อุทยานแห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์ (TB) ป่าโคกข่าว จ.มหาสารคาม (KM) อุทยานแห่งชาติภูแลนคา จ.ชัยภูมิ (PC) และ อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) ตามลำดับ ส่วนประชากรที่มีค่า h และค่า π เป็น 0 ได้แก่ เวียงจันทน์ ประเทศลาว (VL) และอุทยานแห่งชาติภูผาเหล็ก จ.สกลนคร (PS)

ตารางที่ 15 จำนวน haplotype (nh) ค่า haplotype diversity (h) ค่า nucleotide diversity (π และ θ_w) และค่าที่ได้จากการทดสอบสมมติฐานทางวิวัฒนาการ (Neutrality Tests) ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมจากส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* ของไม้พะยูน

ส่วน	ประชากร	nh	h	π	θ_w	Neutrality Tests		
						D	D*	F*
<i>trnS-trnG</i>	MS	2	0.356	0.00076	0.00075	0.015 ^{ns}	0.804 ^{ns}	0.684 ^{ns}
	TB	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	DU	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	PM	2	0.545	0.00116	0.00073	1.443 ^{ns}	0.776 ^{ns}	1.049 ^{ns}
	PS	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	KM	2	0.182	0.00039	0.00073	-1.129 ^{ns}	-1.289 ^{ns}	-1.399 ^{ns}
	NM	2	0.167	0.00071	0.00141	-1.451 ^{ns}	-1.720 ^{ns}	-1.865 ^{ns}
	PC	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	VK	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	VL	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	รวม	4	0.158	0.00038	0.00122	-1.215 ^{ns}	-0.603 ^{ns}	-0.936 ^{ns}
<i>trnV-trnM</i>	MS	2	0.356	0.00000	0.00000	-	-	-
	TB	2	0.545	0.00000	0.00000	-	-	-
	DU	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	PM	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	PS	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	KM	2	0.327	0.00049	0.00051	-0.100 ^{ns}	0.776 ^{ns}	0.630 ^{ns}
	NM	2	0.530	0.00000	0.00000	-	-	-
	PC	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	VK	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	VL	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	รวม	4	0.325	0.00006	0.00029	-0.911 ^{ns}	0.488 ^{ns}	0.0766 ^{ns}
<i>trnC-ycf6</i>	MS	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	TB	2	0.509	0.00072	0.00048	1.186 ^{ns}	0.776 ^{ns}	0.979 ^{ns}
	DU	2	0.556	0.00079	0.00050	1.464 ^{ns}	0.804 ^{ns}	1.069 ^{ns}
	PM	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	PS	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	KM	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	NM	3	0.621	0.00099	0.00094	0.1534 ^{ns}	-0.373 ^{ns}	-0.273 ^{ns}

ตารางที่ 15 (ต่อ)

ส่วน	ประชากร	nh	h	π	θ_w	Neutrality Tests		
						D	D*	F*
<i>trnC-ycf6</i>	PC	2	0.409	0.00058	0.00047	0.541 ^{ns}	0.752 ^{ns}	0.787 ^{ns}
	VK	2	0.533	0.00075	0.00050	1.303 ^{ns}	0.804 ^{ns}	1.026 ^{ns}
	VL	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	รวม	5	0.354	0.00054	0.00108	-0.976 ^{ns}	-0.282 ^{ns}	-0.596 ^{ns}
รวม 3 ส่วน	MS	2	0.356	0.00019	0.00019	0.015 ^{ns}	0.804 ^{ns}	0.684 ^{ns}
	TB	3	0.618	0.00028	0.00019	1.186 ^{ns}	0.776 ^{ns}	0.979 ^{ns}
	DU	2	0.556	0.00030	0.00019	1.464 ^{ns}	0.80424 ^{ns}	1.069 ^{ns}
	PM	2	0.545	0.00030	0.00019	1.443 ^{ns}	0.776 ^{ns}	1.049 ^{ns}
	PS	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	KM	3	0.473	0.00028	0.00037	-0.778 ^{ns}	-0.330 ^{ns}	-0.494 ^{ns}
	NM	4	0.697	0.00056	0.00072	-0.781 ^{ns}	-1.286 ^{ns}	-1.310 ^{ns}
	PC	2	0.409	0.00022	0.00018	0.540 ^{ns}	0.752 ^{ns}	0.787 ^{ns}
	VK	2	0.533	0.00029	0.00019	1.303 ^{ns}	0.804 ^{ns}	1.026 ^{ns}
	VL	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-	-
	รวม	11	0.608	0.00033	0.00083	-1.458 ^{ns}	-0.378 ^{ns}	-0.888 ^{ns}

หมายเหตุ จำนวน haplotype (nh) ค่า haplotype diversity (h) พิจารณาข้อมูล INDEL ร่วมด้วย
 ค่าที่ใช้ทดสอบสมมติฐานของประชากร D คือ Tajima's D (Tajima, 1989)
 D* และ F* คือ Fu and Li's D* and F* (Fu and Li, 1993)
 ns คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p-value > 0.05)

เมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูนด้วยค่า h และค่า π
 ในแต่ละส่วนที่ศึกษา พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnC-ycf6* ให้ค่าความหลากหลาย
 ทางพันธุกรรมสูงสุด โดยมีค่า h และค่า π รวมเท่ากับ 0.354 และ 0.00054 ในขณะที่ *trnV-trnM* มี
 ค่า h และค่า π รวมเท่ากับ 0.325 และ 0.00006 และ *trnS-trnG* มีค่า h และค่า π รวมเท่ากับ 0.158
 และ 0.00038 ตามลำดับ

ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในครั้งนี้พิจารณาจากค่า nucleotide
 diversity (π) ที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ
trnC-ycf6 เข้าด้วยกัน พบว่าประชากรไม้พะยูนที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงสุดได้แก่

ป่าโคกคองเค็ง อ.นาควน จ.มหาสารคาม (NM) ($\pi = 0.00056$) รองลงมาคือ ป่าดงนาทาม จ.อุบลราชธานี (DU) ($\pi = 0.00030$) และ อุทยานแห่งชาติภูผาทีบ จ.มุกดาหาร ($\pi = 0.00030$) การที่ประชากร ป่าโคกคองเค็ง อ.นาควน จ.มหาสารคาม (NM) มีความหลากหลายทางพันธุกรรม สูงสุดอาจเนื่องด้วยสภาพพื้นที่ป่าโคกคองเค็ง อ.นาควน จ.มหาสารคาม (NM) เป็นพื้นที่ป่าชุมชนที่มีการปลูกลดต้นพะยุงเพิ่มเข้าไปในพื้นที่ ซึ่งต้นที่ปลูกเพิ่มเข้าไปไม่ทราบแหล่งที่มาและข้อมูลทางพันธุกรรมโดยอาจมีความผันแปรทางพันธุกรรมอยู่ก่อนแล้ว จึงทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าในประชากรอื่น ส่วนประชากรที่ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ได้แก่ อุทยานแห่งชาติภูผาเหล็ก จ.สกลนคร (PS) และเวียงจันทน์ ประเทศลาว (VL) ($\pi = 0.00000$)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยุงเฉพาะพื้นที่ป่าธรรมชาติทั้ง 7 ประชากร ได้แก่ อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) อุทยานแห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์ (TB) ป่าดงนาทาม จ.อุบลราชธานี (DU) อุทยานแห่งชาติภูผาทีบ จ.มุกดาหาร (PM) อุทยานแห่งชาติภูผาเหล็ก จ.สกลนคร (PS) ป่าสงวนแห่งชาติโคกขาว จ.มหาสารคาม (KM) และอุทยานแห่งชาติภูแลนคา จ.ชัยภูมิ (PC) พบว่าประชากรป่าธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงสุดได้แก่ ป่าดงนาทาม จ.อุบลราชธานี (DU) ($\pi = 0.00030$) และ อุทยานแห่งชาติภูผาทีบ จ.มุกดาหาร ($\pi = 0.00030$)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไม้พะยุงที่เป็นสวนป่าซึ่งได้แก่ ประชากรสวนป่าของสถานีวนวัฒนวิจัย จ.กำแพงเพชร (VK) เทียบกับประชากรต่างๆที่เป็นป่าธรรมชาติ พบว่ามีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยค่า nucleotide diversity (π) ที่ใกล้เคียงกัน กล่าวคือ ประชากรสวนป่าสถานีวนวัฒนวิจัย จ.กำแพงเพชร (VK) มีค่า π เท่ากับ 0.00029 ส่วนประชากรต่างๆที่เป็นป่าธรรมชาติมีค่า π รวมเท่ากับ 0.00030 (ไม่ได้แสดงในตาราง) โดยทั่วไปแล้วระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรที่เป็นสวนป้ามักมีระดับต่ำกว่าในประชากรป่าธรรมชาติ เนื่องจากประชากรสวนป่าเป็นประชากรที่ถูกแบ่งแยกออกมาเป็นประชากรย่อยๆซึ่งมีโอกาสเกิดการผสมกันเองภายในประชากร และส่งผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมที่อาจลดลง อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ผลในครั้งนี้ใช้ส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมมาศึกษา ซึ่งโดยทั่วไปมีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมผ่านทางแม่เท่านั้นจึงอาจไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมมากนัก อีกปัจจัยหนึ่งคือลักษณะการเจริญเติบโตของไม้พะยุงโดยทั่วไปมีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า โดยปัจจัยเหล่านี้ทำให้ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยุงภายในสวนป่าและป่าธรรมชาติไม่แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูน ($\pi = 0.00033$) กับพืชอื่นๆที่มีการศึกษาในลักษณะเดียวกันก่อนหน้านี้พบว่าพืชชนิดอื่นส่วนใหญ่มีค่า π สูงกว่าไม้พะยูน ดังกล่าวต่อไปนี้ Ribeiro *et al.* (2010) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมของส่วน *trnV-trnM* และ *trnL* intron จากคลอโรพลาสต์จีโนมในต้น Brazilian rosewood (*D. nigra*) ในประเทศบราซิลซึ่งมีค่า π รวมเท่ากับ 0.00089 และ Novaes *et al.* (2010) ที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมของส่วน *trnS-trnG* และ *trnL-trnL-trnF* จากคลอโรพลาสต์จีโนมในต้น *Plathymenia reticulata* ที่เป็นไม้ในวงศ์ถั่วพบว่ามีค่า π รวมเท่ากับ 0.00250 รวมถึง Cheng *et al.* (2005) ที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมของส่วน *trnL* intron และ *trnV-trnM* จากคลอโรพลาสต์จีโนมในต้น *Castanopsis carlesii* ซึ่งเป็นไม้ในวงศ์ Fagaceae พบว่ามีค่า π รวมเท่ากับ 0.00095 อย่างไรก็ตามค่า π ของไม้พะยูนยังมีค่าสูงกว่าต้น *Cinnamomum kanchirae* ที่ Kuo *et al.* (2010) ได้ศึกษาไว้โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมส่วน *trnL-trnF* และ *petG-trnP* โดยมีค่า π เท่ากับ 0.00016

2.3 การทดสอบสมมติฐานทางวิวัฒนาการของประชากร

การทดสอบสมมติฐานของประชากรโดยใช้ค่า Tajima's D และ Fu and Li's D* and F* เป็นการทดสอบสมมติฐานทางวิวัฒนาการของประชากรต่างๆของไม้พะยูนว่าเบี่ยงเบนไปจากทฤษฎี “Neutral theory” หรือไม่ ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของลำดับนิวคลีโอไทด์จากคลอโรพลาสต์จีโนมส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* และรวมทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกัน พบว่าค่าที่ได้แต่ละประชากรไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยมีค่า p-value > 0.05 แสดงดังตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่าประชากรไม้พะยูนยังอยู่ภายใต้สมมติฐานของ “Neutral theory” เนื่องจากความผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรไม้พะยูนที่ศึกษาได้รับอิทธิพลจากสมมูลระหว่าง mutation และ genetic drift

2.4 การกระจายของ haplotype

Haplotype แบบต่างๆ เมื่อวิเคราะห์ด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์จีโนมส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* และที่รวมลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกันแตกต่างกันออกไปในแต่ละประชากรดังนี้

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnS-trnG* ผลที่ได้คือ มีรูปแบบดีเอ็นเอรวม 4 haplotype แสดงดังตารางที่ 11 ภาพที่ 12 (ก) และภาคผนวก ข โดย haplotype ที่พบจำนวนมากที่สุดได้แก่ hSG1 มีจำนวนรวม 99 ตัวอย่างจากทั้งหมด 108 ตัวอย่าง ซึ่งพบกระจายในทุกประชากร

ส่วน haplotype ที่พบรองลงมาคือ hSG2 มีจำนวน 6 ตัวอย่าง พบที่อุทยานแห่งชาติภูผาทิพย์ จ.มุกดาหาร (PM) ส่วน hSG3 มีจำนวน 2 ตัวอย่าง พบที่อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) และ hSG4 มีจำนวน 1 ตัวอย่าง พบที่ ป่าโคกคงเค็ง อ.นาคูน จ.มหาสารคาม (NM)

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnV-trnM* ผลที่ได้คือ มีรูปแบบดีเอ็นเอรวม 4 haplotype แสดงดังตารางที่ 12 ภาพที่ 12 (ข) และภาคผนวก ข โดย haplotype ที่พบจำนวนมากที่สุดได้แก่ hVM1 จำนวน 88 ตัวอย่างจาก 108 ตัวอย่าง ซึ่งกระจายในทุกประชากร ส่วน haplotype ที่พบรองลงมาคือ hVM4 มีจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยพบทั้งสองประชากรคือ ป่าโคกคงเค็ง อ.นาคูน จ.มหาสารคาม (NM) จำนวน 5 ตัวอย่าง และอุทยานแห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์ (TB) จำนวน 5 ตัวอย่าง รองลงมาอีกคือ hVM3 มีจำนวน 8 ตัวอย่าง พบเฉพาะที่อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS)

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnC-ycf6* ผลที่ได้คือมีรูปแบบดีเอ็นเอรวม 5 haplotype แสดงดังตารางที่ 13 ภาพที่ 12 (ค) และภาคผนวก ข โดย haplotype ที่พบจำนวนมากที่สุดได้แก่ hCN1 จำนวน 86 ตัวอย่าง จาก 108 ตัวอย่าง ซึ่งกระจายในทุกประชากร haplotype ที่พบรองลงมาคือ hCN2 และ hCN4 พบจำนวน 9 ตัวอย่าง hCN2 พบในป่าโคกคงเค็ง อ.นาคูน จ.มหาสารคาม (NM) และอุทยานแห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์ (TB) ส่วน hCN4 พบในป่าดงนาทาม จ.อุบลราชธานี (DU) และ สวนป่าในสถานีวิจัยวนวัฒนวิจัย จ.กำแพงเพชร (VK)

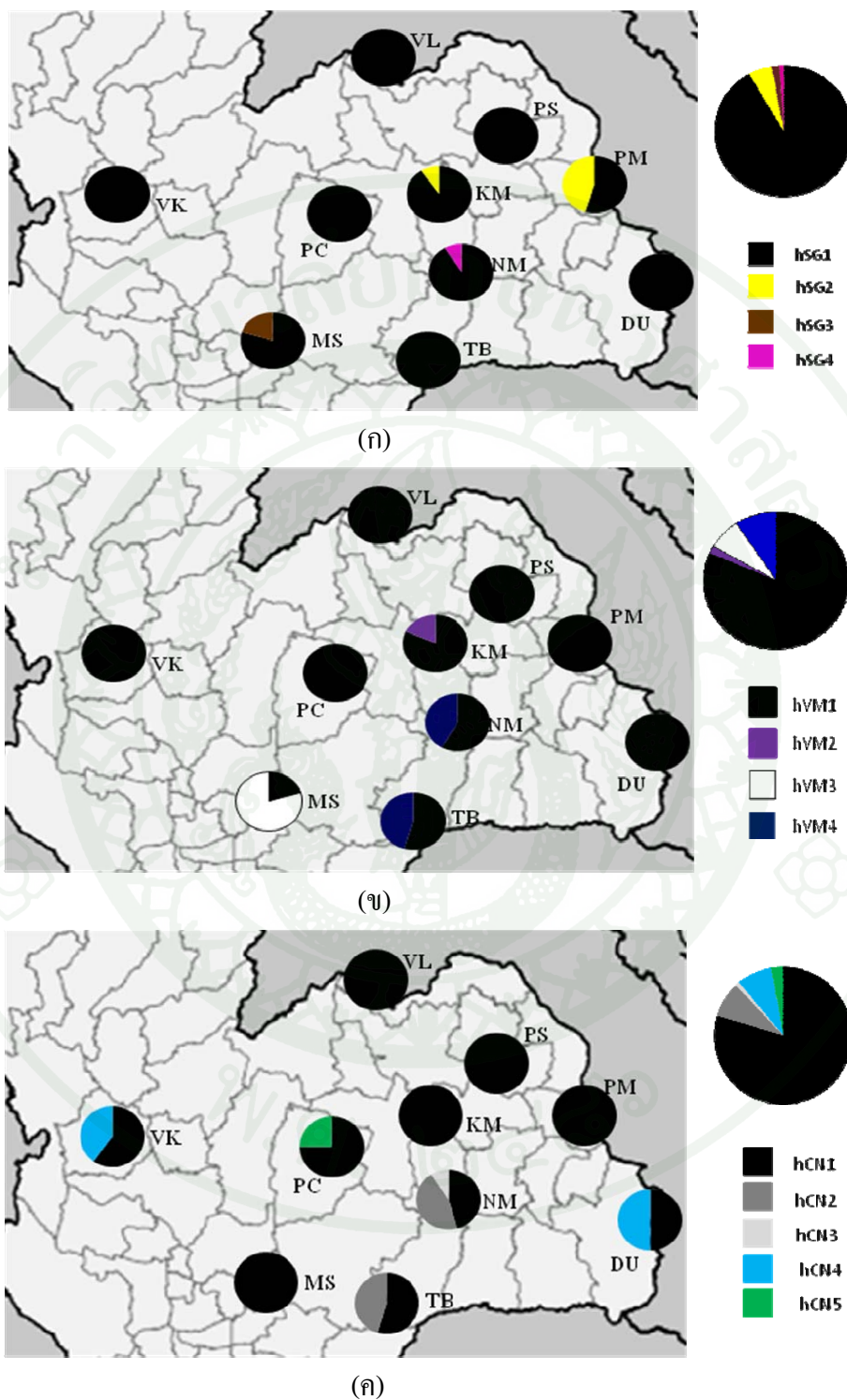
รูปแบบดีเอ็นเอแบบต่างๆที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์จีโนมของส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน แสดงดังตารางที่ 14 และภาพที่ 13 (ก) ผลที่ได้คือมีรูปแบบของดีเอ็นเอที่พบรวม 11 haplotype ซึ่งแต่ละ haplotype มีการปรากฏในสัดส่วนที่แตกต่างกัน จำนวน haplotype ที่พบในแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 1-4 haplotype โดย haplotype ที่พบเป็นจำนวนมากที่สุดคือ H1 มีจำนวน 66 ตัวอย่างจากทั้งหมด 108 ตัวอย่าง ซึ่งกระจายทุกประชากร ยกเว้นอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) ส่วน haplotype ที่พบรองลงมาคือ H6 และ H9 พบจำนวนเท่ากันคือ 9 ตัวอย่าง โดยที่ H6 พบในป่าโคกคงเค็ง อ.นาคูน จ.มหาสารคาม (NM) อุทยานแห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์ (TB) ส่วน H9 พบในป่าดงนาทาม จ.อุบลราชธานี (DU) และสวนป่าสถานีวิจัยวนวัฒนวิจัย จ.กำแพงเพชร (VK) และพบว่าจำนวน 7 haplotype ที่พบเฉพาะประชากรใดประชากรหนึ่ง (unique haplotype) ได้แก่ H3 และ H5 พบเฉพาะประชากรอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) H4 และ H8 พบเฉพาะประชากรป่าโคกคงเค็ง อ.นาคูน จ.มหาสารคาม (NM) H7 พบเฉพาะประชากรอุทยาน

แห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์ (TB) H10 พบเฉพาะประชากรป่าโคกข้าว อ.ชื่นชม จ.มหาสารคาม (KM) และ H11 พบเฉพาะประชากรอุทยานแห่งชาติภูแลนคา จ.ชัยภูมิ (PC)

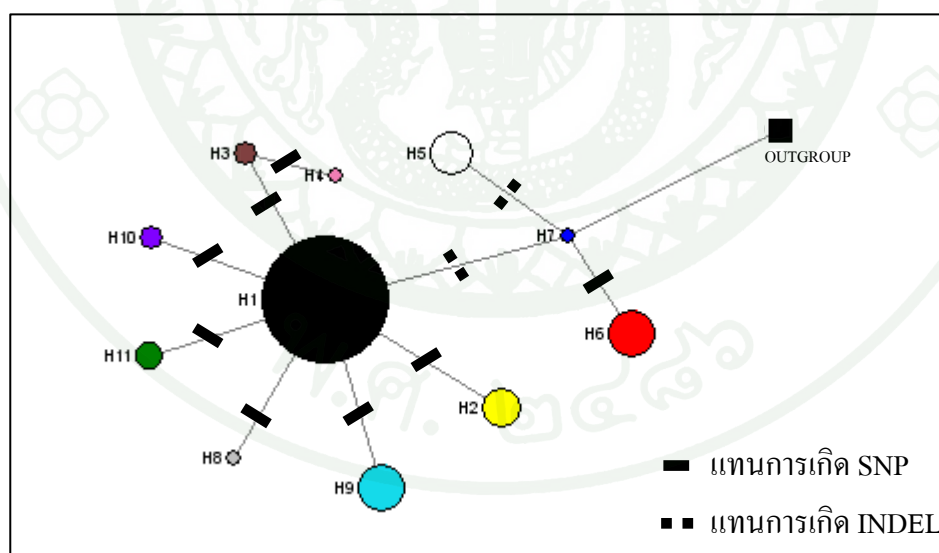
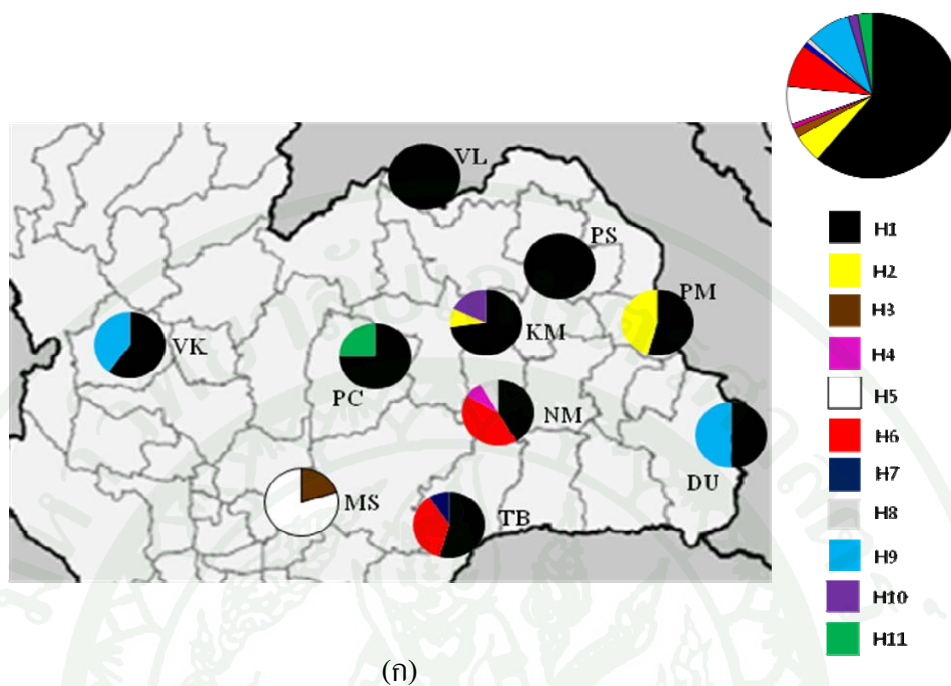
เมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายของจำนวน haplotype พบว่า haplotype ที่วิเคราะห์ได้จากการรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกันมีจำนวน haplotype มากถึง 11 haplotype ซึ่งมากกว่าเมื่อวิเคราะห์ทีละส่วน ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบจำนวน haplotype ที่วิเคราะห์ด้วยทีละส่วนพบว่าส่วน *trnC-ycf6* มีจำนวน haplotype มากสุดคือ 5 haplotype โดยเป็น haplotype ที่เกิดจาก SNP ทั้งหมด ส่วน *trnS-trnG* และส่วน *trnV-trnM* มีจำนวน haplotype เท่ากันคือ 4 haplotype โดย haplotype ที่พบจากส่วน *trnS-trnG* เกิดจาก SNP ทั้งหมด ในขณะที่ haplotype ที่พบจากส่วน *trnV-trnM* เกิดทั้งจากทั้ง SNP และ INDEL

เมื่อพิจารณารูปแบบ haplotype ที่กระจายในแต่ละประชากรเมื่อวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนมที่แสดงดังภาพที่ 12 พบว่าแฮปโลไทป์ hSG1 hVM1 และ hCN1 มีการกระจายทั่วทุกประชากร และเมื่อวิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกัน จะเห็นได้ว่า H1 (สีดำ) พบการกระจายในทุกประชากร ยกเว้นอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) ซึ่งคิดเป็น 61 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด โดยมี haplotype H1 ร่วมกันทั้ง 9 ประชากรจากทั้งหมด 10 ประชากร ดังภาพที่ 13 (ก) แสดงให้เห็นว่า H1 เป็น haplotype ที่พบโดยทั่วไป หรือกล่าวได้ว่าเป็น common haplotype

เมื่อนำผลจากตารางที่ 14 ที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์จีโนมของส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกันมาสร้าง haplotype network โดยมี outgroup คือ *D. glomeriflora* หรือเก็ดขาวซึ่งเป็นไม้ในสกุลเดียวกับไม้พะยูน แสดงดังภาพที่ 13 (ข) ผลแสดงให้เห็นว่า H7 เป็น haplotype ที่ outgroup แยกออกมา แสดงได้ว่า H7 น่าจะเป็นจุดร่วมของการเกิดวิวัฒนาการร่วมกันของไม้พะยูนและไม้เก็ดขาว ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า H1 หรือ common haplotype อาจแยกออกมาจาก H7 เนื่องจากทั้งไม้พะยูนและไม้เก็ดขาวมีตำแหน่งการเกิด INDEL แบบหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 128 ถึง 133 เหมือนกัน ดังนั้น H1 ในตำแหน่ง INDEL ดังกล่าวจึงมีแนวโน้มเกิด mutation แบบ insertion เนื่องจากตำแหน่ง INDEL ดังกล่าวใน H1 ต่างจาก H7 และเมื่อ H1 แยกออกมาจาก H7 แล้วนั้น หลังจากนั้นอาจเป็นช่วงเวลาที่มีการแพร่กระจายของไม้พะยูนไปยังพื้นที่ต่างๆ จึงทำให้พบ H1 เป็นจำนวนมากในประชากรส่วนใหญ่ และจากนั้นมีการเกิด mutation จาก H1 ไปเป็น haplotype ต่างๆซึ่งเป็นไปตามการเกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต



ภาพที่ 12 รูปแบบการกระจาย haplotype ของไม้พะยูน ที่วิเคราะห์ด้วยส่วน *trnS-trnG* (ก) ส่วน *trnV-trnM* (ข) และส่วน *trnC-ycf6* (ค) ของคลอโรพลาสต์จีโนม



ภาพที่ 13 รูปแบบการกระจาย haplotype ของไม้พะยูน ที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับ
นิวคลีโอไทด์ของส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* ของคลอโรพลาสต์จีโนม
เข้าด้วยกัน (ก) และ haplotype network (ข)

2.5 โครงสร้างทางพันธุกรรม

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยุงด้วยค่า F_{ST} โดยแยกการวิเคราะห์เป็น 2 แบบคือวิเคราะห์โดยรวม INDEL และวิเคราะห์โดยไม่รวม INDEL ผลแตกต่างกันออกไปดังต่อไปนี้

2.5.1 วิเคราะห์ผลโดยรวม INDEL

จากตาราง AMOVA ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากรที่คิดโดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากคลอโรพลาสต์จีโนมส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน แสดงดังตารางที่ 16 โดยมีค่าความผันแปรระหว่างประชากร 39.86 เปอร์เซ็นต์ และค่าความผันแปรภายในประชากรมีค่า 60.14 เปอร์เซ็นต์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีความผันแปรภายในประชากรสูงกว่าความผันแปรระหว่างประชากร

F_{ST} เป็นค่าที่ใช้บอกระดับความแตกต่างระหว่างประชากร และบอกระดับ gene flow ค่า F_{ST} ของคลอโรพลาสต์จีโนมที่ใช้ศึกษาในแต่ละส่วนของ *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.209 ถึง 0.554 แสดงดังตารางที่ 17 โดยส่วน *trnV-trnM* มีค่า F_{ST} สูงสุดเท่ากับ 0.554 รองลงมาคือส่วน *trnC-ycf6* มีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.296 และส่วน *trnS-trnG* มีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.209 ตามลำดับ โดยค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสามส่วนนี้มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} < 0.001$)

และเมื่อเปรียบเทียบค่า F_{ST} เป็นคู่ประชากรที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกันพบว่าค่า F_{ST} มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติรวม 35 คู่ประชากร ($*p\text{-value} < 0.05$ $**p\text{-value} < 0.01$ $***p\text{-value} < 0.001$) และไม่มี ความแตกต่างทางสถิติรวม 10 คู่ประชากร ($p\text{-value} > 0.05$) จากทั้งหมด 45 คู่ประชากร แสดงดังตารางที่ 18 ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าประชากรของอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็ก ใน จ.สระบุรี (MS) ที่วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับประชากรคู่อื่นๆ ให้ค่า F_{ST} ในระดับสูง กล่าวคือมีค่า F_{ST} อยู่ระหว่าง 0.440 ถึง 0.716 โดยส่วนใหญ่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p\text{-value} < 0.001$

ตารางที่ 16 ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย AMOVA ของไม้พะยูน ที่รวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน แบบรวมส่วน INDEL

ระดับความผันแปร	d.f	Variance components	เปอร์เซ็นต์ความผันแปร
ระหว่างประชากร	9	0.210	39.86
ภายในประชากร	98	0.317	60.14
รวม	107	0.527	
Fixation Index	F_{ST}	0.400***	

หมายเหตุ *** p-value < 0.001 ทดสอบ 10,000 permutations

ตารางที่ 17 ค่า F_{ST} ของไม้พะยูน เมื่อวิเคราะห์ด้วยการรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน แบบรวมส่วน INDEL

ส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนมที่ศึกษา	ค่า F_{ST}
<i>trnS-trnG</i>	0.209***
<i>trnV-trnM</i>	0.554***
<i>trnC-ycf6</i>	0.296***
รวม 3 ส่วน	0.400***

หมายเหตุ *** p-value < 0.001

2.5.2 วิเคราะห์ผลโดยรวม INDEL

จากตาราง AMOVA ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากรที่คิดโดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากคลอโรพลาสต์จีโนมส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน แสดงดังตารางที่ 19 โดยมีค่าความผันแปรระหว่างประชากร 17.16 เปอร์เซ็นต์ และค่าความผันแปรภายในประชากรมีค่า 82.84 เปอร์เซ็นต์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีความผันแปรภายในประชากรสูงกว่าความผันแปรระหว่างประชากร

ตารางที่ 18 ค่า F_{ST} เมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ประชากรของไม้พะยุง ที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* ไร่ด้วยกัน แบบรวมส่วน INDEL

	MS	VK	DU	KM	VL	NM	PM	PS	PC	TB
MS	0.000									
VK	0.636***	0.000								
DU	0.647***	-0.089	0.000							
KM	0.624***	0.226*	0.312**	0.000						
VL	0.704***	0.333	0.444*	0.056	0.000					
NM	0.393***	0.280**	0.318**	0.230*	0.252*	0.000				
PM	0.647***	0.369**	0.423**	0.182	0.384*	0.309**	0.000			
PS	0.716***	0.350*	0.461*	0.067	0.000	0.267*	0.400*	0.000		
PC	0.651***	0.279**	0.362**	0.123	0.157	0.261*	0.325**	0.170	0.000	
TB	0.440**	0.343**	0.384**	0.283*	0.340*	-0.073	0.371**	0.356*	0.321**	0.000

หมายเหตุ * p-value < 0.05 ** p-value < 0.01 *** p-value < 0.001

ค่า F_{ST} ของคลอโรพลาสต์จีโนมที่ใช้ศึกษาในแต่ละส่วนของ *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.098 ถึง 0.296 แสดงดังตารางที่ 20 โดยส่วน *trnC-ycf6* มีค่า F_{ST} สูงสุดเท่ากับ 0.296 รองลงมาคือส่วน *trnS-trnG* มีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.209 และส่วน *trnV-trnM* มีค่า F_{ST} ต่ำสุดเท่ากับ 0.098

ตารางที่ 19 ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย AMOVA ของไม้พะยูน ที่รวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน แบบไม่รวมส่วน INDEL

ระดับความผันแปร	d.f	Variance components	เปอร์เซ็นต์ความผันแปร
ระหว่างประชากร	9	0.120	17.16
ภายในประชากร	98	0.578	82.84
รวม	107	0.698	
Fixation Index	F_{ST}	0.172***	

หมายเหตุ *** p-value < 0.001 ทดสอบ 10,000 permutations

ตารางที่ 20 ค่า F_{ST} ของไม้พะยูน เมื่อวิเคราะห์ด้วยการรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน แบบไม่รวมส่วน INDEL

ส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนมที่ศึกษา	ค่า F_{ST}
<i>trnS-trnG</i>	0.209***
<i>trnV-trnM</i>	0.098 ^{ns}
<i>trnC-ycf6</i>	0.296***
รวม 3 ส่วน	0.172***

หมายเหตุ ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p-value > 0.05) *** p-value < 0.001

และเมื่อเปรียบเทียบค่า F_{ST} เป็นคู่ประชากรที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกันพบว่าค่า F_{ST} มีความแตกต่างอย่างมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติรวม 12 คู่ประชากร (*p-value < 0.05 **p-value < 0.01) และไม่มี ความแตกต่างทางสถิติรวม 33 คู่ประชากร (p-value > 0.05) แสดงดังตารางที่ 21 ผลดังกล่าวพบว่า

ประชากรของอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) ที่วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับประชากรอื่นๆ ให้ค่า F_{ST} ในระดับต่ำ กล่าวคือมีค่า F_{ST} อยู่ระหว่าง 0.000 ถึง 0.196 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p\text{-value} > 0.5$)

เมื่อเปรียบเทียบตาราง AMOVA ที่วิเคราะห์ทั้งแบบรวม INDEL และแบบไม่รวม INDEL พบว่าความผันแปรระหว่างประชากรแบบรวม INDEL มีค่า 39.86 เปอร์เซ็นต์ และความผันแปรภายในประชากรมีค่า 60.14 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์โดยไม่รวม INDEL พบว่ามีค่าความผันแปรระหว่างประชากรเพียง 17.16 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ค่าความผันแปรภายในประชากรมีค่าสูงถึง 82.84 เปอร์เซ็นต์ แสดงได้ว่าข้อมูล INDEL มีผลต่อค่าความผันแปรทั้งภายในและระหว่างประชากร อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ผลทั้ง 2 แบบดังกล่าวให้ผลไปในทางเดียวกันคือมีความผันแปรภายในประชากรสูงกว่าความผันแปรระหว่างประชากร

เมื่อเปรียบเทียบค่า F_{ST} ของคลอโรพลาสต์จีโนมที่ใช้ศึกษาในแต่ละส่วนของ *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* ที่วิเคราะห์ทั้งแบบรวม INDEL และแบบไม่รวม INDEL พบว่าส่วน *trnS-trnG* และ *trnC-ycf6* ให้ค่า F_{ST} เท่ากันโดยมีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.209 และ 0.296 ตามลำดับ ($p\text{-value} < 0.001$) ส่วน *trnV-trnM* ให้ค่า F_{ST} แตกต่างกัน โดยเมื่อวิเคราะห์แบบรวม INDEL ให้ค่า F_{ST} เท่ากับ 0.554 ($p\text{-value} < 0.001$) ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์แบบไม่รวม INDEL ให้ค่า F_{ST} เท่ากับ 0.098 ($p\text{-value} > 0.5$) ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าส่วน *trnV-trnM* เกิด mutation แบบ INDEL ถึง 2 ตำแหน่ง ในขณะที่ส่วน *trnS-trnG* และ *trnC-ycf6* ไม่เกิด INDEL ซึ่งการวิเคราะห์ค่า F_{ST} นี้จะขึ้นกับจำนวน polymorphic site ด้วย ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์โดยรวมตำแหน่ง INDEL เข้าร่วมด้วยจึงส่งผลให้ค่า F_{ST} สูงตามด้วย และเมื่อเปรียบเทียบค่า F_{ST} ที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์รวม 3 ส่วนของ *trnS-trnG* *trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน พบว่าค่า F_{ST} ที่ได้จากการวิเคราะห์รวม INDEL โดยมีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.400 ($p\text{-value} < 0.001$) ซึ่งมีค่าสูงกว่าเมื่อวิเคราะห์แบบไม่รวม INDEL โดยมีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.172 ($p\text{-value} < 0.001$) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมทั้ง 3 ส่วนมีส่วนของ *trnV-trnM* ที่มี mutation แบบ INDEL ร่วมด้วยจึงทำให้ได้ค่า F_{ST} ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 21 ค่า F_{ST} เมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ประชากรของไม้พะยุง ที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* ไปด้วยกัน แบบไม่รวมส่วน INDEL

	MS	VK	DU	KM	VL	NM	PM	PS	PC	TB
MS	0.000									
VK	0.099	0.000								
DU	0.196	0.089	0.000							
KM	-0.021	0.058	0.141	0.000						
VL	0.111	0.333	0.444*	0.142	0.000					
NM	0.123	0.140	0.184*	0.110	0.314**	0.000				
PM	0.152	0.119	0.155	0.059	0.384*	0.165*	0.000			
PS	0.124	0.350*	0.461*	0.156	0.000	0.328**	0.400*	0.000		
PC	0.001	0.091	0.177	0.007	0.157	0.137	0.139	0.170	0.000	
TB	0.118	0.203*	0.283*	0.110	0.285	0.020	0.246*	0.300	0.133	0.000

หมายเหตุ * p-value < 0.05 ** p-value < 0.01

เมื่อเปรียบเทียบค่า F_{ST} เป็นคู่ประชากรที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกันทั้งแบบรวม INDEL และแบบไม่รวม INDEL พบว่าเมื่อวิเคราะห์รวม INDEL ค่า F_{ST} เมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ประชากรมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติรวม 35 คู่ประชากร ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์แบบไม่รวม INDEL มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติรวมเพียง 12 คู่ประชากร แสดงดังตารางที่ 18 และตารางที่ 21 ตามลำดับ ผลดังกล่าวพบว่าประชากรของอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) ที่วิเคราะห์แบบรวม INDEL โดยเปรียบเทียบกับประชากรคู่อื่นๆ ให้ค่า F_{ST} ในระดับสูง กล่าวคือมีค่า F_{ST} อยู่ระหว่าง 0.440 ถึง 0.716 โดยส่วนใหญ่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p\text{-value} < 0.001$ แต่เมื่อพิจารณาค่า F_{ST} ที่วิเคราะห์แบบไม่รวม INDEL จะพบว่าประชากรของอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) กลับให้ค่า F_{ST} ในระดับต่ำกว่า กล่าวคือมีค่า F_{ST} อยู่ระหว่าง 0.000 ถึง 0.196 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากข้อมูลการเกิด mutation ในประชากรของอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) เกิด INDEL เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งแตกต่างจากประชากรอื่นๆ ทั้งนี้การวิเคราะห์ค่า F_{ST} จะขึ้นกับจำนวน polymorphic site ด้วย จึงส่งผลต่อค่า F_{ST} ที่แตกต่างกันระหว่างการนำข้อมูล INDEL เข้าร่วมวิเคราะห์และไม่เข้าร่วมวิเคราะห์

จากการตรวจเอกสารในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องส่วนใหญ่พบว่าจะรวมส่วนของ INDEL เข้าร่วมวิเคราะห์ด้วย เช่นการศึกษาของ Cheng *et al.* (2005); Artyukova *et al.* (2009); Ramos *et al.* (2009); Kuo *et al.* (2010); Novaes *et al.* (2010); Ribeiro *et al.* (2010); Yuan *et al.* (2011); Li *et al.* (2012) ดังนั้นในการวิจัยผลครั้งนี้จึงได้ใช้ผลที่รวมข้อมูล INDEL เข้าร่วมวิเคราะห์ โดยค่า F_{ST} ที่วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกันมีค่า 0.400 และเมื่อเปรียบเทียบค่า F_{ST} ของไม้พะยุงที่ Soonhuai *et al.* (1994) เคยศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ด้วยการวิเคราะห์ isozyme 18 ตำแหน่งจาก 12 enzyme พบว่ามีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.127 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนม อาจเนื่องด้วยวิธีการศึกษาที่แตกต่างกันอาจทำให้ค่า F_{ST} ที่ได้มีค่าแตกต่างกันด้วย แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า F_{ST} กับพืชชนิดอื่นซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกับไม้พะยุงที่ได้มีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้โดยวิธีเดียวกันจาก Ribeiro *et al.* (2010) ซึ่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมในส่วน *trnV-trnM* และ *trnL* intron จากคลอโรพลาสต์จีโนมในต้นบราซิลเลี่ยนโรสวูด (*D. nigra*) จากประเทศบราซิล พบว่ามีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.62 ซึ่งสูงกว่าไม้พะยุง

ด้วยรูปแบบการถ่ายทอดพันธุกรรมในคลอโรพลาสต์ของพืชมีดอกส่วนใหญ่จะส่งผ่านสารพันธุกรรมจากทางแม่จากทางเมล็ด ดังนั้นค่า F_{ST} ที่ได้จากการศึกษาด้วยส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมจึงใช้อธิบายถึง gene flow ที่เกิดจากน้ำพาโดยเมล็ด เมื่อพิจารณาการกระจายของ haplotype ต่างๆที่แสดงดังภาพ 13 (ก) แสดงให้เห็น common haplotype (H1) ที่พบมากถึง 9 ประชากรจากประชากรที่ศึกษาทั้งหมด 10 ประชากร ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องด้วยลักษณะด้านภูมิศาสตร์ซึ่งพบไม้พะยุงส่วนใหญ่ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย และด้วยลักษณะพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ราบสูงสลับกับเนินเขาที่ไม่สูงมาก ซึ่งปัจจัยดังกล่าวอาจไม่เป็นตัวขัดขวางการเกิด gene flow จากการกระจายของเมล็ดมากนัก จึงทำให้พบการกระจายของ common haplotype (H1) เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้การปรากฏ common haplotype (H1) ดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับลักษณะที่ไม้พะยุงมีการเจริญเติบโตช้า หรือกล่าวได้ว่ามีช่วงอายุที่ค่อนข้างยาวนาน โดยตัวอย่างที่เก็บมาศึกษาส่วนใหญ่เป็นไม้ในรุ่นแรก ซึ่งอาจยังไม่ได้รับผลกระทบต่างๆ ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากร ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรไม้พะยุงที่ศึกษาในครั้งนี้จึงกล่าวได้ว่าไม่ปรากฏโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ชัดเจนหรือไม่ถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆ ทั้งนี้เนื่องมาจากประชากรส่วนใหญ่มีการปรากฏ H1 (common haplotype) ยกเว้นแต่ประชากร อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จ.สระบุรี ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ AMOVA ที่แสดงความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากรมากกว่าความผันแปรระหว่างประชากร อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่า F_{ST} รวมของไม้พะยุงกลับมีค่าค่อนข้างสูง ($F_{ST} = 0.400$) อาจเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างประชากรของประชากรอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) กับประชากรอื่นๆ ซึ่งพบว่าประชากรอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) พบ haplotype ที่จำเพาะภายในประชากรเดียว (unique haplotype) ทั้งสิ้น ได้แก่ H3 (สีน้ำตาล) และ H5 (สีขาว) โดยไม่พบ common haplotype (H1) อยู่เลย แสดงดังภาพที่ 6 (ก) เมื่อเปรียบเทียบค่า F_{ST} เป็นคู่ประชากร จะเห็นได้ว่าประชากรอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) ให้ค่า F_{ST} สูงที่สุด อยู่ระหว่าง 0.440 ถึง 0.716 โดยอธิบายได้ว่าอาจมีการเกิด haplotype จำเพาะภายในประชากรอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ขึ้นมาก่อน และหลังจากนั้นอาจมีปัจจัยที่เป็นตัวขัดขวางการเกิด gene flow เช่นการบุกรุกพื้นที่ป่า ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการแพร่กระจายพันธุ์ โดยประชากรดังกล่าวมีโอกาสถูกแบ่งแยกออกไปเป็นประชากรย่อย ทำให้การแพร่กระจาย haplotype ที่จำเพาะดังกล่าวเป็นไปได้ยากขึ้น จึงเป็นผลให้พบ haplotype ที่จำเพาะภายในประชากรอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่เพียงประชากรเดียวเท่านั้น โดยปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้มีความแตกต่างระหว่างประชากรเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้ค่า F_{ST} รวมสูงถึง 0.400

3. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในการแสดงแหล่งกำเนิดหรือแหล่งที่มาของไม้พะยูนในอนาคต

การศึกษาข้อมูลจากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนม โดยในพืชส่วนใหญ่มีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมผ่านทางแม่พันธุ์ ซึ่งเป็นข้อดีที่สามารถใช้อธิบายถึงวิวัฒนาการและโครงสร้างทางด้านภูมิศาสตร์ที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต haplotype ที่กระจายในประชากรต่างๆ สามารถแสดงข้อมูลด้านพันธุกรรมในแต่ละประชากรหรือแต่ละพื้นที่ได้ รวมถึงสามารถใช้ในการแสดงแหล่งกำเนิดหรือแหล่งที่มาของไม้ชนิดนั้นๆจากพื้นที่ป่าธรรมชาติได้ ผลการวิเคราะห์ haplotype ของไม้พะยูนโดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน พบว่ามีบาง haplotype ที่พบเฉพาะประชากรเดียวเท่านั้นที่อยู่ในพื้นที่ป่าธรรมชาติ ได้แก่ H3 และ H5 พบเฉพาะประชากรอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS) H7 พบเฉพาะประชากรอุทยานแห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์ (TB) H10 พบเฉพาะประชากรป่าโคกข้าว อ. ชื่นชม จ.มหาสารคาม (KM) และ H11 พบเฉพาะประชากรอุทยานแห่งชาติภูแล่นคา จ.ชัยภูมิ (PC) สำหรับข้อมูล haplotype ที่จำเพาะต่อประชากรที่อยู่ในพื้นที่ป่าธรรมชาติเหล่านี้ สามารถนำมาเป็นเครื่องมือด้านทางพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นแนวทางในการวิเคราะห์แหล่งที่มาของไม้ท่อนพะยูนผิดกฎหมายภายในอนาคต ผลการศึกษานี้เป็นเพียงข้อมูลด้านพันธุกรรมเบื้องต้นของไม้พะยูน อย่างไรก็ตามควรมีการนำไปศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ครบถ้วนมากที่สุด โดยควรศึกษาเพิ่มเติมในการเพิ่มจำนวนต้นต่อประชากร การเพิ่มส่วนที่ใช้ศึกษาของคลอโรพลาสต์จีโนม การเพิ่มแหล่งประชากรให้ครอบคลุมพื้นที่ที่มีการกระจายของไม้พะยูนทั้งหมดทั้งภายในประเทศ และประเทศเพื่อนบ้านที่พบการกระจายของไม้พะยูนอยู่ ได้แก่ ลาว กัมพูชา และเวียดนาม

4. แนวทางการอนุรักษ์ไม้พะยูน

ด้วยปัญหาการลักลอบตัดไม้พะยูนที่กระทำกันอย่างต่อเนื่องในทศวรรษนี้ รวมถึงการบุกรุกพื้นที่ป่าเพื่อการใช้ประโยชน์ที่ดินยิ่งเป็นการเพิ่มโอกาสการสูญพันธุ์มากขึ้น ปัจจัยเหล่านี้ทำให้ประชากรไม้พะยูนมีโอกาสถูกแบ่งเป็นประชากรย่อยมากขึ้น โดยระยะทางระหว่างประชากรที่ห่างมากขึ้นทำให้โอกาสในการถ่ายเทยีนลดลงทั้งจากการปลิวของละอองเรณู และการกระจายของเมล็ด โดยยิ่งส่งผลต่อการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม และเพิ่มความแตกต่างระหว่างประชากรมากขึ้น ด้วยสถานการณ์ดังกล่าวจึงควรมีมาตรการเร่งด่วนในการปลูกฟื้นฟูไม้พะยูนในพื้นที่ขนาดใหญ่เพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมภายนอกถิ่นกำเนิด (*ex situ*) ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้

สามารถคัดเลือกแหล่งพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นต้นพันธุ์ในการอนุรักษ์ภายนอกถิ่นกำเนิด (*ex situ*) ได้ โดยพิจารณาจากประชากรที่เป็นป่าธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ดังประชากรต่อไปนี้ ป่าดงนาทาม จ.อุบลราชธานี (DU) อุทยานแห่งชาติภูผาเทิบ จ.มุกดาหาร (PM) อุทยานแห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์ (TB) ป่าโคกข้าว จ.มหาสารคาม (KM) อุทยานแห่งชาติภูแล่นคา จ.ชัยภูมิ (PC) และ อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี (MS)



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การทดสอบวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของเปลือกไม้ชั้นใน เนื้อไม้ส่วนกระพี้และใบของ ต้นพะยุง สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ทั้ง 6 วิธี ซึ่งมีปริมาณคุณภาพดีเอ็นเอและความสามารถในการเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกันไปในแต่ละวิธี โดยวิธีประยุกต์ของ Sharma *et al.* (2002) ประสบ ความสำเร็จมากที่สุดในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเปลือกไม้ชั้นใน เนื้อไม้ส่วนกระพี้และใบ

การศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างพันธุกรรมของไม้พะยุงรวม 108 ตัวอย่างใน 10 ประชากรที่อยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของไทย รวมถึงประเทศลาว โดย ตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน non-coding regions ของคลอโรพลาสต์ จีโนมจำนวน 8 ส่วน พบว่าส่วนที่เหมาะสมที่มีความผันแปรได้แก่ส่วน *trnS-trnG* มีจำนวนรวม 469 นิวคลีโอไทด์ ส่วน *trnV-trnM* มีจำนวนรวม 664 นิวคลีโอไทด์ และส่วน *trnC-ycf6* มีจำนวน รวม 708 นิวคลีโอไทด์ และรวมทั้ง 3 ส่วนเข้าด้วยกันมีจำนวน 1,841 นิวคลีโอไทด์ โดยมีตำแหน่ง ที่มีความผันแปรรวม 10 ตำแหน่ง ได้แก่ SNP 8 ตำแหน่ง และINDEL 2 ตำแหน่ง

ผลการศึกษาพบรูปแบบดีเอ็นเอที่พบรวม 11 haplotype ซึ่งแต่ละ haplotype มีการปรากฏ ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน haplotype ที่พบมากที่สุดได้แก่ H1 ซึ่งพบใน 9 ประชากรจากทั้งหมด 10 ประชากร โดยคิดเป็น 61 % และมี 7 haplotype ที่พบเฉพาะประชากรใดประชากรหนึ่ง จำนวน haplotype ที่พบในแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 1-4 haplotype ความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ใน ระดับต่ำโดยมีค่า haplotype diversity (h) และค่า nucleotide diversity (π) เท่ากับ 0.608 และ 0.00033 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรไม้พะยุงที่ศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ไม่ปรากฏโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ชัดเจนหรือไม่ถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆ ทั้งนี้เนื่องจาก ประชากรส่วนใหญ่มีการปรากฏ H1 (common haplotype) ยกเว้นแต่ประชากร อุทยานแห่งชาติเขา ใหญ่ จ.สระบุรี ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ AMOVA ที่แสดงความผันแปรทางพันธุกรรมภายใน ประชากรมากกว่าความผันแปรระหว่างประชากร ส่วนค่า F_{ST} ที่อธิบายความแตกต่างระหว่าง ประชากร เมื่อวิเคราะห์โดยรวม INDEL และไม่รวม INDEL ให้ผลค่า F_{ST} ที่แตกต่างกัน โดยเมื่อ วิเคราะห์รวม INDEL ให้ค่า F_{ST} เท่ากับ 0.400 และวิเคราะห์ไม่รวม INDEL ให้ค่า F_{ST} เท่ากับ 0.172 ซึ่งผลดังกล่าวในการศึกษาครั้งนี้ได้พิจารณาค่า F_{ST} ที่วิเคราะห์รวม INDEL โดยพิจารณาจากการ

กระจายของ haplotype ร่วมด้วย พบว่าในประชากรอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี มี haplotype ที่จำเพาะต่อประชากรเดียวเท่านั้น และเป็น haplotype ที่เกิด mutation แบบ INDEL เป็นผลให้มีความแตกต่างระหว่างประชากรเพิ่มขึ้นโดยทำให้ค่า F_{ST} รวมสูงถึง 0.400 ส่วน การทดสอบสมมติฐานทางวิวัฒนาการของประชากร “Neutral theory” ด้วยค่าสถิติ Tajima's D และ Fu and Li's D^* and F^* พบว่าประชากรไม้พะยุงยังอยู่ภายใต้สมดุล แสดงว่าความผันแปรทาง พันธุกรรมในประชากร ไม้พะยุงที่ศึกษาได้รับอิทธิพลจากสมดุลระหว่าง mutation และ genetic drift

ข้อมูล haplotype ที่จำเพาะต่อประชากรเดียวและเป็นประชากรธรรมชาติ ซึ่งได้จากการ วิเคราะห์โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *trnS-trnG trnV-trnM* และ *trnC-ycf6* เข้าด้วยกัน ได้แก่ H3 และ H5 ที่พบเฉพาะอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ต.มวกเหล็กใน จ.สระบุรี H7 พบเฉพาะ ประชากรอุทยานแห่งชาติตาพระยา จ.บุรีรัมย์ H10 พบเฉพาะ ป่าโคกข้าว จ.มหาสารคาม และ H11 พบเฉพาะอุทยานแห่งชาติภูแล่นคา จ.ชัยภูมิ ข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางพัฒนา เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านการบ่งชี้แหล่งกำเนิดหรือแหล่งที่มาของไม้พะยุงภายใน อนาคต

ข้อเสนอแนะ

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในครั้งนี้ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก ส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมซึ่งถ่ายทอดสารพันธุกรรมผ่านทางแม่ฝ่ายเดียวเท่านั้น รูปแบบดีเอ็นเอ ส่วนใหญ่จึงเหมือนกับแม่ ความผันแปรทางพันธุกรรมจะมีน้อยกว่าในนิวเคลียร์จีโนม เพราะฉะนั้น ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมเมื่อวิเคราะห์ด้วยส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนมจึงมีค่าต่ำ อย่างไรก็ตามการศึกษาหลากหลายทางพันธุกรรมจึงควรศึกษาเพิ่มจากส่วนของนิวเคลียร์จีโนมร่วม ด้วย โดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ เช่น เครื่องหมาย SSR เครื่องหมาย AFLP

การศึกษาด้านการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ด้าน การแสดงแหล่งกำเนิดหรือแหล่งที่มาของไม้พะยุงในอนาคต ควรมีการนำไปศึกษาวิจัยเพิ่มเติม เพื่อให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์มากที่สุด โดยควรศึกษาเพิ่มเติมในด้านต่างๆ ได้แก่ เพิ่มส่วนที่ใช้ ศึกษาของคลอโรพลาสต์จีโนม เพิ่มจำนวนต้นต่อประชากร เพิ่มแหล่งประชากรให้ครอบคลุมพื้นที่ ที่มีการกระจายของไม้พะยุงทั้งหมดทั้งภายในประเทศ และประเทศเพื่อนบ้านที่พบการกระจายของ ไม้พะยุงอยู่ ได้แก่ ลาว กัมพูชา และเวียดนาม

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 2550. ข้อมูลสถิติอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 110 หน้า.

ชินะ ชำรงค์ธรรม. 2553. **Genomics: ปฐมบทแห่งชีววิทยาในยุค omics**. Thai bioinformatics E-magazine. แหล่งที่มา: http://thaibioinfonetwork.blogspot.com/2010_07_01_archive.html, 9 มีนาคม 2555.

ชัยสิทธิ์ เลี้ยงศิริ, ประเสริฐ ดิยานนท์, อภรณ์ สืบคา และ สันติ กิตติบรรพชา. 2536. ไม้พะยุง, น. 125-130. ใน การปลูกป่า. สำนักส่งเสริมการปลูกป่า กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

นนทวรรณ มนตรี. 2555. **ตีแผ่วิกฤตตัดไม้พะยุง-ร้ายแรงเสี่ยงสูญพันธุ์**. แหล่งที่มา: http://www.khaosod.co.th/view_newsonline.php?newsid=TVRNeU9ESTFOVFEExTUE9PQ==, 10 กุมภาพันธ์ 2555.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2550. **พันธุศาสตร์ประชากรและปริมาณ**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เพลิน พิมพ์อารัญ. 2555. **เกาะติดขบวนการโค่นป่าตัดไม้พะยุงส่งขาย ไม้มงคล-ราคาสูง ความเชื่อบวกแรงงูใจคนทำผิด**. แหล่งที่มา: <http://www.dailynews.co.th/thailand/153679>, 20 ธันวาคม 2555.

วิสุทธิ ใบไม้. 2536. **พันธุศาสตร์**. พิมพ์ครั้งที่ 3. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2547. **พันธุศาสตร์โมเลกุล**. สำนักพิมพ์โพธิ์เพชร, กรุงเทพฯ.

สยามรัฐ. 2555. **จับพะยุง 2 ราย กลางป่าภูพาน ยึดของกลางเพียบ**. แหล่งที่มา: <http://www.siamrath.co.th/web/>, 20 ธันวาคม 2555.

สุจิตรา จางตระกูล. 2551. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ และไอโซเอ็นไซม์ยืนเพื่อการประเมินสถานภาพแหล่งทรัพยากรทางพันธุกรรมป่าไม้. กลุ่มงานพันธุกรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพ, สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

สุจิตรา จางตระกูล, กิตติยา สิงห์ทอง และ ชุลินา ลาภสงผล. 2552. ความก้าวหน้าในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในไม้พะยุง, น. 287-291. ใน รายงานการประชุมพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 16 เรื่อง “พันธุศาสตร์แก้วิกฤตพลังงานชาติ”. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต อ. คลองหลวง จ.ปทุมธานี.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอฟแอล-พี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ กรมป่าไม้. 2555. ป่าพะยุงแหล่งผืนป่าสุดท้ายของโลก. แหล่งที่มา: http://biodiversity.forest.go.th/index.php?option=com_content&view=article&id=327:2012-02-18-04-48-33&catid=25:the-project&Itemid=68, 20 ธันวาคม 2555

สำนักป้องกันปราบปราม และป้องกันไฟป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 2555. สรุปรายงานสถิติคดีเกี่ยวกับป่าไม้ ของหน่วยงานในสังกัดกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ปีงบประมาณ 2555. 26 หน้า.

Andrew, L. 2007. Can we use DNA to identify the geographic origin of tropical timber?, pp. 6-12. In B. Degen, ed. **Fingerprinting methods for the identification of timber origin**. Born, Germany.

- Andrianoelina, O., H. Rakotondraoelina, L. Ramamonjisoa, J. Maley, P. Danthu and J. Bouvet. 2006. Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae) an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar. **Biodivers. Conserv.** 15: 1109-1128.
- Artyukova, E.V., M.M. Kozyrenko, P.G. Gorovoy and Y.N. Zhuravlev. 2009. Plastid DNA variation in highly fragmented populations of *Microbiota decussate* Kom. (Cupressaceae), an endemic to Sikhote Alin Mountains. **Genetica** 137: 201-212.
- Borsch, T. and D. Quandt. 2009. Mutational dynamics and phylogenetic utility of noncoding chloroplast DNA. **Plant Syst. Evol.** 282: 169-199.
- Caver, S., C. Navarro, R. Hopkins, R.A. Ennos and A.J. Lowe. 2005. Regional and population-scale influences on genetic diversity partitioning within Costa Rican populations of the pioneer tree *Vochysia ferruginea* Mart. **Silvae Genet.** 54. 258-264.
- Cheng, Y.P., S.Y. Hwang and T.P. Lin. 2005. Potential refugia in Taiwan revealed by the phylogeographical study of *Castanopsis carlesii* Hayata (Fagaceae). **Mol. Ecol.** 14: 2075-2085.
- Chuayjaeng, S. 2005. **Chloroplast Diversity and Phylogeny in Wild and Cultivated Rice (*Oryza* spp.)**. M.S. Thesis, Kasetsart University.
- Cloutier, D., J.S.R. Pova, L.C. Procopio, N.V.M. Leao, L.H.O. Wadt, A.Y. Ciampi and D.J. Schoen. 2005. Chloroplast DNA variation of *Carapa guianensis* in the amazon basin. **Silvae Genet.** 54. 270-274.
- Collevatti, R.G., D. Grattapaglia and J.D. Hay. 2003. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Mol. Ecol.** 12: 105-115.

Deguilloux, M.F., M.H. Pemonge and R.J. Petit. 2002. Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. **Proc. R. Soc. Lond. B.** 269: 1039-1046.

_____, _____, L. Bertel, A. Kremer and R.J. Petit. 2003. Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools. **Mol. Ecol.** 12: 1629-1636.

_____, _____ and R.J. Petit. 2004. DNA-based control of oak wood geographic origin in the context of the cooperage industry. **Ann. For. Sci.** 61: 97-104.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15.

Drábková, L., J. Kirschner and C. Vlcek. 2002. Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. **Plant Mol. Biol. Rep.** 20: 161-175.

Excoffier, L. and H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol. Ecol. Resour.** 10: 564-567.

_____, P. Smouse and J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131: 479-491.

Finkeldey, R., L. Leinemann and O. Gailing. 2010. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 85: 1251-1258.

Frankham, R., J.D. Ballou and D.A. Briscoe. 2004. **A Primer of Conservation Genetics.** Cambridge University Press, New York.

Fu, Y.X. and W.H. Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics** 133: 693-709.

- Glémin, S., E. Bazin and D. Charlesworth. 2006. Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants. **Proc. Biol. Sci.** 273: 3011-3019.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41: 95-98.
- Halmilton, M.B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. **Mol. Ecol.** 8: 521-523.
- Hanski, I.A. and M.E. Gilpin. 1997. **Metapopulation dynamics: ecology, genetics, and evolution.** Academic Press, New York.
- Hedrick, P.W. 2011. **Genetics of Populations. 4th ed.** Jones and Bartlett Publishers Inc., USA.
- Hein, V.T.T. and D.T. Phong. 2012. Genetic diversity among endangered rare *Dalbergia cochinchinensis* (Fabaceae) genotypes in Vietnam revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Afr. J. Biotechnol.** 11: 8632-8644.
- IUCN. 2009. **IUCN red list of threatened species (version 2009.1).** IUCN. Available source: www.iucnredlist.org, August 14, 2009.
- Jobes, D.V., D.L. Hurley and L.B. Thien. 1995. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. **Taxon** 44: 349-386.
- Juchum, F.S., J.B. Leal, L.M. Santos, M.P. Almeida, D. Ahnert and R.X. Correa. 2007. Evaluation of genetic diversity in a natural rosewood population (*Dalbergia nigra* Vell. Allemao ex Benth.) using RAPD markers. **Genet. Mol. Res.** 6: 543-553.

- Kapoor, S. and M. Sugiura. 1998. Expression and regulation of plastid genes, pp. 72-86. In A.S. Raghavendra, ed. **Photosynthesis: A Comprehensive Treatise**. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Keating, N.G. and E. Bolza. 1982. **Characteristics, Properties, and Uses of Timbers: South-east Asia, northern Australia, and the Pacific**. Vol. 1. Inkata Press, Melbourne.
- Kelchner, S.A. 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. **Ann. Missouri Bot. Gard** 87: 482-498.
- Kimura, M. 1983. **The Neutral Theory of Molecular Evolution**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kress, W.J., K.J. Wurdack, E.A. Zimmer, L.A. Weigt, and D.H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proc. Natl Acad. Sci.** 102: 8369-8374.
- Kuo, D.C., C.C. Lin, K.C. Ho, Y.P. Cheng, S.Y. Hwang and T.P. Lin. 2010. Two genetic divergence centers revealed by chloroplastic DNA variation in populations of *Cinnamomum kanehirae* Hay. **Conserv. Genet.** 11: 803-812.
- Lee, A.B. and T. A. Cooper. 1995. Improved direct PCR screen for bacterial colonies: wooden toothpicks inhibit PCR amplification. **Biotechniques** 18: 225-226.
- Lei, M., Q. Wang, Z. Wu, J. López-Pujol, D. Li and Z. Zhang. 2012. Molecular phylogeography of *Fagus engleriana* (Fagaceae) in subtropical China: limited admixture among multiple refugia. **Tree Genet. Genome** 8: 1203-1202.
- Li, X.-H., J.-W. Shao, C. Lu, X.-P. Zhang and Y.-X. QIU. 2012. Chloroplast phylogeography of a temperate tree *Pteroceltis tatarinowii* (Ulmaceae) in China. **J. Syst. Evol.** 50: 325-333.

- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25:1451-1452.
- Loomis, D.V. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles. **Methods Enzymol.** 31: 528-544.
- Lowe, A., S. Harris and P. Ashton. 2004. **Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application.** Blackwell Publishing, Malden, MA, USA.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert. 1977. A new method for sequencing DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 74: 560-564.
- Nei M. and S. Kumar . 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics.** Oxford University Press, New York.
- Nielsen, L.R. and E.D. Kjaer. 2008. **Tracing timber from forest to consumer with DNA markers.** Danish Minish Ministry of the Environment, Forest and Nature Agency. Available Source: <http://www.skovognatur.dk/udgivelser>, May 29, 2009.
- Niyomdham, C. 2002. An account of *Dalbergia* (Leguminosae-Papilionoidae) in Thailand. **Thai For. Bull.** 30: 124-166.
- Novaes, R.M.L., J.G. Rodrigues and M.B. Lovato. 2009. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. **Genet. Mol. Res.** 8: 86-96.
- Petit, R.J., A. Kremer and D.B. Wagner. 1993. Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. **Heredity** 71: 603-641.

- _____, U.M. Csaikl, S. Bordács, K. Burg, E. Coart, J. Cottrell, B. van Dam, J.D. Deans, S.D.-Lapègue, S. Fineschi, R. Finkeldey, A. Gillies, I. Glaz, P.G. Goicoechea, J.S. Jensen, A.O. König, A.J. Lowe, S.F. Madsen, G. Mátyás, R.C. Munro, M. Olalde, M.-H. Pemonge, F. Popescu, D. Slade, H. Tabbener, D. Turchini, S.G.M. de Vries, B. Ziegenhagen, and A. Kremer. 2002. Chloroplast DNA variation in European white oaks phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. **For. Ecol. Manage.** 156: 5–26.
- _____, I. Aguinagalde, J.L. de Beaulieu, C. Bittkau, S. Brewer, R. Cheddadi, R. Ennos, S. Fineschi, D. Grivet, M. Lascoux, A. Mohanty, G. Muller-Starck, B. Demesure-Musch, A. Palme, J.P. Martin, S. Rendell and G.G. Vendramin. 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. **Science** 300: 1563-1565.
- Pirttilä, A.M., M. Hirsikorpi, T. Kämäräinen, L. Jaakola and A. Hohtola. 2001. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. **Plant Mol. Biol. Rep.** 19: 273a-273f.
- Pleines, T., S.S. Jakob and F.R. Blattner. 2009. Application of non-coding regions in intraspecific analyses. **Plant Syst. Evol.** 282: 281-294.
- Rachmayanti, Y., L. Leinemann, O. Gailing and R. Finkeldey. 2006. Extraction, amplification and characterization of wood DNA from Dipterocarpaceae. **Plant Mol. Biol. Rep.** 24: 45–55.
- Ramos, A.C.S., J.P.D. Lemos-Filho and M.B. Lovato. 2009. Phylogeographical structure of the Neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. **J. Hered.** 100: 206-216.
- Ribeiro, R.A. and M.B. Lovato. 2007. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. **Genet. Mol. Res.** 6: 173-187.

- _____, J.P. Lemos-Filho, A.C.S. Ramos and M.B. Lovato. 2010. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity** 106: 46-57.
- Rout, G.R., D. Bhattacharya, R.M. Nanda, S. Nayak and P. Das. 2003. Evaluation of genetic relationships in *Dalbergia* species using RAPD markers. **Biodivers. Conserv.** 12: 197-206.
- Sambrook, J. E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen and Coulson. 1977. A DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 74: 4298-5467.
- Saranpää, P. 1988. Plastids and glycolipids in the stem wood of *Pinus sylvestris* L. **Tree** 2: 180-187.
- Scott, K.D and J. Playford. 1996. DNA extraction technique for PCR in rain forest plant species. **Biotechniques** 20: 974-979.
- Sharma, A.D., P.K. Gill and P. Singh. 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. **Plant Mol. Biol. Rep.** 20: 415a-415f.
- Shaw, J., E.B. Lickey, E.E. Schilling, R.L. Small, J. T. Beck, S.B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K.C. Siripun and C.T. Winder. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **Am. J. Bot.** 92: 142-166.
- Shaw, J., E.B. Lickey, E.E. Schilling and R.L. Small. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperm: the tortoise and the hare III. **Am. J. Bot.** 94: 275-288.

- Simmons, M. P. and H. Ochoterena. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. **Syst. Biol.** 49: 369-381.
- Soltis, D.E. and P.S. Soltis. 1998. Choosing and approach and appropriate gene for phylogenetic analysis, pp. 1-42. *In* D.E. Soltis and J.J. Doyle, eds. **Molecular Systematics of Plant II: DNA Sequencing**. Kluwer Academic, Norwell, Massachusetts.
- Soonhuae, P., C. Piewluang and T. Boyle. 1994. **Population Genetics of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre and Implications for Genetic Conservation**. Asean Forest Tree Seed Centre Project. Muak-Lek, Saraburi, Thailand.
- Sugiura, M., T. Hirose and M. Sugita. 1998. Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. **Annu. Rev. Genet.** 32: 437-459.
- Surzycki, S. 2000. **Basic Techniques in Molecular Biology**. Springer-Verlag, Germany.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Platou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Mol. Biol.** 17: 1105-1109.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** 123: 585-595.
- Tangphatsornruang, S., D. Sangsrakru, J. Chanprasert, P. Uthaipaisanwong, T. Yoocha, N. Jomchai and S. Tragoonrung. 2010. The chloroplast genome sequence of mungbean (*Vigna radiata*) determined by high-throughput pyrosequencing: structural organization and phylogenetic relationships. **DNA Res.** 17: 11-22.
- Tnah, L.H., S.L. Lee, K.K.S. Ng, N. Tani, S. Bhassu and R.Y. Othman. 2009. Geographical traceability of an important tropical timber (*Neobalanocarpus heimii*) inferred from chloroplast DNA. **For. Ecol. Manage.** 258: 1918-1923.

UN Cartographic Section. 2004. **Map of Thailand, No. 3853 Rev. 1.** Available Source:
<http://www.unhcr.org/refworld/docid/460a72dd2.html>, April 11, 2012.

Watterson, G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. **Theor. Pop. Biol.** 7: 256-276.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White., eds. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, New York.

Yuan, J.-H., F.Y. Cheng and S.L. Zhou. 2011. The phylogeographic structure and conservation genetics of the endangered tree peony, *Paeonia rockii* (Paeoniaceae), inferred from chloroplast gene sequences. **Conserv. Genet.** 12: 1539-1549.



ภาคผนวก



สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ วัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ
 - 1.1 ไนโตรเจนเหลว
 - 1.2 Sodium chloride (NaCl)
 - 1.3 Chloroform (CHCl_3)
 - 1.4 *N*-Lauroylsarcosine, neat [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CON}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOH}$]
 - 1.5 Isoamyl-alcohol [$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$]
 - 1.6 Tris base [$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$]
 - 1.7 Ethylenediamine tetraacetate acid; EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 - 1.8 Hexadecyltrimethylammonium bromide; CTAB [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$]
 - 1.9 Sodium acetate; NaOAc (CH_3COONa)
 - 1.10 Isopropanol [$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$]
 - 1.11 Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
 - 1.12 Polyvinylpyrrolidone; PVP; [$(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$]
 - 1.13 β -mercaptoethanol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)
 - 1.14 Sodium dodecyl sulfate; SDS [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$]
 - 1.15 Potassium acetate; KOAc (CH_3COOK)
 - 1.16 Bovine serum albumin
 - 1.17 D-Sorbitol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$)
 - 1.18 Ammonium acetate; NH_4OAc ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$)
 - 1.19 1X TAE buffer (40 mM Tris - Acetate , 1 mM EDTA pH 8.0)
 - 1.20 Ethydium bromide ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$)
 - 1.21 1Kb DNA Ladder (New England BioLabs, USA)
 - 1.22 ฟ้า agarose
 - 1.23 6X loading dye (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol)

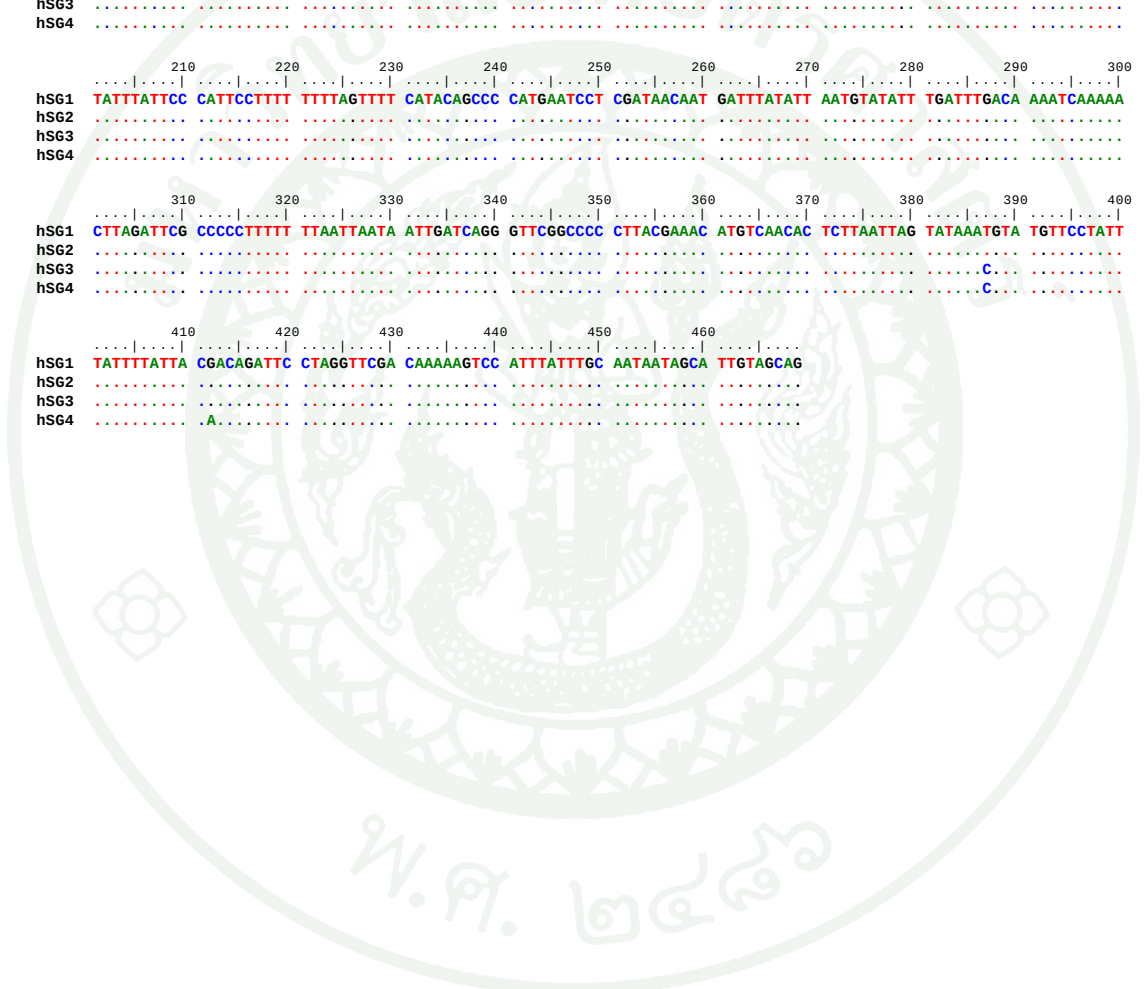
2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์
 - 2.1 dNTP mix: dATP dCTP dGTP และ dTTP
 - 2.2 DNA polymerase (RBC Taq DNA Polymerase, RBC Bioscience, Taiwan)
 - 2.3 Albumin from bovine serum (BSA)
 - 2.4 Forward primer และ Reward primer (บริษัทแปซิฟิก ไชเอ็นซ์)
 - 2.5 Exonuclease I (Fermentas, USA)
 - 2.6 FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas, USA)
 - 2.7 Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)



ภาคผนวก ข

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละ haplotype ในแต่ละส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนมที่ใช้ศึกษาในไม้
พะยุง

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละ haplotype จากส่วน *trnS-trnG* ที่มีความยาว 469 นิวคลีโอไทด์
รวม 4 haplotype ของไม้พะยูนที่ใช้ศึกษา



```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
hSG1  GAACAAAAG TAGGGCTTGA AAAACGACTT TTTTATTTAT ATCTTATCTC TTTTCTATT TGATTCTTTC TAATGGTCAT TTCATTATTC TAATTATAGA
hSG2  .....
hSG3  .....
hSG4  .....

     110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
hSG1  ACATTACATA TATATTATTA TTTCTATATT ATTATTAAAA TTCTATTTCAT TTATATATAT TCATTATATAT ATATAAATGA ATATATATAT CTCATATTTT
hSG2  .....G.....
hSG3  .....
hSG4  .....

     210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
hSG1  TATTTATTCC CATTCTTTT TTTTAGTTTT CATACAGCCC CATGAATCCT CGATAACAAT GATTTATATT AATGTATATT TGATTTGACA AAATCAAAAA
hSG2  .....
hSG3  .....
hSG4  .....

     310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
hSG1  CTTAGATTGG CCCCCTTTT TTAATTAATA ATTGATCAGG GTTCGGCCCC CTTACGAAAC ATGTCAACAC TCTTAATTAG TATAAATGTA TGTTCCCTATT
hSG2  .....
hSG3  .....
hSG4  .....C.....

     410     420     430     440     450     460
hSG1  TATTTTATTA CGACAGATTC CTAGGTTTGA CAAAAGTCC ATTTATTTGC AATAATAGCA TTGTAGCAG
hSG2  .....
hSG3  .....
hSG4  .....A.....

```

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละ haplotype จากส่วน *trnV-trnM* ที่มีความยาวตั้งแต่ 653 ถึง 664
 นิวคลีโอไทด์ รวม 4 haplotype ของไม้พะยูนที่ใช้ศึกษา

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
hVM1	GCATTTTT	TGCATTGGGC	TTTTTCATTA	ACTGATATTT	TTACCACTTA	GTCGATCATC	TTTTTCTTG	ACAGAAAGAA	TAAGAAGATG	ACTCCCTGTG
hVM2										
hVM3										
hVM4										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
hVM1	CTCTAATTTT	TGATTTTGGT	CACAATCACA	ATCAAGAGGC	ACTACCAAG	TGTTTCAAAG	AAGGAGGGGT	TATCCTGACG	TAGGTCTGCT	TCTGGCCTAG
hVM2										
hVM3										
hVM4										
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
hVM1	ATCAACTTAA	GTTTAATGGA	TTCTCTATCA	ACCTACTATA	CTAAAAAAA	AAATGAAAGT	ATCAATAGG	AAATGAAACC	TTATACACCT	TGAAGTTCAT
hVM2										
hVM3										
hVM4										
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
hVM1	AAGATAGGAC	GAAAAGCGAA	TTTTTTTGG	GTACCTATAC	TCATTATGCC	TAGCATTGAA	TAGACTGGGT	ATTACACCTA	TCAATATTCT	CAATCAATG
hVM2										
hVM3										
hVM4										
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
hVM1	ATGGATTCTA	CTTGATGTCT	AAACCCTTTG	TCAGGCTATT	GTTCTCTTGT	TTGTTCCTCT	ATAAAGTGA	GTAAGACATC	GATTTTCTCA	TAAGATCAAC
hVM2										
hVM3										
hVM4										
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
hVM1	TCTTTTGATT	ACATGATGGA	CTCCTCTGAA	AAACAAACAT	TGGCGCGCCT	GTAACGAGG	CGCTCTACCT	AACTGAGCTA	TAGCCCTTGT	GCTTTTGATA
hVM2										
hVM3										
hVM4										
	610	620	630	640	650	660				
hVM1	CATATTTTAT	CATATTATGT	AGAAAAATTC	TTGTCAAGAT	GAATATTATA	TGATCAAATC	TTTT			
hVM2			C.							
hVM3										
hVM4										

3. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละ haplotype จากส่วน *trnC-ycf6* ที่มีความยาว 708 นิวคลีโอไทด์
รวม 5 haplotype ของไม้พะยูนที่ใช้ศึกษา

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
hCN1	AACTTGCATT	GCATGGGGGG	GGGGTTGCTC	TCTAAATAA	AGCTTTGCGT	CACATAATTCA	AGGAAAGATT	CTAGTAGTGA	AAAGGAATCG	ATAATCTTG
hCN2										
hCN3										
hCN4										
hCN5										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
hCN1	AGATGATAGT	CCTTTCACCC	CATTACTACT	GTAAGTCCCA	TCTAGTCTAC	TGAGCGGGTC	TTGAATTAGA	TTGGATAAGT	ATGTATAGGT	CGAACAGAGA
hCN2										
hCN3										
hCN4										
hCN5										
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
hCN1	GAATCTAATT	CTATTTTATG	TTGGAGAAGA	GGCAGAAGAA	ACCTTGCATA	CAGACTCATG	AAAGTATATG	AACGTTCTGG	CAGTTATTCA	ATATTAGTTA
hCN2										
hCN3										
hCN4										
hCN5										
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
hCN1	GATTGAATAC	CTAATTTAGA	TTGAATAGCT	AATTGGCTTT	CTTTTATTATA	ATTTATATTA	TTATTTAATA	TAAATATAAT	CCATTTTTTT	AATTTTCGGT
hCN2										
hCN3										
hCN4										
hCN5										
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
hCN1	AACTCTATA	GTGGAAGAAA	GAGTTTAATA	GACTTTTCTC	TGATTGTTTT	CGAGAATGAA	TTGAGAGACA	GTAAAGATTG	GATCAAAATG	AAATAAGAAA
hCN2										
hCN3										
hCN4										
hCN5										
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
hCN1	GAGTATGCAA	AGTAATCAGT	CTTGATTCTA	TATATATAGA	TTTTTCATTAA	AATGAGGGGA	AATAAAAACA	TAGGCTCTTG	TATTGTTACC	TGTTAGTAAC
hCN2										
hCN3										
hCN4										
hCN5										
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
hCN1	AAAAATATCC	TTAATAC TTC	CAAGGAAGTT	TCCGAATATT	TTGTTTATCC	GTAAATGTTT	CCGATTCTAC	TAGAAATCAG	CTAAGAACTT	GTTAGACGTT
hCN2										
hCN3										
hCN4										
hCN5										
hCN1		CTAATTGG								
hCN2										
hCN3										
hCN4			G.....							
hCN5			T.....							

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวราตรี อยู่เย็น

เกิดวันที่ 9 มีนาคม 2526

สถานที่เกิด โรงพยาบาลชลประทาน อำเภopakเกร็ด จังหวัดนนทบุรี

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยนักวิจัย

สถานที่ทำงานปัจจุบัน สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช

ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -

ทุนการศึกษาที่ได้รับ -