ว.วิทย. มข. 48(2) 218-226 (2563) KKU Sci. J. 48(2) 218-226 (2020)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูงในแปลงปลูก 5 แห่งของประเทศไทย

Genetic Diversity of Siamese Rosewood (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) in 5 Plantations of Thailand

สุวิมล อุทัยรัศมี[1*] สุธีร์ ดวงใจ[1] และ สุวรรณ ตั้งมิตรเจริญ[2]

[1]ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[2]กรมป่าไม้ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Suwimon Uthairatsamee[1*] Sutee Duangjai[1] and Suwan Tangmitchareon[2]

[1]Department of Forest Biology, Faculty of Forestry, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, 10900 Thailand.

[2]Royal Forest Department, Chatuchak, Bangkok, 10900 Thailand.

[*]Corresponding Author, E-mail: fforsmu@ku.ac.th

Received: 1 June 2019 | Revised: 19 December 2019| Accepted: 5 February 2020

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูงในแปลงปลูกที่มีการจัดการดูแลอย่างดี 5 แห่ง ได้แก่ สถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียว สวนป่าคลองตะเกรา สวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะ สถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน และสถานีวนวัฒนวิจัยหมูสี โดยทำการเก็บตัวอย่างใบแห่งละ 30 ต้น มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) ผลการศึกษาพบว่า ตัวอย่างพะยูงที่เก็บมาทั้งหมด 150 ต้นตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 10 ไพรเมอร์ ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบ 76 แถบ โดยในระดับชนิดพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ประเมินจากค่า percentage of polymorphic loci (% *P*), heterozygosity (H_e) และ Shannon's information index (*I*) มีค่าสูง (*P* = 81.58 % H_e = 0.2904 *I* = 0.4336) ซึ่งพะยูงจากแปลงปลูกสถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ สถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน สวนป่าคลองตะเกรา สถานีวนวัฒนวิจัยหมูสี และสวนป่าท่ากุ่ม-โนโบรุอุเมดะ ตามลำดับ และจากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี Unweighted pair group method of arithmetic average (UPGMA) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยสวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ถูกแยกออกมาจากอีก 4 แห่งอย่างชัดเจน ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การปลูกพะยูงในลักษณะแปลงปลูกหรือสวนป่าเป็นวิธีการหนึ่งที่ดีที่จะสามารถรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้ได้ ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจึงต้องรีบดำเนินการอย่างเร่งด่วนในการเก็บรวบรวมพันธุกรรมของพะยูง ไม่ว่าจะเป็นเมล็ดหรือกิ่งพันธุ์จากแหล่งต่าง ๆ มาปลูกรวมกัน (*ex situ* gene conservation) เพื่อช่วยรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ชนิดนี้ไว้

ABSTRACT

The objective of this study was to assess genetic diversity of *Dalbergia cochinchinensis* in five intensively managed plantations, including Wang Nam Khiao Forestry Research and Student Training Station (WK), Klongtakao Plantation (KK), Tagum Noboru Umeda Plantation (TU), Dong Lan Silvicultural Research Station (DL), and Mu Si Silvicultural Research Station (MS). Leaves of 30 individual trees in each plantation were collected for genetic diversity study using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers technique. From total 150 samples, 10 primers were appropriate to yield 76 amplified bands. At species level, the percentage of polymorphic loci (% *P*), mean expected heterozygosity (H_e), and the Shannon's information index of diversity (*I*) were high (81.58 %, 0.2904, and 0.4336, respectively). Among the investigated of five populations, population from WK contained the highest genetic diversity, followed by population from DL, KK, MS and TU. Unweighted pair group method of arithmetic average (UPGMA) cluster analysis divided the populations into two main groups, which TU was separated from the other 4 plantations (WK, KK, DL and MS). The result of this study confirmed that *D. cochinchinensis* plantation is one of a good practices to maintain a high level of genetic diversity. Therefore, germplasm collection as seed or scion from various sources (*ex situ* gene conservation) should be the urgent tasks of the related organizations in order to maintain a high level in genetic diversity.

คำสำคัญ: พะยูง ความหลากหลายทางพันธุกรรม สวนป่า การอนุรักษ์พันธุกรรมนอกถิ่นกำเนิด

Keywords: *Dalbergia cochinchinensis,* genetic diversity, plantation, *ex situ* gene conservation

บทนำ

พะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) มีชื่อสามัญว่า Siam Rosewood หรือ Thailand Rosewood อยู่ในวงศ์ Fabaceae - Faboideae (Papilionoideae) (Niyomdham, 2002) เนื้อไม้โดยเฉพาะส่วนของแก่นนิยมนำมาทำเครื่องเรือน เครื่องตกแต่ง เนื่องจากมีสีสันและลวดลายที่สวยงามเป็นที่ต้องการของตลาด พะยูงถูกจัดอยู่ในบัญชีชนิดพันธุ์ที่ถูกคุกคามขององค์การระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ (The IUCN Red List of Threatened Species: IUCN Red List) โดยมีสถานะมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (Vulnerable: VU) (Asian Regional Workshop, 1998) สำหรับในประเทศไทยพะยูงจัดเป็นไม้หวงห้ามประเภท ก. ตามพระราชบัญญัติป่าไม้ พ.ศ. 2484 และยังถูกจัดอยู่ในบัญชีหมายเลข 2 ของอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (อนุสัญญาไซเตส) แม้ว่าพะยูงจะเป็นชนิดไม้ที่ถูกคุ้มครองตามกฎหมาย มีนโยบายและมาตราการในการป้องกันอนุรักษ์แล้วก็ตาม แต่ว่าในป่าธรรมชาตินั้นพะยูงยังคงถูกลักลอบตัดอย่างต่อเนื่อง และเป็นการยากสำหรับเจ้าหน้าที่ในการดูแลป้องกันเนื่องจากมีพื้นที่กว้างขวางจึงเป็นการเปิดโอกาสให้ขบวนการลักลอบตัดไม้สามารถที่หลบหลีกได้ โดยการตัดไม้พะยูงออกจากป่าธรรมชาติซึ่งถือว่าเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมตามธรรมชาติ (*in situ* gene conservation area) เป็นการลดความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ชนิดนี้ให้น้อยลง โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญต่อการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะเมื่อสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในด้านของการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีปริมาณและคุณภาพตรงตามความต้องการใช้ประโยชน์ รวมถึงความทนทานต่อโรคและแมลง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องรักษาฐานพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ๆ ให้มีความหลากหลายสูงนั่นเอง โดยแนวทางหนึ่งในการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมคือ การรวบรวมชนิดไม้นั้น ๆ จากแหล่งต่าง ๆ มาปลูกในแปลงปลูกหรือในลักษณะของสวนป่า ซึ่งจัดเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมนอกถิ่นกำเนิด (*ex situ* gene conservation) แบบหนึ่ง โดยมีข้อดีคือ ขนาดพื้นที่ที่ไม่ใหญ่มาก ทำให้สามารถจัดการดูแลและป้องกันการลักลอบตัดไม้ได้ดีกว่าในป่าธรรมชาติ สำหรับกรณีของพะยูงนั้น จากการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมจากแหล่งธรรมชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทยพบว่า พะยูงในป่าธรรมชาติมีความ

หลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับต่ำ (ราตรี, 2556) ดังนั้นการรวบรวมพันธุกรรมของพะยูงมาปลูกในลักษณะของแปลงปลูกหรือสวนป่าจึงเป็นสิ่งที่ต้องเร่งดำเนินการและต้องมีแผนที่ชัดเจนเกี่ยวกับการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย โดยในปัจจุบันมีแปลงปลูกพะยูงที่มีอายุมากกว่า 10 ปี และมีการจัดการเป็นอย่างดีที่อยู่ภายใต้การดูแลของกรมป่าไม้และองค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ (อ.อ.ป.) ประมาณ 20 แห่ง โดยแต่ละแห่งนั้นยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปใช้ในการวางแผนจัดการเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการใช้ประโยชน์เนื้อไม้ในอนาคต ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูงในแปลงปลูกบางแห่งในประเทศไทยที่มีศักยภาพในด้านการจัดการดูแลพื้นที่ ได้แก่ แปลงปลูกที่สถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียว สวนป่าคลองตะเกรา สวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะ สถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน และสถานีวนวัฒนวิจัยหมูสี โดยใช้เครื่องหมาย Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) ซึ่งมีข้อดีคือ ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบส ทำได้ง่าย รวดเร็ว และต้นทุนไม่สูงมากนัก

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างใบและการสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเก็บตัวอย่างใบพะยูงจากแปลงปลูกที่มีการจัดการป้องกันดูแลพื้นที่เป็นอย่างดีภายใต้ 3 หน่วยงาน ได้แก่ (1) คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 1 แห่ง คือ สถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา (2) องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ (อ.อ.ป.) จำนวน 2 แห่ง คือ สวนป่าคลองตะเกรา จังหวัดฉะเชิงเทรา และสวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะ จังหวัดตราด และ (3) กรมป่าไม้ จำนวน 2 แห่ง คือ สถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน จังหวัดขอนแก่น และสถานีวนวัฒนวิจัยหมูสี จังหวัดนครราชสีมา (ตารางที่ 1) ซึ่งแต่ละแห่งทำการเก็บตัวอย่างใบจำนวน 30 ต้นตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งหมด 150 ต้นตัวอย่าง จากนั้นนำใบที่เก็บได้มาบดแล้วจึงทำการล้างตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ออกก่อนด้วยสารละลาย Sorbital โดยใส่สารละลายลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างใบที่บดแล้ว และนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายในหลอดทดลองออกเหลือไว้แต่ตะกอน และทำซ้ำอีก 2-3 ครั้ง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ดัดแปลงตามวิธีการของ Tel-Zur et al. (1999) และทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมาย Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

ทำการหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยการนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องหมาย ISSR ซึ่งไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบได้จากการศึกษาของ Arif et al. (2009); Phong et al. (2011) และ Hien and Phong (2012) จำนวน 20 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ ISSR-02, ISSR-03, ISSR-08, ISSR-10, ISSR-11, ISSR-46, ISSR-49, ISSR-51, ISSR-52, ISSR-54, ISSR-55, ISSR-56, ISSR-59, ISSR-61, ISSR-62, ISSR-63, ISSR-64, ISSR-65, ISSR-67 และ ISSR-69 สำหรับการเตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ (25 นาโนกรัม) 1 ไมโครลิตร Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoScientific, U.S.) 5.4 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 0.4 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 5.2 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ C100™ Thermal Cycler (BIORAD) โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ขั้นที่หนึ่ง 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ขั้นที่สอง 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นที่สาม 50 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นที่สี่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที ทำซ้ำขั้นที่สองถึงขั้นที่สี่ จำนวน 34 รอบ และขั้นที่ห้า 72 องศาเซลเซียส 5 นาที และทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ 100 bp plus DNA ladder (Fermentas) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเปรียบเทียบ จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พร้อมทั้งบันทึกภาพเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมด โดยให้ข้อมูลแบบ binary และทำการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ให้สัญลักษณ์เป็น 1 ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันให้สัญลักษณ์เป็น 0 จากนั้น

คำนวณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ค่าตัวชี้วัดต่าง ๆ ได้แก่ ค่า percentage of polymorphic loci (% *P*), the mean expected heterozygosity (Nei, 1973) หรือ gene diversity (H_e) และ Shannon's information index (Lewontin, 1972) (*I*) โดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh et al., 1999) และคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Nei's unbiased genetic distance) โดยใช้โปรแกรม TFPGA version 1.3 (Miller, 1997) พร้อมทั้งจัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) โดยวิธี UPGMA (unweighted pair group method of arithmetic average) (Sneath and Sokal, 1973)

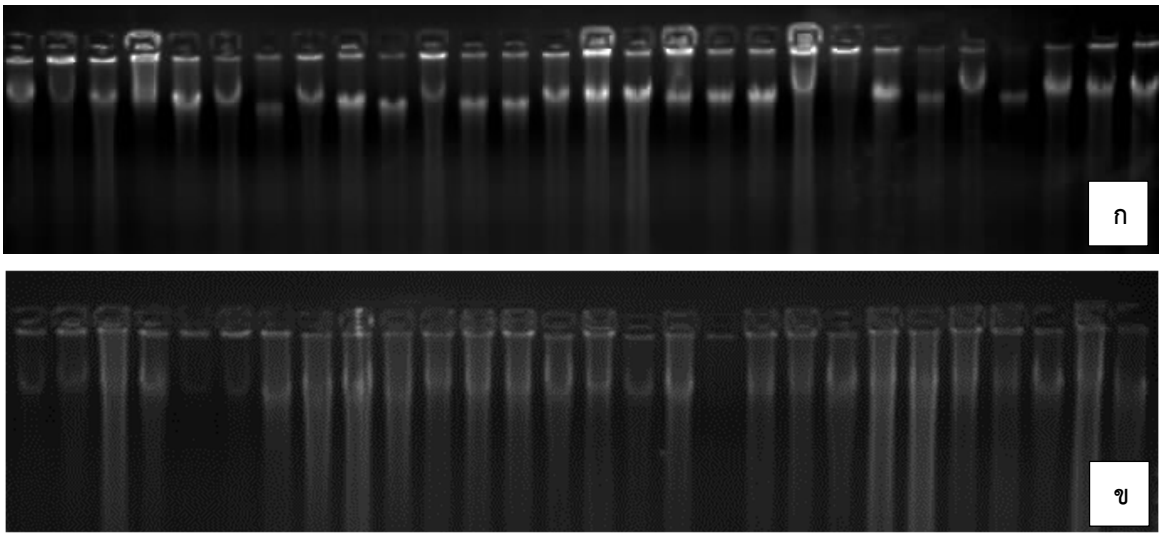
ตารางที่ 1 รายละเอียดแปลงปลูกพะยูงที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษา

แปลงปลูก	ที่ตั้ง	ปีที่ปลูก	ประเภทการปลูก	หมายเหตุ
1. สถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์ วังน้ำเขียว คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ตำบลอุดมทรัพย์ อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา	ไม่ระบุ	แปลงอนุรักษ์พันธุกรรม	ไม่ทราบประวัติกล้าไม้ที่ปลูก
2. สวนป่าคลองตะเกรา องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้	ตำบลท่าตะเกียบ อำเภอท่าตะเกียบ จังหวัดฉะเชิงเทรา	2520	แปลงอนุรักษ์พันธุกรรม	ไม่ทราบประวัติกล้าไม้ที่ปลูก
3. สวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะ องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้	ตำบลท่ากุ่ม อำเภอเมือง จังหวัดตราด	2522	แปลงอนุรักษ์พันธุกรรม	ไม่ทราบประวัติกล้าไม้ที่ปลูก
4. สถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน กรมป่าไม้	ตำบลนาหนองทุ่ม อำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น	2542	แปลงอนุรักษ์พันธุกรรม	กล้าไม้ได้จากแหล่งเมล็ดไม้ 24 แหล่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
5. สถานีวนวัฒนวิจัยหมูสี กรมป่าไม้	ตำบลหมูสี อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	2530	แปลงอนุรักษ์พันธุกรรม และสวนผลิตเมล็ด	กล้าไม้ได้จากแหล่งเมล็ดไม้ 7 แหล่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

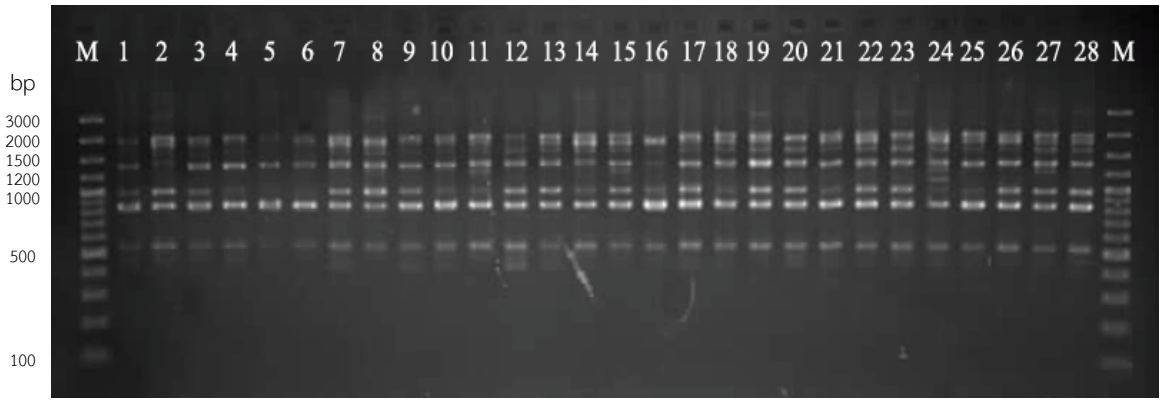
ผลการวิจัย

1. ลักษณะของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบพะยูง

จากการสกัดดีเอ็นเอใบพะยูงจำนวนทั้งสิ้น 150 ต้น ตัวอย่างจากแปลงปลูก 5 แห่ง ด้วยสารละลาย CTAB ดัดแปลงตามวิธีการของ Tel-Zur et al. (1999) และล้างตะกอนพอลีแซคาไรด์ด้วยสารละลาย Sorbital พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้ส่วนใหญ่มีการแตกหัก ทำให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีลักษณะไม่ชัดเจน (รูปที่ 1) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีและมองเห็นได้ค่อนข้างชัดเจน (รูปที่ 2) นอกจากนี้พบว่า การใช้ใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอจะทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีกว่าการใช้ใบแก่ เช่น ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนที่เก็บมาจากสถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียวที่ส่วนใหญ่เป็นใบเพิ่งผลิออกมาใหม่ โดยจะเห็นได้ว่าแถบดีเอ็นเอมีการปรากฏอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงถึงดีเอ็นเอที่สกัดได้มีลักษณะที่ดี พบการแตกหักน้อย (รูปที่ 1ก) ในขณะที่ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบแก่ที่เก็บมาจากสถานีวนวัฒนวิจัยดงลานและสถานีวนวัฒนวิจัยหมูสีมีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน (รูปที่ 1ข)



รูปที่ 1 ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis*); (ก) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อนพะยูง เก็บจากสถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียว (ข) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากใบแก่พะยูง เก็บจากสถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน



รูปที่ 2 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis*) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมาย Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) ไพรเมอร์ ISSR-08 (M คือ 100 bp DNA ladder)

2. ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษา

จากการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ที่มีรายงานว่ามีการนำมาใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นไม้ในสกุล *Dalbergia* (Arif et al., 2009; Phong et al., 2011; Hien and Phong, 2012) พบว่า มีไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้เพียง 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ ISSR-08, ISSR-46, ISSR-49, ISSR-52, ISSR-56, ISSR-59, ISSR-61, ISSR-63, ISSR-65 และ ISSR-67 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอได้จำนวนมาก มีความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอ และมีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน (polymorphism) ในสัดส่วนที่สูง โดยพบว่าให้จำนวนแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 3-10 แถบ และมีขนาดตั้งแต่ 250-2,500 base pair (bp) ซึ่งไพรเมอร์ ISSR-46 และ ISSR-61 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด (10 แถบ) ในขณะที่ไพรเมอร์ ISSR-52 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด (3 แถบ) สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีค่า % polymorphic เฉลี่ยเท่ากับ 81.58 % มีค่าอยู่ระหว่าง 57.14-100 % และไพรเมอร์ที่มีค่า % polymorphic สูงสุดคือ ไพรเมอร์ ISSR-49 มีค่าเท่ากับ 100 % รองลงมาได้แก่ ISSR-46 และ ISSR-61 (90.00 %) ISSR-08 และ ISSR-56 (85.71 %) ISSR-59 และ ISSR-65 (75.00 %) ISSR-67 (71.43 %) ISSR-52 (66.67 %) และ ISSR-63 (57.14 %) ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

3. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูงในแปลงปลูก

ความหลากหลายทางพันธุกรรมในการศึกษาครั้งนี้พิจารณาจากค่า percentage of polymorphic loci (% *P*), heterozygosity หรือ gene diversity (H_e) และ Shanon's information index (*I*) โดยพบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูงทั้ง 5 แปลงปลูกในระดับชนิด (species level) มีค่า *P* = 81.58 % H_e = 0.2904 และ *I* = 0.4336 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยความหลากหลายทางพันธุกรรมของทั้ง 5 แปลงปลูก (population level) มีค่าน้อยกว่า โดยมีค่า *P* = 59.21 % H_e = 0.2172 และ *I* = 0.3213 ซึ่งพะยูงจากสถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด (*P* = 65.79 % H_e = 0.2567 *I* = 0.3754) รองลงมาได้แก่ สถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน (*P* = 63.16 % H_e = 0.2333 *I* = 0.3460) สวนป่าคลองตะเกรา (*P* = 60.53 % H_e = 0.2213 *I* = 0.3271) สถานีวนวัฒนวิจัยหมูสี (*P* = 55.26 % H_e = 00.1964 *I* = 0.2925) และสวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะ (*P* = 51.32 % H_e = 0.1784 *I* = 0.2657) ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

4. ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างแปลงปลูก

จากการศึกษาความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมพบว่าพะยูงในสถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียวมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับพะยูงในสวนป่าคลองตะเกรามากที่สุด (0.9398) ในขณะที่พะยูงในสวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับพะยูงในแหล่งอื่น ๆ น้อยที่สุด (ตารางที่ 4) และจากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถแบ่งกลุ่มพะยูงในแปลงปลูกที่ทำการศึกษาออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย พะยูงในแปลงปลูกสถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียว สวนป่าคลองตะเกรา สถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน และสถานีวนวัฒนวิจัยหมูสี และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ พะยูงจากสวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะ (รูปที่ 3)

ตารางที่ 2 ขนาดและจำนวนแถบดีเอ็นเอของพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis*) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมาย Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (base pair, bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน	% Polymorphic
ISSR-08	$(GAA)_6$	450-2,000	7	1	6	85.71
ISSR-46	$(AG)_8T$	300-1,700	10	1	9	90.00
ISSR-49	$(GA)_8T$	300-2,500	9	0	9	100.00
ISSR-52	$(CT)_8G$	750-1,350	3	1	2	66.67
ISSR-56	$(AC)_8G$	700-2,200	7	1	6	85.71
ISSR-59	$(GA)_8CT$	250-1,600	8	2	6	75.00
ISSR-61	$(AC)_8TG$	500-2,500	10	1	9	90.00
ISSR-63	$CTC(GA)_7$	400-1,350	7	3	4	57.14
ISSR-65	$CAC(TG)_7$	400-1,300	8	2	6	75.00
ISSR-67	$(ATG)_6$	700-2,000	7	2	5	71.43
	ผลรวม		**76**	**14**	**62**	
	ค่าเฉลี่ย		**7.60**	**1.4**	**6.20**	**81.58**
	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		**2.01**	**0.84**	**2.30**	

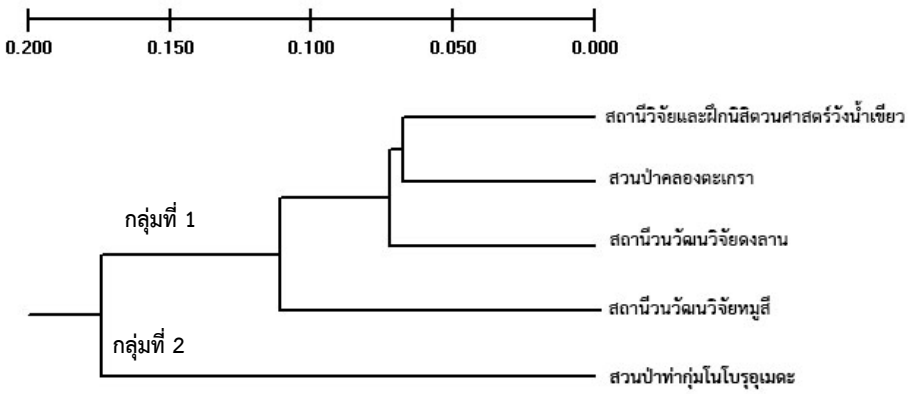
ตารางที่ 3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis*) ในแปลงปลูก 5 แห่งของประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมาย Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

สถานที่	*P* (%)	H_e	*I*
สถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา	65.79	0.2567	0.3754
สวนป่าคลองตะเกรา จังหวัดฉะเชิงเทรา	60.53	0.2213	0.3271
สวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะ จังหวัดตราด	51.32	0.1784	0.2657
สถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน จังหวัดขอนแก่น	63.16	0.2333	0.3460
สถานีวนวัฒนวิจัยหมูสี จังหวัดนครราชสีมา	55.26	0.1964	0.2925
ค่าเฉลี่ยของแปลงปลูก (population level)	**59.21**	**0.2172**	**0.3213**
ระดับชนิด (species level)	**81.58**	**0.2904**	**0.4336**

ตารางที่ 4 ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมและความแตกต่างทางพันธุกรรมของพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis*) ในแต่ละแปลงปลูก

สถานที่	วข	คก	ทก	ดล	มส
สถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียว (วข)	****	0.9398	0.8851	0.9372	0.9011
สวนป่าคลองตะเกรา (คก)	0.0621	****	0.8350	0.9333	0.8983
สวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะ (ทก)	0.1220	0.1803	****	0.8385	0.8187
สถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน (ดล)	0.0649	0.0691	0.1761	****	0.8975
สถานีวนวัฒนวิจัยหมูสี (มส)	0.1041	0.1072	0.2000	0.1081	****

หมายเหตุ: ด้านบน = ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic identity) ด้านล่าง = ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance)



รูปที่ 3 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis*) จากแปลงปลูก 5 แห่งในประเทศไทย โดยวิธี Unweighted pair group method of arithmetic average (UPGMA)

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอสังเกตได้ว่า เมื่อนำใบแก่บดให้ละเอียดแล้วเติม CTAB จะเกิดปัญหาตัวอย่างมีลักษณะเป็นยางเหนียว ทำให้ไม่สามารถดำเนินการสกัดดีเอ็นเอต่อไปได้ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Ribeiro and Lovato (2007) ได้กล่าวไว้ว่าใบของต้นไม้ในสกุล *Dalbergia* มีสารทุติยภูมิเป็นจำนวนมาก ทำให้เป็นอุปสรรคในการสกัดดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่สะอาด ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ตามต้องการ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการแก้ไขปัญหาโดยการเพิ่มจำนวนครั้งในการล้างตัวอย่างด้วยสารละลาย Sorbital 2-3 ครั้ง ซึ่งพบว่าตัวอย่างมีความเหนียวน้อยลง สามารถสกัดดีเอ็นเอให้มีคุณภาพที่ดีขึ้น และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้มีบางไพรเมอร์ที่แตกต่างจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูง

ในประเทศเวียดนาม (Hien and Phong, 2012) เช่น ไพรเมอร์ ISSR-08 ที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันอย่างชัดเจน ในขณะที่ไพรเมอร์ ISSR-02, ISSR-03, ISSR-10, ISSR-11, ISSR-51, ISSR-55 และ ISSR-62 ไม่แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจน จึงไม่ถูกนำมาใช้ในการศึกษา ดังนั้นแม้จะเป็นพรรณไม้ชนิดเดียวกัน แต่ต้องมีการคัดเลือกไพรเมอร์ให้เหมาะสมในแต่ละพื้นที่

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูงในระดับชนิด (species level) ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในป่าธรรมชาติของประเทศเวียดนามที่ใช้เครื่องหมาย ISSR เหมือนกัน (Hien and Phong, 2012) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการใช้เครื่องหมายนี้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูงในป่าธรรมชาติของประเทศไทย มีเพียงการศึกษาโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จีโนม ซึ่งได้เก็บตัวอย่างพะยูงมาจากป่าธรรมชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ราตรี, 2556) ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูงในป่าธรรมชาติและในสวนป่าควบคู่กันไปโดยใช้เทคนิคในการศึกษาเดียวกัน เพื่อจะได้มีการวางแผนการจัดเก็บรวบรวมพันธุกรรมได้อย่างเหมาะสม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูงแต่ละแปลงปลูกมีค่าแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะพันธุกรรมของกล้าไม้ที่นำมาปลูก โดยพะยูงในแปลงปลูกของสถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียว สวนป่าคลองตะเกราและสวนป่าท่ากุ่ม-โนโบรุอุเมะไม่ทราบประวัติของกล้าไม้ที่นำมาปลูก ส่วนที่สถานีวนวัฒนวิจัยดงลานและสถานีวนวัฒนวิจัยหมูสีเป็นกล้าไม้ที่ได้มาจากต้นแม่ไม้ที่กระจายอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยพะยูงที่สถานีวนวัฒนวิจัยดงลานมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าสถานีวนวัฒนวิจัยหมูสี เนื่องจากกล้าไม้ที่นำมาปลูกได้มาจากเมล็ดที่เก็บจากต้นแม่ไม้ที่ขึ้นอยู่ใน 25 แหล่งเก็บเมล็ด ในขณะที่สถานีวนวัฒนวิจัยหมูสีเป็นกล้าไม้ที่ได้มาจากแม่ไม้ที่เก็บมาจาก 7 แหล่งเก็บเมล็ดเท่านั้น จากข้อมูลนี้ยืนยันได้ว่า การรวบรวมพันธุกรรมจากแหล่งต่าง ๆ มีผลต่อค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของชนิดไม้ และเนื่องจากแปลงปลูกทั้ง 5 แห่งมีการจัดการดูแลป้องกันเกี่ยวกับการลักลอบตัดไม้ ดังนั้นค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมจึงขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมของกล้าไม้ที่รวบรวมมาปลูก ซึ่งแตกต่างจากในป่าธรรมชาติที่นอกเหนือจากลักษณะทางพันธุกรรมแล้ว ปัญหาการลักลอบตัดไม้และการบุกรุกพื้นที่ป่าทำให้ประชากรของพะยูงถูกแบ่งเป็นประชากรย่อย และมีระยะทางระหว่างประชากรห่างกันมากขึ้น ทำให้โอกาสในการถ่ายเทยีนลดลง ส่งผลให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง (ราตรี, 2556)

จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงให้เห็นว่า พะยูงในแปลงปลูกสถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียว สวนป่าคลองตะเกรา สถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน และสถานีวนวัฒนวิจัยหมูสีถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งจากข้อมูลประวัติการปลูกพะยูงของสถานีวนวัฒนวิจัยดงลานและสถานีวนวัฒนวิจัยหมูสีระบุว่า กล้าไม้ที่นำมาปลูกทั้งหมดได้จากเมล็ดที่เก็บมาจากแม่ไม้ที่ขึ้นอยู่ในแหล่งต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในขณะที่พะยูงในแปลงปลูกสวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะถูกแยกกลุ่มออกมาอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงถึงลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างออกไป โดยในระหว่างการเก็บข้อมูลพบพะยูงกระจายอยู่ตามธรรมชาติในพื้นที่ป่าใกล้เคียง ดังนั้นพะยูงที่ปลูกในสวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะอาจเป็นเมล็ดที่เก็บมาจากพื้นที่จังหวัดตราดหรือจังหวัดใกล้เคียง ทั้งนี้หากต้องการยืนยันข้อสันนิษฐานของผู้วิจัยควรต้องเก็บตัวอย่างใบพะยูงจากป่าธรรมชาติในพื้นที่จังหวัดตราด หรือแหล่งการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในภาคตะวันออกมาทำการศึกษาเปรียบเทียบ พร้อมทั้งศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะเนื้อไม้พะยูงในสวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะเพิ่มเติม เพื่อใช้เป็นข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายและการใช้ประโยชน์ทางด้านเนื้อไม้ต่อไป

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การนำพะยูงซึ่งเป็นชนิดไม้ที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์มารวบรวมปลูกไว้ในลักษณะแปลงปลูกหรือสวนป่า ซึ่งจัดว่าเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมนอกถิ่นกำเนิด (*ex situ* gene conservation) เป็นสิ่งที่ต้องเร่งดำเนินการเป็นอย่างยิ่งสำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ทั้งการเก็บรวบรวมเมล็ดหรือกิ่งพันธุ์ เพราะนอกจากจะเป็นการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมแล้ว ยังสามารถใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาส่งเสริมปลูกเป็นไม้เศรษฐกิจ โดยแต่ละแปลงปลูกควรต้องมีการตรวจพิสูจน์ทางพันธุกรรมเพื่อให้สามารถจัดการวางแผนการอนุรักษ์หรือการใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสม แต่อย่างไรก็ตาม การปลูกต้นไม้ในแต่ละพื้นที่ แต่ละหน่วยงานย่อมมีวัตถุประสงค์หรือเป้าหมายที่แตกต่างกัน ดังนั้นการจัดการแปลงปลูกต้องพิจารณาถึงสิ่งเหล่านี้ด้วย เช่น แปลงปลูกของกรมป่าไม้ที่สถานีวนวัฒนวิจัยดงลานและ

สถานีวนวัฒนวิจัยหมูสีที่มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการรวบรวมแม่ไม้ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาดี มีการเติบโตดี และให้เนื้อไม้ในส่วนของแก่นมาก

สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างใบพะยูงจาก 5 แหล่งปลูก มาสกัดดีเอ็นเอพบว่า การเพิ่มจำนวนครั้งในการล้างตะกอนด้วยสารละลาย Sorbital เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบแก่ และจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูงทั้ง 5 แหล่งปลูกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับชนิด (species level) สูง ในขณะที่ค่าเฉลี่ยความหลากหลายทางพันธุกรรมในแปลงปลูก (population level) มีค่าต่ำกว่า โดยพะยูงในแปลงปลูกสถานีวิจัยและฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด รองลงมาได้แก่ สถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน สวนป่าคลองตะเกรา สถานีวนวัฒนวิจัยหมูสี และสวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะ ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าพะยูงจากสวนป่าท่ากุ่มโนโบรุอุเมดะมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแตกต่างจากแหล่งอื่น ๆ อย่างชัดเจน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และขอขอบคุณกรมป่าไม้ องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ (อ.อ.ป.) และคณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับตัวอย่างที่นำมาใช้วิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ราตรี อยู่ยืน. (2556). การประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) โดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จีโนม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: 100 หน้า.

Arif, M., Zaidi, N. W., Singh, Y. P., Haq, Q. M. R. and Singh, U. S. (2009). A comparative analysis of ISSR and RAPD markers for study of genetic diversity in Shisham (*Dalbergia sissoo*). Plant Molecular Biology Reporter 27: 488-495.

Asian Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Viet Nam, August 1996). (1998). *Dalbergia cochinchinensis.* The IUCN Red List of Threatened Species 1998 e.T32625A9719096. Available Source: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T32625A9719096.en, March 23, 2019.

Hien, V. T. T. and Phong, D. T. (2012). Genetic diversity among endangered rare *Dalbergia cochinchinensis* (Fabaceae) genetypes in Vietnam revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeats (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology 11(35): 8632-8644.

Miller, M. P. (1997). Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data. Department of Biology Science, North Arizona University, Arizona.

Niyomdham, C. (2002). An account of *Dalbergia* (Leguminosae-Papilionoideae) in Thailand. Thai Forest Bulletin 30: 124-166.

Phong, D. T., Hien, V. T. T., Thanh, T. T. V., Van, N. T. and Binh, N. Q. (2011). Genetic diversity on the tropical rare wood species of *Dalbergia* in Vietnam revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology 10(55): 11397-11408.

Ribeiro, R. A. and Lovato, M. B. (2007). Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. Genetics and Molecular Research 6(1): 173-187.

Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973). Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.

Tel-Zur, N., Abbo, S., Myslabodski, D. and Mizrahi, H. (1999). Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactacea). Plant Molecular Biology Reporter 17: 249-254.

Yeh, F. C., Yang, R. C. and Boyle, T. (1999). POPGENE version 3.31. University of Alberta, Canada.

❑❑❑❑❑