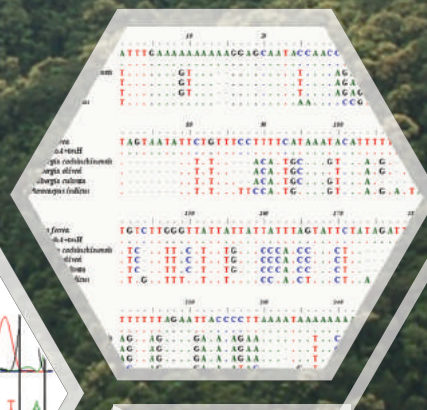
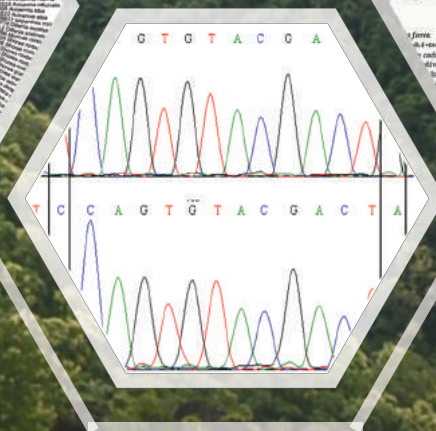
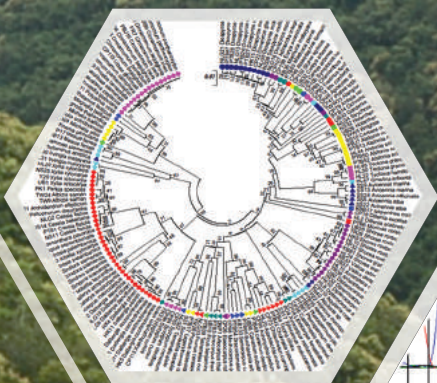




การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอและรหัสพันธุกรรม
เพื่อการประยุกต์ใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่า
และนิเวศวิทยาาสตร์ไม้ป่าและสัตว์ป่า

สุจิตรา จางตระกูล



การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ
และรหัสพันธุกรรมเพื่อการประยุกต์ใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์
พันธุกรรมไม้ป่าและนิเวศวิทยาศาสตร์ไม้ป่าและสัตว์ป่า

โดย

สุจิตรา จางตระกูล

สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช
กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช

2564



ผู้เขียนและเรียบเรียง

สุจิตรา จางตระกูล

ออกแบบและจัดรูปเล่ม

กิตติยา สิงห์ทอง นาริรัตน์ ทองบุญส่ง และเมธิญา ช่างเจริญ

จัดพิมพ์โดย

สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ภายใต้แผน
พื้นฐานด้านการสร้างการเจริญเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผลผลิตที่ 1 พื้นที่ป่าอนุรักษ์
ได้รับการบริหารจัดการ กิจกรรมองค์ความรู้ด้านการอนุรักษ์ป่าไม้และสัตว์ป่า กิจกรรมการบริหารจัดการ
ด้านป่าไม้และสัตว์ป่า

พิมพ์ครั้งที่ 1

จำนวน 75 เล่ม สำหรับเผยแพร่ให้ความรู้

พิมพ์ที่

วรรณลักษณ์ เทรดั้ง ที่อยู่ 5/336 ถ.นาคนิวาส แขวงลาดพร้าว เขตลาดพร้าว กทม. 10230

ข้อมูลในการอ้างอิงทางวิชาการ

สุจิตรา จางตระกูล. 2564. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอและ
รหัสพันธุกรรมเพื่อการประยุกต์ใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่าและนิเวศวิทยาาสตร์ไม้ป่าและ
สัตว์ป่า. สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวง
ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม 270 หน้า

1. พันธุศาสตร์ 1. ชื่อเรื่อง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอและรหัสพันธุกรรมเพื่อการ
ประยุกต์ใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่าและนิเวศวิทยาาสตร์ไม้ป่าและสัตว์ป่า

ISBN: 978-616-316-669-2

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณกรมป่าไม้, โครงการ BRT (โครงการพัฒนาองค์ความรู้และการศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรทางชีวภาพ), Volkswagenstiftung, IFS (International Foundation for Sciences) และ ACIAR (Australian Centre for International Agricultural Research) และ Freeland (former Wildaid: ให้การสนับสนุนงบประมาณในการพิสูจน์พันธุ์กรรมของผลิตภัณฑ์งาช้าง) ในการให้การสนับสนุนการวิจัยที่ผู้เขียนได้ดำเนินการศึกษาวิจัยด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมในไม้ป่าและนิเวศวิทยาาสตร์ที่เกี่ยวข้องมาเมื่อในอดีต และขอขอบคุณ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัยมาอย่างต่อเนื่องมาโดยตลอดตั้งแต่มีการจัดตั้งกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชมา

ขอขอบคุณกิตติยา สิงห์ทอง คุณนารีรัตน์ ทองบุญส่ง คุณเมธิญา ช่างเจริญ คุณศิริลักษณ์ ศิริคะรินทร์ คุณทวี กันหาวัน คุณสงวน วงษา คุณทานตะวัน ปะสาวะกา คุณนายอาทิตย์ วิมลทัศน์ คุณราตรี อยู่เย็น คุณปริญญ์ พันธงาม คุณธันชนิตา จันทรกระจ่าง คุณวิทวัส หาญวานิช คุณชลินา ลากส่งผล คุณจันทร์เพ็ญ บุญทอง คุณจักรพันธ์ วานิชกุล คุณรังสัน หล้าพรหม และ คุณพิษณุกร มะกลาง ที่เป็นผู้ช่วยการวิจัยในห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอทั้งในอดีตและจนถึงปัจจุบัน

ขอขอบคุณ คุณวินัย ศิริกุล คุณประสิทธิ์ สะอาดอาวุธ คุณจำนงค์ กาญจนบุรากร คุณไพรัตน์ ปิยะพันธ์ คุณสันติ กิตติบรรพชา คุณพรศักดิ์ มีแก้ว คุณจรรยา เจริญรัตตวงศ์ คุณธนิศา หนูยิ้ม คุณพนิดา รุ่งรัตนกุล คุณประพาย แก่นนาค ตลอดจนหัวหน้าอุทยานแห่งชาติ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ในการช่วยเก็บตัวอย่างชนิดพันธุ์ไม้และอำนวยความสะดวกในการเก็บพันธุ์ไม้ที่ผู้เขียนได้ทำการศึกษาหลายชนิดทั้งในอดีตและจนถึงปัจจุบัน

นอกจากนี้ขอขอบคุณ คุณกิตติยา สิงห์ทอง คุณเมธิญา ช่างเจริญ คุณภาณุมาศ เหลือผล คุณชนาภา ไทยจำเริญรัตน์และคุณเจนจิรา ธนานุวุฒิกร ในการช่วยพิมพ์เอกสารที่เกี่ยวข้องในอดีตและปัจจุบันที่เกี่ยวข้องกับต้นฉบับของเอกสารฉบับนี้

ท้ายสุดขอขอบคุณ คุณกิตติยา สิงห์ทอง คุณเมธิญา ช่างเจริญ คุณนารีรัตน์ ทองบุญส่ง เป็นอย่างมากในการช่วยออกแบบ และจัดทำรูปเล่มของเอกสารต้นฉบับนี้

สารบัญ

หน้า

	สารบัญภาพ	
	สารบัญตาราง	
	คำนำ	
	กิตติกรรมประกาศ	
บทที่ 1	พันธุศาสตร์ป่าไม้ระดับโมเลกุล	1
บทที่ 2	การอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมป่าไม้	22
บทที่ 3	วิธีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellites markers) ในไม้ป่าพร้อมกรณีศึกษา	32
บทที่ 4	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในไม้สนสองใบ (<i>Pinus merkusii</i>) โดยใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์	39
บทที่ 5	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้สัก (<i>Tectona grandis</i>)	47
บทที่ 6	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ยางนา (<i>Dipterocarpus alatus</i>)	60
บทที่ 7	การประเมินสถานภาพแหล่งพันธุกรรมของไม้โกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>) และโกงกางใบใหญ่ (<i>R. mucronata</i>) ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ และไอโซเอนไซม์เพื่อเป็นแนวทางในการอนุรักษ์และการฟื้นฟูป่า	68
บทที่ 8	การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่บางชนิดในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีและไมโครแซทเทลไลท์	82
บทที่ 9	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (<i>Paphiopedilum exul</i>) โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP markers)	92
บทที่ 10	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์	100
บทที่ 11	การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแหล่งที่มาของไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) ในประเทศไทย	108
บทที่ 12	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ชิงชัน (<i>Dalbergia Oliveri</i>) ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์	115
บทที่ 13	ความสำคัญของข้อมูลทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าต่อการพิจารณาวางแผนการปลูกป่า	124
บทที่ 14	การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เพื่อการคุ้มครองพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ในประเทศไทย	133
บทที่ 15	การจำแนกไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) ออกจากไม้ประดู่ (<i>Pterocarpus macrocarpus</i>) ชิงชัน (<i>Dalbergia oliveri</i>) กระพี้เขาควาย (<i>Dalbergia cultrata</i>) เก็ดดำ (<i>Dalbergia assamica</i>) โดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีน Maturase K	155

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 16 การจำแนกไม้สะเดาไทย (<i>Azadirachta indica</i> var. <i>siamensis</i>) และไม้สะเดาอินเดีย (<i>Azadirachta indica</i>) โดยยีน Maturase K ในคลอโรพลาสต์จีโนม	159
บทที่ 17 การพิสูจน์ไม้โกงกาง (<i>Rhizophora</i> spp.) ว่าเป็นไม้โกงกางลูกผสมหรือไม่ โดยการใช้การถอดรหัสพันธุกรรมในนิวเคลียส และคลอโรพลาสต์ยีน	168
บทที่ 18 คตินิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 1: การพิสูจน์ว่าไม้ซี่เลื่อยของกลางและไม้ของกลางในที่เกิดเหตุเป็นชนิดเดียวกัน และเป็นไม้หวงห้ามหรือไม่	173
บทที่ 19 คตินิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 2: การพิสูจน์ว่าไม้มะม่วง (<i>Mangifera</i> sp.) ของกลางมาจากมะม่วงป่าที่เป็นไม้หวงห้ามหรือไม่	177
บทที่ 20 คตินิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 3: การพิสูจน์ตัวอย่างเนื้อไม้ของกลางว่าเป็นไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) หรือไม้บุนนาค/นากบุด (<i>Mesua ferrea</i>) โดยใช้วิธีพิสูจน์ลักษณะทางกายวิภาคภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Stereo Microscope) และถอดรหัสพันธุกรรม	180
บทที่ 21 คตินิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 4: การพิสูจน์ว่าไม้สัก (<i>Tectona grandis</i>) ของกลางที่ถูกจับกุมเป็นไม้สักที่ถูกตัดมาจากสวนป่าหรือไม่	185
บทที่ 22 คตินิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 5: การวินิจฉัยว่าชิ้นไม้ของกลาง 142 ชิ้น ว่ามาจากต้นใดต้นหนึ่งของไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) ที่ถูกลักลอบตัดหรือไม่	189
บทที่ 23 คตินิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 6: กิ่งไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) ของต้นพะยูนต้องสงสัยมีพันธุกรรมตรงกับราก กิ่งที่งอกของไม้พะยูนที่คาดว่าถูกลักลอบล้อมต้นไปปลูกอีกที่หรือไม่	194
บทที่ 24 คตินิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 7: การพิสูจน์วัตถุพยานไม้ของกลางเป็นไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) หรือไม่ และซี่เลื่อยและเศษไม้ของกลางมีพันธุกรรมตรงกับต่อไม้ที่ถูกตัดจากวัดหรือไม่	199
บทที่ 25 คตินิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า: การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและการถอดรหัสพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ	204
บทที่ 26 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะแนวทางในการอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุกรรมป่าไม้ การฟื้นฟูป่าและปลูกป่า และนิติวิทยาศาสตร์ป่าไม้และสัตว์ป่า	227
เอกสารอ้างอิง	243

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ตัวอย่างของการศึกษาพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมไม้ป่า โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม (molecular genetic markers)	3
1.2	ตัวอย่างของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์พืชและไม้ป่าเขตร้อนและการประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมภูมิภาคเอเชียพอสังเขป	7
1.3	การศึกษาพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมไม้ป่า โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular genetic markers) เพื่อการประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ และอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่าในประเทศไทย	9
1.4	ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรมเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชและไม้ป่าเขตร้อนและพืชป่าในประเทศไทย	12
1.5	ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของพันธุ์ไม้ป่าเขตร้อนและพืชป่าในประเทศไทย	14
1.6	ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรมเพื่องานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ไม้ป่าในประเทศต่างๆ	16
1.7	การเปรียบเทียบสถานภาพการศึกษาพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าของแต่ละกลุ่มประเทศในโลก โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม (molecular genetic markers)	17
2.1	การอนุรักษ์พันธุกรรมและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไม้ป่าในประเทศไทย	27
2.2	การเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งประชากรของพันธุ์ไม้ป่าและพืชป่าบางชนิดในประเทศไทย	29
2.3	การประเมินอัตราการผสมข้าม (tm) โดยใช้ไอโซเอนไซม์ยีนและ mixed mating model	29
2.4	การประเมินค่าของอัตราการผสมข้ามของประชากรไม้โกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>) ในประเทศไทย	30
2.5	การประเมินค่าของอัตราการผสมข้ามระหว่างต้นของประชากรไม้โกงกางใบเล็ก อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง ประเทศไทย	30
3.1	แสดงโพรเมอร์ที่มี polymorphism ในไม้พะยูง	37
4.1	11 แหล่ง (ประชากร) ของไม้สนสองใบที่ใช้ทำการศึกษา	41
4.2	ไอโซเอนไซม์ 11 ระบบที่ใช้ศึกษา และตำแหน่งของไอโซเอนไซม์ยีน 17 ตำแหน่งที่ได้ถูกวินิจฉัย	42
4.3	การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากร	43
4.4	ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง D_j และ δ และ F_{st} ความแตกต่างของยีนทั้งหมด	44
4.5	การประเมินอัตราการผสมข้ามที่ยีนตำแหน่งเดียว (t_d) และ มียีนหลายตำแหน่ง (t_m)	45
5.1.1	แหล่ง (ประชากร) ไม้สัก (<i>Tectona grandis</i>) ที่ทำการศึกษา	48
5.1.2	รายชื่อของระบบไอโซเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษา	49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
5.1.3	ตำแหน่งของยีนและจำนวนสูงสุดของอัลลีลต่อตำแหน่งของยีนที่ศึกษาในแหล่ง (ประชากร) ของไม้สัก (<i>Tectona grandis</i>)	50
5.1.4	ความถี่ของยีนในทุกประชากรที่ศึกษา	51
5.1.5	ความผันแปรทางพันธุกรรมที่ไอโซเอนไซม์ยีน 14 ตำแหน่งในทุกแหล่ง (ประชากร) ของ ไม้สัก (<i>Tectona grandis</i>) (Standard errors in parentheses)	52
5.1.6	Matrix of Nei (1978) unbiased genetic distance coefficients ที่ตำแหน่งไอโซเอนไซม์ยีน	53
5.1.7	การประเมินอัตราการผสมข้ามของไม้สัก (<i>Tectona grandis</i>)	54
5.2.1	ชื่อของแหล่ง (ประชากร) ไม้สัก (<i>Tectona grandis</i>) ที่ศึกษา	55
5.2.2	การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในแหล่ง (ประชากร) ของไม้สัก (<i>Tectona grandis</i>)	58
6.1.1	ชื่อแหล่ง (ประชากร) ที่ศึกษา	61
6.1.2	รายชื่อของระบบไอโซเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษา	61
6.1.3	ความถี่ของอัลลีลใน 4 ประชากรของยางนา (<i>Dipterocarpus alatus</i>)	63
6.1.4	ความผันแปรทางพันธุกรรมของไม้ยางนา (<i>Dipterocarpus alatus</i>) ที่ไอโซเอนไซม์ยีน 8 ตำแหน่ง (Standard errors in parentheses)	64
6.1.5	ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไม้ยางนา (<i>Dipterocarpus alatus</i>)	64
6.2.1	แหล่งที่มาของตัวอย่างไม้ยางนา (<i>Dipterocarpus alatus</i>)	66
6.2.2	การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของไม้ยางนา (<i>Dipterocarpus alatus</i>) แต่ละ แหล่ง (ประชากร) ในประเทศไทย	67
7.1	แหล่ง (ประชากร) และขนาดของตัวอย่างของไม้โกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>) ในประเทศไทย	69
7.2	แหล่ง (ประชากร) และ ขนาดของตัวอย่างของไม้โกงกางใบใหญ่ (<i>Rhizophora mucronata</i>) ในประเทศไทย	70
7.3	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>) ในประเทศไทย	75
7.4	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโกงกางใบใหญ่ (<i>Rhizophora mucronata</i>) ในประเทศไทย	76
7.5	การประเมินอัตราการผสมข้ามในแต่ละประชากรของไม้โกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>) ในประเทศไทย	78
7.6	การประเมิน อัตราการผสมข้าม ในแต่ละประชากรของไม้โกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>) ในประเทศไทย	78
8.1	ไผ่ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษา	83
8.2	แหล่งเก็บตัวอย่างไผ่ป่า (<i>Bambusa bambos</i>) จากแหล่งธรรมชาติของประเทศไทย	84

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8.3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับเบสแกน อุณหภูมิในการจับเกาะ (Annealing temperature, T_A) ขนาดผลผลิตของพีซีอาร์ และความเข้มข้นแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ของคูไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	86
8.4	จำนวนตัวอย่างเฉลี่ย ค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่ง ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) และค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหมาย (H_e) ในประชากรไผ่ป่า (<i>Bambusa bambos</i>)	90
9.1	ตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (<i>Paphiopedilum exul</i>) แหล่งต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม	92
9.2	คูไพรเมอร์จำนวน 13 คู่ ที่คัดเลือกได้จากจำนวนคูไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่คอมบินเนชัน	94
9.3	ค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphic Loci ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง	96
9.4	ค่า Genetic diversity ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง	96
9.5	ค่า Genetic distances และ Identities distance (Nei's, 1973; 1978) ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง	97
10.1	ตัวอย่างไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) จากแหล่งต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม	101
10.2	แสดงจำนวนค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่ง ในประชากรไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>)	103
10.3	แสดงค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหมาย (H_e) ในประชากรไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>)	104
10.4	แสดงค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) ในแต่ละตำแหน่งของไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>)	104
10.5	แสดงค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) ของไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) 12 ประชากร	105
11.1	ตัวอย่างใบและเปลือกไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) ที่ใช้ในการศึกษา	110
11.2	แฮปโลไทป์โดยการวิเคราะห์รวมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากส่วน tmS-trnG, trnV-trnM และ trnC-petN1R เข้าด้วยกันในไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>)	112
12.1	ตัวอย่างไม้ชิงชัน (<i>Dalbergia oliveri</i>) จากแหล่งต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม	116
12.2	ตารางแสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาความหลากหลายในไม้ชิงชัน (<i>Dalbergia oliveri</i>)	117

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12.3	แสดงจำนวนค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่ง ในประชากรไม้ชิงชัน (<i>Dalbergia oliveri</i>)	119
12.4	แสดงค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหมาย (H_e) ในประชากรไม้ชิงชัน (<i>Dalbergia oliveri</i>)	121
12.5	แสดงค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) ในแต่ละตำแหน่งของไม้ชิงชัน (<i>Dalbergia oliveri</i>)	121
12.6	แสดงค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) ของไม้ชิงชัน (<i>Dalbergia oliveri</i>)	122
13.1	รายชื่อแหล่ง (ประชากร) ของพันธุ์ไม้ที่ศึกษา	126
13.2	ไอโซเอนไซม์ 11 ระบบที่ใช้ศึกษาในไม้ป่า	128
13.3	การประเมินอัตราการผสมตัวเอง (Selfing rate) ของไม้สนสองใบ (<i>Pinus merkusii</i>)	129
14.1	ไม้ประเภท ก. ไม้หวงห้ามธรรมดา ตามพระราชกฤษฎีกา พ.ศ. 2530	136
14.2	ไม้ประเภท ข. ไม้หวงห้ามพิเศษ	142
14.3	ตารางแสดงผลการถอดรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ในพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Maturase K, rbcL (Ribulose Biphosphate Carboxylase large chain) และ trnH-psbA (intergenic spacer)	148
16.1	ไม้สะเดาไทย (<i>Azadirachta indica</i> var. <i>siamensis</i>) และไม้สะเดาอินเดีย (<i>A. indica</i>) จากแหล่งและประเทศต่างๆที่ใช้ในการศึกษาโดยเก็บรวบรวมจากสถานีทดลองปลูกนานาชาติ จ.กาญจนบุรี	160
16.2	ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 10 ตำแหน่งที่มีความผันแปรในยีน matK ที่มีขนาด 930 คู่เบส โดยมีความจำเพาะกับไม้สะเดาไทย (<i>Azadirachta indica</i> var. <i>siamensis</i>) และไม้สะเดาอินเดีย (<i>A. indica</i>)	164
17.1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	170
21.1	แสดงค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) ของสัก (<i>Tectona grandis</i>) 11 ประชากร	187
22.1	แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของขึ้นไม้พะยุง (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) ของกลาง และต่อไม้พะยุง (<i>D. cochinchinensis</i>) จากการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์ 9 ตำแหน่ง	191

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
23.1	แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของวัตถุดิบรายการที่ 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 2, 3 และ 4 จากการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์ 12 ตำแหน่ง	197
24.1	แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของวัตถุดิบตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3, 2.2, 3.1 และ ตัวอย่างไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) จากแหล่งอื่นที่ใช้เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่ง	201
25.1	ตัวอย่างเชื้อที่รับมาศึกษา	210
25.2	ลักษณะทางพันธุกรรม (genotypes) ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ 9 ตำแหน่ง ในเชื้อโครง เชื้อดาว และเชื้อลายเมฆ	214
25.3	สรุปผลการวิเคราะห์จำแนกชนิดเชื้อและกลุ่มของเชื้อโครงจากการถอดรหัสพันธุกรรม โดยใช้ 7 ชิ้นส่วนของยีน	216
25.4	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์งาช้างจากที่รับมาศึกษา	218
26.1	สรุปผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างประชากร และระบบการสืบพันธุ์ระหว่างประชากรของไม้ป่าและพืชป่าบาง ชนิดในประเทศไทย	228
26.2	บทสรุปของคตินิติวิทยาศาสตร์ป่าไม้และผลการวินิจฉัย	236
26.3	สรุปคตินิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า	238

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การเกิด Inbreeding depression ของปริมาณเนื้อไม้ <i>Picea abies</i> อายุ 61 ปี อันเนื่องมาจากการผสมตัวเองซึ่งจะเห็นว่าปริมาณเนื้อไม้น้อยกว่าต้นที่เกิดจาก Open pollination อย่างเด่นชัด	31
3.1	ขั้นตอนการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (SSRs) โดยสรุป	34
3.2	แสดงส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ซึ่งพบในไม้พะยูน (A) แสดงส่วนที่เป็นชุด CA 27 ซ้ำ (B) แสดงส่วนที่เป็นชุด TA 7 ซ้ำและ GT 16 ซ้ำ	36
3.3	แสดงรูปแบบอัลลีลของตัวอย่างไม้พะยูนโดยใช้คูไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ (A) แสดงรูปแบบอัลลีลที่แตกต่างกันของไพรเมอร์ Delb_120 (B) แสดงรูปแบบอัลลีลที่แตกต่างกันของไพรเมอร์ Delb_90	37
4.1	การวิเคราะห์ Cluster analysis (UPGMA) โดยใช้ Nei's genetic distance ที่ ยีน 16 ตำแหน่ง ในการศึกษาใบไม้สนสองใบ 11 ประชากร	45
5.1.1	การวิเคราะห์ Cluster analysis โดยใช้ unweighted pair group method coefficient used: Nei (1978) unbiased genetic	54
6.1.1	ความแตกต่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้ยางนา (<i>Dipterocarpus alatus</i>) 4 แหล่ง (ประชากร)	65
7.1	DNA profile ของ เครื่องหมายเอเอฟแอลพีของไม้โกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>) ในประเทศไทย	74
7.2	DNA profile ของ เครื่องหมายเอเอฟแอลพีของไม้โกงกางใบใหญ่ (<i>Rhizophora mucronata</i>) ในเกาะภูเก็ต	74
7.3	ความสัมพันธ์ของลักษณะการจัดกลุ่มแสดง Genetic distance และความสัมพันธ์ระหว่างประชากรของไม้โกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>) ในประเทศไทย	77
7.4	ความสัมพันธ์ของลักษณะการจัดกลุ่มแสดง Genetic distance และความสัมพันธ์ระหว่างประชากรของไม้โกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora mucronata</i>) ในประเทศไทย	77
7.5	การผสมกันเองในหมู่เครือญาติ (ซึ่งรวมถึงการผสมตัวเองด้วย) ในไม้โกงกางใบใหญ่ที่เรียกว่า การเกิด Inbreeding depression (ความเสื่อมถอยของการผสมกันในกลุ่มเครือญาติ) ทำให้กล้าไม่มีลักษณะด้อยและความสามารถในการอยู่รอดลดลง อัตราการเจริญเติบโตลดลง	79
8.1	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคูไพรเมอร์ E-AGG/M-CTC ของไม้ 26 ชนิด	88
8.2	การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้ 26 ชนิด ในลักษณะ Phylogenetic tree	88
8.3	รูปแบบอัลลีลของประชากรไผ่ป่า (<i>Bambusa bambos</i>) จังหวัดเชียงใหม่จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ตำแหน่ง DTLBb 47	89
8.4	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไผ่ป่า (<i>Bambusa bambos</i>) 9 ประชากรจากการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA	90

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9.1	ตัวอย่างการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 4 คู่ จากทั้งหมด 64 คู่ โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี	94
9.2	ภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ที่ได้จากการทำ electrophoresis โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 2000 ในภาพเป็นตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพีจากการใช้คู่ไพรเมอร์ที่ E-AGC / M-CTC จากแหล่ง อำเภอบะเหลียน จังหวัดตรัง	95
9.3	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง	97
10.1	รูปแบบความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมตัวอย่างประชากรไม้พะยุง (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ที่ตำแหน่ง DELB_18, COC_6 และ COC_18	102
10.2	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไม้พะยุง (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) 12 ประชากรในประเทศไทย จากการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA	106
11.1	รูปแบบดีเอ็นเอของไม้พะยุง (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) ที่พบในพื้นที่ต่างๆที่ใช้ในการศึกษา	113
12.1	ภาพแบบความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมตัวอย่างประชากรไม้ชิงชัน (<i>Dalbergia oliveri</i>) จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ที่ตำแหน่ง OLI5	118
12.2	แสดง Electropherogram ที่ผ่านการดีดสียฟลูออเรสเซนส์และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Genetic Analyzer 3500 ในไม้ชิงชัน (<i>Dalbergia oliveri</i>)	118
12.3	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไม้ชิงชัน (<i>Dalbergia oliveri</i>) 12 ประชากรในประเทศไทย จากการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA	123
13.1	การวิเคราะห์ Cluster Analysis โดยใช้ Unweighted Pair Group Method โดยใช้ Nie's (1978) Unbiased Genetic Distance ใน 4 แหล่ง (ประชากร) ของไม้สะเดา (<i>Azadirachta indica</i> var. <i>siamensis</i>)	130
13.2	การวิเคราะห์ Cluster analysis โดยใช้ Unweighted pair group method โดยใช้ Nei's (1978) Unbiased genetic distance ใน 3 แหล่ง (ประชากร) ของไม้เสม็ดขาว (<i>Melaleuca cajuputi</i>)	131
14.1	แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ในตำแหน่ง Maturase K	144
14.2	แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ในตำแหน่ง RBCL	145
14.3	แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ในตำแหน่ง tmH-psbA	146

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14.4	แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ใน 3 ตำแหน่ง คือ Maturase K + RBCL + trnH-psbA	147
15.1	แสดงตำแหน่งและชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะของไม้พะยุง (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) ที่แตกต่างจาก ไม้ชิงชัน (<i>D. oliveri</i>) กระพี้เขาควาย (<i>D. cultrata</i>) เกิดดำ (<i>D. assamica</i>) และ ประดู่ (<i>Pterocarpus macrocarpus</i>) ในยีน Mat K	157
15.2	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้พะยุง (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) กระพี้เขาควาย (<i>D. cultrata</i>) เกิดดำ (<i>D. assamica</i>) ชิงชัน (<i>D. oliveri</i>) และประดู่ (<i>Pterocarpus macrocarpus</i>) ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining แบบ Bootstrap โดยโปรแกรม MEGA4	157
16.1	แสดงการตรวจวิเคราะห์ชั้นดีเอ็นเอขนาด 930 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จากยีน matK	163
16.2	รูปแบบ electrophoregram บางตำแหน่งที่เป็น single nucleotide polymorphism ของ ไม้สะเดาไทย (<i>Azadirachta indica</i> var. <i>siamensis</i>) และไม้สะเดาอินเดีย (<i>A. indica</i>)	163
16.3	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้สะเดาไทย (<i>Azadirachta indica</i> var. <i>siamensis</i>) และไม้สะเดาอินเดีย (<i>A. indica</i>) ในแหล่งต่างๆ โดยยีน Maturase K ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining แบบ Bootstrap โดยโปรแกรม MEGA4	165
16.4	การจัดกลุ่มไม้สะเดาไทย (<i>Azadirachta indica</i> var. <i>siamensis</i>) ไม้สะเดาอินเดีย (<i>A. indica</i>) และไม้สะเดาข้างด้วย UPGMA แบบ unbiased genetic distance ด้วย Isoenzyme gene	166
16.5	การจำแนกไม้สะเดาไทย (<i>Azadirachta indica</i> var. <i>siamensis</i>) และไม้สะเดาอินเดีย (<i>A. indica</i>) 24 แหล่งจากการวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมด้วย เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลต์	166
17.1	ตัวอย่างใบโก่งกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>) โก่งกางใบใหญ่ (<i>Rhizophora mucronata</i>) และ โก่งกางลูกผสม (Putative hybrid)	169
17.2	ความแตกต่างของลำดับนิวคลีอัสที่จำเพาะกับไม้โก่งกางใบใหญ่ (<i>Rhizophora muconata</i>) ไม้โก่งกางใบเล็ก (<i>R. apiculata</i>) และไม้โก่งกางที่คาดว่าจะลูกผสม (Putative hybrid) ที่ นิวคลีอัส 3 ตำแหน่ง (DLDH SBE2 และ FMRrm11)	171
17.3	ความแตกต่างของลำดับนิวคลีอัสที่จำเพาะกับไม้โก่งกางใบใหญ่ (<i>Rhizophora muconata</i>) ไม้โก่งกางใบเล็ก (<i>R. apiculata</i>) และไม้โก่งกางที่คาดว่าจะลูกผสม (Putative hybrid) ใน ตำแหน่งคลอโรพลาสต์ (atpB-rbcL intergenic spacer)	171
18.1	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากตัวอย่างซีลี้อยู่กับพรรณไม้ที่มีใน ฐานข้อมูล (genbank) ในยีน Maturase k (Mat K)	175

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18.2	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากตัวอย่างซีลี้อยู่กับพรรณไม้ที่มีในฐานข้อมูล (genbank) ใน trnH-psbA ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining แบบ Bootstrap โดยโปรแกรม MEGA4	176
19.1	ท่อนไม้ของกลางต้องสงสัย	178
19.2	ตัวอย่างใบมะม่วงป่า (<i>Mangifera</i> spp.) จากอุทยานแห่งชาติรามคำแหง	178
20.1	ภาพถ่ายทางกายวิภาคภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Stereo Microscope) กำลังขยาย 500 μ m ของไม้ standard ของไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) และไม้บุนนาค/นากบุด (<i>Mesua ferrea</i>)	181
20.2	ภาพถ่ายทางกายวิภาคภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Stereo Microscope) กำลังขยาย 500 μ m ของตัวอย่างไม้ของกลาง 9 ตัวอย่าง	182
20.3	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้ป่าโดยแสดงความสัมพันธ์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดของไม้ของกลาง (MF7) ไม้บุนนาค/นากบุด (<i>Mesua ferrea</i>) กับไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) ไม้ชิงชัน (<i>D. oliveri</i>) กระพี้เขาควาย (<i>D. cultrata</i>) ไม้ประดู่ (<i>Pterocarpus macrocarpus</i>)	183
20.4	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้ของกลางเทียบกับไม้ชิงชัน (<i>Dalbergia oliveri</i>) ไม้พะยูน (<i>D. cochinchinensis</i>) ไม้ประดู่ (<i>Pterocarpus macrocarpus</i>) และไม้บุนนาค/นากบุด (<i>Mesua ferrea</i>) ในส่วนของซินดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน trnH กับ psbA ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining แบบ Bootstrap โดยโปรแกรม MEGA4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม้ของกลางมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตรงกับไม้บุนนาค/นากบุด (<i>Mesua ferrea</i>)	183
21.1	ตัวอย่างชิ้นไม้สัก (<i>Tectona grandis</i>) ของกลางที่ทำการศึกษา	186
21.2	การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้สัก (<i>Tectona grandis</i>)	188
22.1	ตัวอย่างชิ้นไม้พะยูนที่ใช้ในการพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	190
22.2	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 3 ตำแหน่ง ในชิ้นไม้ของกลางของไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) เปรียบเทียบกับต่อไม้ 3 ต่อ ที่ถูกลักลอบตัดอย่างผิดกฎหมาย และต้นพะยูน (<i>D. cochinchinensis</i>) 7 ต้น จากอุทยานแห่งชาติน้ำพอง จ.ขอนแก่น ได้แสดงให้เห็นว่าไม้ชิ้นที่ 23 และ 30 มีลักษณะพันธุกรรมตรงกับ ต่อไม้ที่ถูกลักลอบตัดต่อที่ 1	192

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23.1	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของวัตถุพยานรายการที่ 1, 2, 3 และ 4 เปรียบเทียบกับไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) ในยีน <i>rbcl</i> ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining แบบ Bootstrap โดยโปรแกรม MEGA4	196
23.2	แสดงตัวอย่างตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่ง COC8, COC6 และ DELB_120 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถแยกลักษณะลักษณะทางพันธุกรรมของวัตถุพยานรายการที่ 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 2, 3 และ 4 ได้	197
23.3	แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลต์ 12 ตำแหน่งของวัตถุพยานรายการที่ 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 2, 3 และ 4 ที่แสดงให้เห็นว่าวัตถุพยานรายการที่ 1 และ 2 มีลักษณะทางพันธุกรรมไม่เหมือนกับวัตถุพยานรายการที่ 3 และ 4	198
24.1	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมวัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3, 2.2, และ 3.1 ในยีน <i>tmH+psbA</i> เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรมไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) ไม้ชิงชัน (<i>D. oliveri</i>) กระพี้เขาควาย (<i>D. cultrata</i>) และ ไม้ประดู่ (<i>Pterocarpus macrocarpus</i>) ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining แบบ Bootstrap โดยโปรแกรม MEGA4	201
24.2	แสดงตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 10 ตำแหน่ง ที่แสดงให้เห็นว่าวัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3, 2.2 และ 3.1 มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน	202
24.3	แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลต์ 10 ตำแหน่งของวัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3 วัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 2.2 วัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 3.1 และตัวอย่างไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) จากแหล่งอื่นที่ใช้เปรียบเทียบ ที่แสดงให้เห็นว่า วัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3, 2.2 และ 3.1 มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน	203
25.1	แสดงภาพอู้งางที่ตั้งที่ถูกลำเลียงเข้าประเทศไทยอย่างผิดกฎหมาย	207
25.2	แสดงการจำแนกเสือโดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนไมโทคอนเดรียโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่ทำการศึกษาโดยรายงานของ Cracraft <i>et al.</i> (1998) โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี Neighbor-joining (NJ) tree และ Bootstrap test สามารถจำแนกเสือออกเป็น 3 ชนิด คือ เสือโคร่ง (<i>Panthera tigris</i>) เสือดาว (<i>Panthera pardus</i>) เสือลายเมฆ (<i>Neofelis nebulosa</i>)	212
25.3	แสดงรูปจีโนมไทป์ของดีเอ็นเอที่เกิดจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ตำแหน่ง FCA – 453 ของตัวอย่างเสือ 23 ตัวอย่าง แถวที่ 1 – 12 คือ เสือโคร่ง แถวที่ 13 – 15 คือ เสือดาว แถวที่ 16 – 17 คือ เสือลายเมฆ แถวที่ 18 – 19 คือ เสือโคร่ง แถวที่ 21 – 23 คือ เสือดาว แถวที่ 20 คือตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แถว M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 ladder	213

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25.4	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเสือโคร่ง เสือดาว เสือลายเมฆ จากการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม TFPGA version 1.3	215
25.5	PCR product ขนาด 500 bp ของยีน Cytochrome b โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis	219
25.6	ตัวอย่าง Electropherogram จากการหาลำดับเบสจาก PCR product ใน Cytochrome B	219
25.7	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น variable site ของผลิตภัณฑ์ทั้งช้างเอเชีย 15 ตำแหน่ง เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ช้างแอฟริกา	220
25.8	แสดงตัวอย่างชิ้นเนื้อสัตว์ป่าต้องสงสัย	221
25.9	แสดงการจำแนกโดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีน Cytochrome B ในตัวอย่างของกลาง และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับควายและควายป่าจากฐานข้อมูล NCBI โดยวิธี Neighbor-joining (NJ) tree และ Bootstrap test	223
25.10	ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เป็น species specific variable nucleotide site ของควาย ในยีน cytochrome B 14 ตำแหน่ง (กรอบสีเขียว)	224
25.11	แสดงการจำแนกโดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีน D-loop ในตัวอย่างของกลาง มาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับควายและควายป่าจากฐานข้อมูล NCBI	225
25.12	ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เป็น species specific variable nucleotide site ของควาย ในยีน D-loop	226

คำนำ

เอกสารฉบับนี้เป็นการเขียนและรวบรวมร้อยเรียง ประสบการณ์ การทำงานวิจัยพันธุ์ศาสตร์ป่าไม้ระดับโมเลกุลทางพันธุกรรมของผู้เขียนบางส่วนที่พอจะประมวลได้ให้เข้าเนื้อหาในทิศทางเดียวกันตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 จนถึงปัจจุบันอย่างต่อเนื่องมาตลอด โดยได้สอดแทรกเนื้อหาหลักการทางทฤษฎีจากตำราต่างประเทศ และประสบการณ์ที่เคยบรรยายและเขียนเอกสารทางวิชาการ เอกสารตำรา ในวาระและโอกาสต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศ ทั้งที่ยังไม่เคยเผยแพร่และหากเคยเผยแพร่ในเอกสารตำราหรือวารสารทางวิชาการและที่ประชุมระดับชาติและนานาชาติก็จะมีการอ้างอิงที่มาของข้อมูล ในลักษณะข้อมูลทุติยภูมิ เพื่อให้ผู้อ่านได้มองในภาพรวมได้ว่าผู้เขียนได้ทำงานวิจัยที่เกี่ยวข้องอะไรมาบ้าง โดยปรับเนื้อหาให้ทันต่อสถานการณ์ปัจจุบัน ทั้งนี้ได้สร้างความเชื่อมโยงของหลักวิธีการศึกษา เหตุผล วัตถุประสงค์ จนถึงประมวลผล และสังเคราะห์ข้อมูลผลการศึกษาวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอและรหัสพันธุกรรม เพื่อนำมาประเมินสถานภาพทรัพยากรทางพันธุกรรมของไม้ป่าและพืชป่าหลายชนิดในระบบนิเวศและสังคมป่าที่หลากหลายที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและในระบบนิเวศ เพื่อที่จะได้ข้อมูลสถานภาพทรัพยากรทางพันธุกรรมป่าไม้ ที่เป็นข้อเสนอแนะและนำไปสู่การพัฒนาขยายผลเป็นการวางแผนและบริหารจัดการการอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุกรรมป่าไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป นอกจากนี้ได้สอดแทรกประสบการณ์ของผู้เขียนในการประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและรหัสพันธุกรรมในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ป่าไม้และสัตว์ป่าไว้ด้วย

ทั้งนี้องค์ประกอบของเอกสารฉบับนี้มีทั้งหมด 26 บท โดยได้อธิบายพื้นฐานความรู้พันธุ์ศาสตร์ป่าไม้ระดับโมเลกุลในบทที่ 1 ในบทที่ 2 ได้กล่าวถึงการอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุกรรมป่าไม้ โดยได้สอดแทรกหลักการและการประยุกต์ใช้ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์ป่าไม้หลายชนิด ส่วนบทที่ 3 กล่าวถึงวิธีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellites markers) ในไม้ป่าในประเทศไทยที่ผู้เขียนและทีมงานได้พัฒนาขึ้น บทที่ 4 -12 เป็นการเรียบเรียงและยกตัวอย่างกรณีศึกษาที่ผู้เขียนได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไม้ป่าและพืชป่าหลายชนิด เช่น ไม้สนสองใบ ไม้สัก ไม้ยางนา ไม้โกกงใบเล็กและไม้โกกงใบใหญ่ ไผ่ป่า กล้วยไม้รองเท้านารี ไม้พะยูนและไม้ชิงชัน ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวได้นำเสนอผลการประเมินสถานภาพทรัพยากรพันธุกรรมของชนิดพันธุ์ไม้ป่าและพืชป่า เพื่อเป็นข้อสรุปแนวทางในการอนุรักษ์ พันธุ์ และการปลูกป่าที่เหมาะสมกับชนิดพันธุ์ไม้ป่าและพืชป่าในแต่ละชนิดที่ศึกษา บทที่ 13 ได้กล่าวถึงความสำคัญของข้อมูลทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าต่อการพิจารณาวางแผนการปลูกป่า โดยได้หยิบยกกรณีศึกษาไม้ป่าบางชนิด เพื่อทำให้ผู้อ่านเข้าใจในเนื้อหาได้ง่ายขึ้น บทที่ 14 เป็นการพัฒนาคู่มือบาร์โค้ด (DNA barcode) เพื่อการคุ้มครองพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ในประเทศไทย บทที่ 15-16 เป็นการจำแนกชนิดไม้ ไม้พะยูน และกลุ่มชนิดไม้ใกล้เคียง และการจำแนกชนิดไม้สะเคาเป็นต้น โดยการถอดรหัสพันธุกรรม ส่วนบทที่ 17 เป็นการพิสูจน์ไม้โกกงว่าเป็นโกกงลูกผสมหรือไม่โดยการถอดรหัสพันธุกรรม บทที่ 18-24 เป็นกรณีศึกษาของคดีนิติวิทยาศาสตร์ป่าไม้โดยการใช้รหัสพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์จีโนมในการพิสูจน์ชี้เลื่อยหรือขึ้นไม้จากต้นที่ลักลอบตัดหรือถูกลักลอบลื้อไปปลูกอีกที่หรือไม่ ซึ่งมีทั้งในกรณีของไม้ป่าหวงห้าม ไม้สัก ไม้มะม่วง ไม้พะยูน และไม้

บุญนาค และสถานที่เกิดเหตุซึ่งมีทั้งอุทยานแห่งชาติ วัด และพื้นที่เอกชน บทที่ 25 กล่าวถึงคดีนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า 4 คดี คือ อรุ้งอุ้ม เสือ ผลัดกันทั้งข้าง และขึ้นเนื้อต้องสงสัยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและการถอดรหัสพันธุกรรมในการพิสูจน์ ชนิดพันธุ์ แหล่งที่มา และจำนวนตัวเพื่อใช้ในการบังคับใช้กฎหมายทั้งในและต่างประเทศ ท้ายสุดในบทที่ 26 ได้สรุปผลและข้อเสนอแนะแนวทางในการอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุกรรมป่าไม้ การฟื้นฟูป่าและปลูกป่าโดยใช้พันธุ์ไม้ป่าและพืชป่า ที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาให้เห็นในภาพรวมและเข้าใจง่าย และสามารถนำไปขยายผลต่อยอดในการบริหารจัดการป่าไม้และสัตว์ป่าได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์และให้ความรู้แก่หน่วยงานในสังกัดกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เช่น กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง และกรมป่าไม้ ในการวางแผนนโยบายการบริหารจัดการทรัพยากรป่าไม้ในการอนุรักษ์และป้องกันไม้ป่าหวงห้ามในไม้ป่าในบัญชีแนบท้ายไซเตสโดยเฉพาะไม้พะยุง และไม้มีค่าที่ถูกคุกคาม เช่น ไม้ชิงชัน และชนิดอื่นๆ ตลอดจนการฟื้นฟูป่า และสำนักงานตำรวจแห่งชาติในการบังคับใช้กฎหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถทราบวิธีการศึกษาทางพันธุกรรมของไม้ป่าในคดีของไม้ของกลางว่าดำเนินการอย่างไร วิเคราะห์ผลอย่างไร และได้ทราบผลและทำการส่งตัวอย่างมาขอความช่วยเหลือให้พิสูจน์พันธุกรรมไม้ของกลางในอนาคตว่าควรทำอย่างไร รวมทั้งได้ให้ข้อเสนอแนะว่าควรบริหารจัดการของกลางทั้งไม้ป่าและสัตว์ป่าอย่างไร และการวางแผนการปฏิบัติงานและการเขียนรายงานการวินิจฉัยพันธุกรรมไม้ป่าและสัตว์ป่าอย่างไร นอกจากนี้ยังมีความรู้ดังกล่าวสามารถเผยแพร่สู่ นิสิต นักศึกษา ตลอดจนมหาวิทยาลัย สถานศึกษา นักวิชาการ นักวิจัย นักวิทยาศาสตร์ ในการได้รับความรู้ ความเข้าใจว่าหน่วยงานภาครัฐดำเนินการบริหารจัดการทรัพยากรป่าไม้และสัตว์ป่าโดยใช้องค์ความรู้ด้านพันธุศาสตร์ป่าไม้และสัตว์ป่าอย่างไร

สุจิตรา จางตระกูล

กันยายน 2564

บทที่ 1

พันธุศาสตร์ป่าไม้ระดับโมเลกุล

ความสำคัญของพันธุศาสตร์ป่าไม้ระดับโมเลกุล

ทรัพยากรป่าไม้ของประเทศไทยได้ถูกทำลายและลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งขณะนี้เหลือพื้นที่ป่าอยู่เพียง 31.68 เปอร์เซ็นต์ (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2563) จากความตื่นตัวในการเห็นความสำคัญของทรัพยากรธรรมชาติและการอนุรักษ์ทรัพยากรด้านป่าไม้จึงได้มีการศึกษาในระบบนิเวศชนิดพันธุ์พืชและไม้ป่าเพิ่มขึ้นอย่างกว้างขวาง แต่การศึกษาทางด้านพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่ายังมีการศึกษาอยู่น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาวิจัยสาขาอื่นโดยเฉพาะในประเทศไทย

ทฤษฎีทางวิวัฒนาการทำให้เราทราบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งต่อการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด หากไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงตลอดเวลาได้และจะค่อยๆ สูญพันธุ์ไปในที่สุด การวัดระดับและการกระจายความหลากหลายทางพันธุกรรมได้นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์และการอนุรักษ์พันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลาย (Hamrick *et al.*, 1991)

การที่จะเข้าใจรูปแบบของความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในและระหว่างหมู่ไม้หรือประชากร เป็นสิ่งที่ต้องกระทำในระยะเริ่มต้นของการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์ไม้ป่า เช่น การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials) การทำสวนผลิตเมล็ดพันธุ์ไม้ป่า (Clonal and seedling seed orchard) และการทดสอบลูกไม้ (Progeny test) อย่างไรก็ตามมีวิธีการอยู่หลายวิธีซึ่งสามารถนำมาศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในและระหว่างหมู่ไม้ได้ซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะใดที่ต้องการศึกษาโดยทั่วไป การใช้ลักษณะทางปริมาณ (Quantitative traits) ที่ใช้กับโครงการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์ไม้ป่า คือ การวัดความโต ความสูง ความตรง ปริมาตรเนื้อไม้ และมวลชีวภาพ ฯลฯ มาใช้ประกอบการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมดังกล่าว อย่างไรก็ตามลักษณะดังกล่าวข้างต้น เป็นลักษณะที่มีอิทธิพลจากลักษณะทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม (Phenotype = Genotype + Environment) โดยถูกควบคุมจากยีนหลายยีน (Polygenes) ทำให้การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมดังกล่าวเป็นไปได้ยากและได้ผลไม่แน่ชัด เพราะความแตกต่างที่วัดได้ อาจไม่ได้มาจากลักษณะทางพันธุกรรมทั้งหมด และยังต้องใช้เวลานาน ประกอบกับไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมให้คงที่ในภาคสนามได้ตลอดเวลา

อย่างไรก็ตามการศึกษาพันธุศาสตร์ป่าไม้ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม (Molecular genetic markers) มาศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของไม้ป่าโดยเฉพาะเครื่องหมาย ไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme gene markers) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ได้ถูกนำมาใช้ ในงานด้านพันธุศาสตร์ป่าไม้มากกว่า 40 ปีมาแล้วในต่างประเทศ และในประเทศไทยเมื่อประมาณ 30 ปีที่ผ่านมาทั้งนี้เพราะว่ามีข้อดี คือ เป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยลักษณะพันธุกรรมโดยตรง โดยไม่มีสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องและเพราะว่าไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme) มีผลเกี่ยวข้องกับ Gene โดยตรง เนื่องจาก Enzyme คือ Protein product ที่ถูกแปลรหัสและควบคุมโดยลำดับของ DNA nucleotides ในหน่วยของพันธุกรรม (Gene) (Rudin, 1977) ดังนั้นความแตกต่างทางพันธุกรรมที่วัดได้จาก เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ยีน (Isoenzyme gene markers) จะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยตรง ซึ่งสามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมของต้นไม้นี้ได้ว่าเป็น Homozygous หรือ Heterozygous (สุจิตรา,

2536ก) ส่วนการศึกษาพันธุกรรมไม้ป่าโดยใช้ เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) สามารถศึกษาได้กว้างขวางขึ้นทั้งใน Nucleus genome และ Cytoplasmic genome (Chloroplast และ Mitochondrial genome) ซึ่งมีระบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน กล่าวคือ ใน Nucleus genome จะมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากทั้งพ่อและแม่ ส่วนใน Chloroplast และ Mitochondrial genome จะมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมไม่จากพ่อก็จากแม่ขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ไม้ (Szmidt *et al.*, 1987) ซึ่งจะเห็นว่าการศึกษาที่ได้จาก Molecular genetic markers ดังกล่าวสามารถทำการศึกษาศัพพันธุ์ของพันธุ์ไม้ ตั้งแต่ระดับต้น (Clone) จนถึงระดับประชากรทั้งภายในและระหว่างหมู่ไม้และชนิดพันธุ์ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำมาประยุกต์ทั้งด้านการอนุรักษ์พันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่าได้นอกจากนี้ยังใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่าและสามารถประหยัดงบประมาณและแรงงานและมีความถูกต้องและแม่นยำสูงกว่าการศึกษาวินิจฉัยแบบดั้งเดิม

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม (Molecular genetic markers)

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม (Molecular genetic markers) โดยใช้ Electrophoresis สามารถนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากร ตลอดจนระบบการสืบพันธุ์ของพันธุ์ไม้แต่ละชนิดได้ เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular genetic markers) ดังกล่าวมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด กล่าวคือไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงลักษณะซ่มคู่ (Codominant markers) ที่ถูกนำมาในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ป่าไม้ตั้งแต่ช่วงต้นของปี ค.ศ. 1970 ในปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุล (Markers) นี้ มีผู้นิยมน้อยลงแต่ก็มีความเหมาะสมสำหรับศึกษาระบบการสืบพันธุ์ (Mating system) และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ชนิดต่างๆ ต่อมา (DNA markers) ได้ถูกพัฒนาขึ้นในช่วงปี ค.ศ. 1990 เทคนิคใหม่ๆ ได้ถูกพัฒนาและนำมาประยุกต์ใช้ เช่น PCR (Polymerase Chain Reaction) based markers เช่น RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP's (Amplified Fragment Length Polymorphisms), PCR-SSR (Simple Sequence Repeat หรือ Microsatellites), PCR-SSCP (Single Stranded Confirmation Polymorphisms), PCR-RELP's และการถอดรหัสพันธุกรรม (DNA sequencing) โดยตรงจาก PCR products ในปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) เช่น Microsatellites และ AFLP's ได้ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ป่าอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เพราะสามารถศึกษา Polymorphic loci มากกว่า Isoenzymes (Changtragoon, 1998; Szmidt, 1995)

การศึกษาวินิจฉัยโดยเครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม (Molecular genetic markers) แต่ละชนิดตามวัตถุประสงค์ที่ศึกษาในพันธุ์ไม้หลายชนิด ได้สรุปไว้พอสังเขปในตารางที่ 1.1 ส่วนการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์พืชและไม้ในประเทศเขตร้อนได้สรุปพอสังเขปตามภูมิภาคเอเชียใต้แสดงในตารางที่ 1.2 และจากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ป่าเขตอบอุ่นและไม้ป่าเขตร้อนพบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ป่าเขตร้อนมีค่าสูงกว่ามาก กล่าวคือไม้เขตร้อนมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (Genetic differentiation among populations) 0.109 (10.9%) (Hamrick *et al.*, 1992) ส่วนไม้เขตอบอุ่นมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเพียง 0.38 (0.38%) (Loveless, 1992) ดังนั้นเราควรตระหนักถึงความสำคัญของพันธุ์ไม้ป่าของประเทศเรา ซึ่งเป็นหนึ่งในแหล่งทรัพยากรที่มีค่าด้านป่าไม้ของกลุ่มประเทศป่าเขตร้อน และสมควรอย่างยิ่งที่จะหาแนวทางและมาตรการในการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมทางด้านป่าไม้ที่มีค่านี้อย่างมีประสิทธิภาพและถูกต้อง

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างของการศึกษาพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมไม้ป่าโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม (molecular genetic markers) ดัดแปลงมาจาก Finkeldey (1998) และ สุจิตรา (2543)

ชนิดพันธุ์	เครื่องหมายโมเลกุล	เอกสารอ้างอิง
การประยุกต์ใช้: 1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity)		
- <i>Abies alba</i>	- Cp (RFLP's)	- Ziegenhagen <i>et al.</i> , 1995
- <i>Acacia mangium</i> และ <i>A. melanoxylon</i>	- Isoenzyme	- Moran, 1992
- <i>Aquilaria malaccensis</i> และ <i>A. hirta</i>	- RAPDs	- Lee <i>et al.</i> , 2011
- <i>Azadirachta</i> spp.	- Isoenzyme	- Changtragoon <i>et al.</i> , 1996a
- <i>Calamus palustris</i>	- RAPD and Isoenzyme	- Changtragoon <i>et al.</i> , 1995, 1996, 2001
- <i>Dalbergia oliveri</i>	- SSRs	- สุจิตรา และคณะ, 2564; Hartvig <i>et al.</i> , 2017
- <i>D. choichinchinensis</i>	- SSRs	- สุจิตรา และคณะ, 2561
- <i>Dipterocarpus tempehes</i>	- SSRs	- Kenta <i>et al.</i> , 2004
- <i>Dryobalanops aromatic</i>	- SSRs	- Nanami <i>et al.</i> , 2007
- <i>Dryobalanops aromatica</i>	- Isoenzyme	- Lee <i>et al.</i> , 2000
- <i>Entandrophragma cylindricum</i>	- SSRs	- Jolivet and Degen, 2012
- <i>Gonystylus bancanus</i>	- SSRs	- Ng <i>et al.</i> , 2009
- <i>Hopea bilitonensis</i>	- SSRs	- Lee <i>et al.</i> , 2004a
- <i>Intsia palembanica</i>	- SSRs	- Wong <i>et al.</i> , 2009
- <i>Koompassia malaccensis</i>	- SSRs	- Lee <i>et al.</i> , 2006
- <i>Melaleuca cajuputi</i>	- Isoenzyme	- Changtragoon and Szmidt, 1997
- <i>Neobalanocarpus heimii</i>	- STRs	- Tnah <i>et al.</i> , 2009, 2010
- <i>Pinus attenuate</i> และ <i>P. radiata</i>	- RELPs	- Strauss <i>et al.</i> , 1992
- <i>Pinus merkusii</i>	- Isoenzyme	- Changtragoon and Finkeldey, 1995a; 1995b
- <i>Pinus merkusii</i> และ <i>P. kesiya</i>	- Isoenzyme	- Szmidt <i>et al.</i> , 1996a
- <i>Pinus merkusii</i> และ <i>P. kesiya</i>	- Cp (RFLP's)	- Szmidt <i>et al.</i> , 1996a
- <i>Pinus</i> spp.	- Cp (RFLP's)	- Wang and Szmidt, 1994
- <i>Pinus sylvestris</i>	- RAPDs	- Szmidt <i>et al.</i> , 1996b
- <i>Populus balsamea</i>	- Isoenzyme	- Hamrick <i>et al.</i> , 1992
- <i>Prunus avium</i>	- RAPDs	- Kulkarni and Deshpande, 2006
- <i>Prunus persica</i>	- RAPDs	- Villagomez <i>et al.</i> , 2009
- <i>Pterocarpus macrocarpus</i>	- Isoenzyme	- Liengsiri <i>et al.</i> , 1995; Finkeldey <i>et al.</i> , 1998; 1999
- <i>Quercus geminata</i>	- SSRs	- Kathleen <i>et al.</i> , 2007
- <i>Quercus robor</i>	- Isoenzyme	- Mueller-Starck <i>et al.</i> , 1992
- <i>Quercus robur</i>	- SSRs	- Degen <i>et al.</i> , 2010
- <i>Quercus robur</i> และ <i>Q. petraea</i>	- RFLPs	- Kremer <i>et al.</i> , 1991
- <i>Shorea acuminata</i>	- SSRs	- Naito <i>et al.</i> , 2008
- <i>Shorea cordifolia</i>	- SSRs	- Stacy <i>et al.</i> , 2001
- <i>Shorea curtisii</i>	- SSRs	- Obayashi <i>et al.</i> , 2002

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	เครื่องหมายโมเลกุล	เอกสารอ้างอิง
การประยุกต์ใช้: 1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity)		
- <i>Shorea curtisii</i> และ <i>Dipterocarpaceae</i> sp.	- SSRs	- Ujino <i>et al.</i> , 1998
- <i>Shorea leprosula</i>	- SSRs	- Nagamitsu <i>et al.</i> , 2001
- <i>Shorea leprosula</i> และ <i>S. ovalis</i>	- SSRs	- Kevin <i>et al.</i> , 2004
- <i>Shorea leprosula</i> และ <i>S. parvifolia</i>	- SSRs	- Lee <i>et al.</i> , 2004b
- <i>Shorea leprosula</i> และ <i>S. parvifolia</i>	- SSRs	- Tani <i>et al.</i> , 2009
- <i>Swietenia macrophylla</i>	- SSRs	- Degen <i>et al.</i> , 2013
- <i>Tectona grandis</i>	- SSRs	- Verhaegen <i>et al.</i> , 2005
- <i>Thuja plicata</i>	- SSRs	- White <i>et al.</i> , 2000
- <i>Zingiber officinale</i>	- ISSRs	- Harith <i>et al.</i> , 2013
- <i>Zingiber officinale</i>	- Retrotransposon, ISSRs และ SSRs	- Pandotra <i>et al.</i> , 2013
การประยุกต์ใช้: 2. ระบบการสืบพันธุ์ (Mating system)		
2.1 Selfing rate		
- <i>Pinus merkusii</i> (Selfing rate 50%)	- Isoenzyme	- Changtragoon and Finkeldey, 1995b
- <i>Pinus sylvestris</i> (Selfing rate 16%)	- Isoenzyme	- Yeh, 1989
- <i>Pinus sylvestris</i> (Selfing rate 16%)	- Isoenzyme	- Szmidt, 1984
- <i>Rhizophora apiculata</i> (Selfing rate 16%)	- Isoenzyme	- สุจิตรา, 2550
- <i>Tectona grandis</i> (Selfing rate 16%)	- Isoenzyme	- Changtragoon and Szmidt, 1999
การประยุกต์ใช้: 2. ระบบการสืบพันธุ์ (Mating system)		
2.2 Pollen Contamination		
- <i>Acacia auriculiformis</i> (Controlled crosses)	- Isoenzyme	- Changtragoon, 1997; 2000
- <i>Acacia mangium</i> และ <i>A. Auriculiformis</i> (Controlled crosses)	- Isoenzyme	- Ratnam, 1989
- <i>Betula alleghaniensis</i> (Controlled crosses)	- RAPD	- Roy <i>et al.</i> , 1992
- Douglas fir (Seed orchard 21-89%)	- Isoenzyme	- Wheeler and Jech, 1992
- <i>Pinus sylvestris</i> (Seed orchard >50%)	- Isoenzyme	- Wang <i>et al.</i> , 1991
การประยุกต์ใช้: 3. การวินิจฉัยชนิดพันธุ์ และ clone (Species and clone identification)		
3.1 Species		
- <i>Acacia auriculiformis</i>	- Isoenzyme	- Changtragoon and Woo, 1996
- American และ Mexican pines	- RAPD	- Furman <i>et al.</i> , 1997
- <i>Aquilaria beccariana</i> , <i>Cocos nucifera</i> , <i>Dalbergia latifolia</i> , <i>Pinus contorta</i> , <i>Santalum album</i> , <i>Strychnos ignatii</i> , <i>Thuja</i> sp. และ <i>Terminalia catappa</i>	- DNA barcode	- Lee <i>et al.</i> , 2019
- <i>Aquilaria crassna</i> , <i>A. malaccensis</i> และ <i>A. sinensis</i>	- real-time PCR	- Lee <i>et al.</i> , 2016
- <i>Aquilaria malaccensis</i>	- SNPs	- Mohamed <i>et al.</i> , 2012

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	เครื่องหมายโมเลกุล	เอกสารอ้างอิง
การประยุกต์ใช้: 3. การวินิจฉัยชนิดพันธุ์ และ clone (Species and clone identification)		
3.1 Species		
- <i>Aquilaria malaccensis</i> และ <i>A. hirta</i>	- SCARs	- Lee <i>et al.</i> , 2011
- <i>Aquilaria sinensis</i>	- DNA barcode	- Jiao <i>et al.</i> , 2013
- <i>Asian Pinus</i> spp	- Cp (RFLP's)	- Wang and Szmidi, 1993
- <i>Azadirachta</i> spp.	- Isoenzyme, <i>MatK</i> (CP genome)	- Changtragoon <i>et al.</i> , 1996a; สุจิตรา, 2554
- <i>Cryptomeria japonica</i>	- DNA barcode	- Abe <i>et al.</i> , 2011
- <i>Cunninghamia lanceolate</i>	- SNPs	- Jiao <i>et al.</i> , 2012
- <i>Cunninghamia lanceolate</i> , <i>C. bungei</i> และ <i>Fraxinus chinensis</i>	- SNPs	- Tang <i>et al.</i> , 2011
- <i>Dalbergia odorifera</i> , <i>D. Retusa</i> , <i>D. melanoxylon</i> , <i>D. Cochinchinensis</i> , <i>D. oliveri</i> , <i>D. Sterensonil</i> , <i>D. Latifolia</i> , <i>D. hainanensis</i> และ <i>D. hupeana</i>	- DNA barcode	- Yu <i>et al.</i> , 2017
- <i>Dalbergia</i> spp.	- SNPs	- Hassold <i>et al.</i> , 2016
- <i>Dalbergia</i> spp.	- <i>MatK</i> (CP genome)	- Changtragoon and Singthong, 2016
- <i>Dalbergia</i> spp.	- DNA barcode	- Hartvig <i>et al.</i> , 2015
- <i>Dalbergia tamarindifolia</i> , <i>D. Rubiginosa</i> , <i>D. pinnata</i> และ <i>D. candenatensis</i>	- DNA barcode	- Li <i>et al.</i> , 2017
- <i>Gonystylus</i> sp.	- SNPs	- Ng <i>et al.</i> , 2016
- <i>Gonystylus</i> spp., <i>Solmsia calophylla</i> , <i>Arnhemia cryptantha</i> , <i>Lethedon cernua</i> , <i>Alstonia</i> spp., <i>Anthocephalus</i> spp., <i>Brosimum</i> spp., <i>Dyera costulata</i> , <i>Instia</i> spp., <i>Jacaranda copaia</i> , <i>Quassia amara</i> <i>Shorea</i> spp. และ <i>Simaruba amara</i>	- SNPs	- Ogden <i>et al.</i> , 2008
- <i>Intsia palembanica</i>	- SNPs	- Ng <i>et al.</i> , 2020
- <i>Neobalanocarpus heimii</i>	- SNPs	- Tnah <i>et al.</i> , 2009
- <i>Picea mariana</i> และ <i>P. rubens</i>	- RAPD	- Perron <i>et al.</i> , 1995
- <i>Pinus densiflora</i> และ <i>P. sylvestris</i>	- Cp (RFLP's)	- Szmidi and Wang, 1993
- <i>Pinus merkusii</i> และ <i>P. kesiya</i>	- Cp (RFLP's)	- Szmidi <i>et al.</i> , 1996a
- <i>Pinus sylvestris</i> และ <i>P. mugo</i>	- Cp (RFLP's)	- Filppula <i>et al.</i> , 1992
- <i>Pinus taeda</i> และ <i>P. palustris</i>	- DNA barcode	- Reynolds and Williams, 2004
- <i>Populus</i> spp.	- Nu (RFLP's)	- Wagner, 1992
- <i>Pterocarpus Santalinus</i> , <i>P. Erinaceus</i> , <i>P. santalinus</i> , <i>P. zenkeri</i> , <i>P. indicus</i> และ <i>P. marsupium</i>	- DNA barcode	- Jiao <i>et al.</i> , 2018
- <i>Quercus petraea</i>	- SNPs	- Deguilloux <i>et al.</i> , 2014

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	เครื่องหมายโมเลกุล	เอกสารอ้างอิง
การประยุกต์ใช้: 3. การวินิจฉัยชนิดพันธุ์ และ clone (Species and clone identification)		
3.1 Species		
- <i>Aquilaria malaccensis</i> และ <i>A. hirta</i>	- SCARs	- Lee <i>et al.</i> , 2011
- <i>Aquilaria sinensis</i>	- DNA barcode	- Jiao <i>et al.</i> , 2013
- <i>Asian Pinus</i> spp	- Cp (RFLP's)	- Wang and Szmidt, 1993
- <i>Azadirachta</i> spp.	- Isoenzyme, <i>MatK</i> (CP genome)	- Changtragoon <i>et al.</i> , 1996a; สุจิตรา, 2554
- <i>Cryptomeria japonica</i>	- DNA barcode	- Abe <i>et al.</i> , 2011
- <i>Cunninghamia lanceolate</i>	- SNPs	- Jiao <i>et al.</i> , 2012
- <i>Cunninghamia lanceolate</i> , <i>C. bungei</i> และ <i>Fraxinus chinensis</i>	- SNPs	- Tang <i>et al.</i> , 2011
- <i>Quercus</i> spp.	- RAPD	- Moreau <i>et al.</i> , 1992
- <i>Shorea platyclados</i>	- SNPs	- Ng <i>et al.</i> , 2017
- <i>Tectona grandis</i> , <i>Dalbergia latifolia</i> และ <i>Lagerstroemia lanceolata</i>	- SNPs	- Fatima <i>et al.</i> , 2019
การประยุกต์ใช้: 3. การวินิจฉัยชนิดพันธุ์ และ clone (Species and clone identification)		
3.2 Clones		
- <i>Acacia auriculiformis</i> (Hybrid)	- Isoenzyme	- Changtragoon and Woo, 1996
- <i>Eucalyptus</i> spp.	- RAPD	- Kiel and Griffin, 1994
- <i>Picea glauca</i>	- RAPD	- Hong <i>et al.</i> , 1992
- <i>Picea sitchensis</i>	- RAPD	- Van de ven and McNicol, 1995

ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์พืชและไม้ป่าเขตร้อนและการประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมภูมิภาคเอเชียพอสังเขป

ชนิดไม้	แหล่งของข้อมูล
<i>Calamus palustris</i>	Changtragoon <i>et al.</i> , 1995; Changtragoon, 1998
<i>Calamus</i> spp.	Bon <i>et al.</i> , 1995
<i>Pinus merkusii</i>	Changtragoon and Finkeldey, 1995a; Szmidt <i>et al.</i> , 1996a
<i>Paulownia taiwaniana</i>	Finkeldey, 1992
<i>Tectona grandis</i>	Kertadikara and Prat, 1995; Changtragoon, 2001a; Changtragoon and Szmidt, 1999; 2000
<i>Agathis borneensis</i>	Kitamura and Rahman, 1992
<i>Stemonoporus oblongifolius</i>	Murawski and Bawa, 1994
<i>Pterocarpus macrocarpus</i>	Liengsiri <i>et al.</i> , 1995
<i>Drybalanops</i> spp.	Shiraishi <i>et al.</i> , 1994
<i>Azadarachta</i> spp.	Changtragoon <i>et al.</i> , 1996a
<i>Dipterocarpus alatus</i>	Changtragoon, 2001b
<i>Rhizophora apiculata</i>	สุจิตรา, 2550
<i>R. mucronata</i>	สุจิตรา, 2550
<i>Bambusa bambos</i>	รังสัน และสุจิตรา, 2548
<i>Dalbergia choichinchinensis</i>	สุจิตรา และคณะ, 2561
<i>D. oliveri</i>	สุจิตรา และคณะ, 2564

1.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประเทศไทย

ในประเทศไทยโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่าโดยการประยุกต์ใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ยีน และเครื่องหมายดีเอ็นเอ (isoenzyme gene และ DNA markers) เพื่อนำมาจำแนกชนิดพันธุ์ clone แม่ไม้พันธุ์ดี พิสูจน์ลูกผสม ตลอดจนการประเมินสถานภาพแหล่งพันธุกรรมโดยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและระบบการสืบพันธุ์ของไม้ป่าหลายชนิด ซึ่งจากผลงานที่ผ่านมาได้นำ isoenzyme gene markers มาใช้จำแนกพันธุ์ไม้สะเดาไทย สะเดาอินเดียและไม้เทียม (Changtragoon *et al.*, 1996a) ออกจากกันซึ่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก และได้ศึกษาเพิ่มเติมซึ่งจากผลการวิจัยที่ได้กล่าวได้ว่า ไม้สะเดาไทยเป็นพันธุ์ไม้สะเดาอีกชนิดหนึ่ง (Species) ไม่ใช่เป็นสายพันธุ์หนึ่งของไม้สะเดาอินเดีย และได้มีการศึกษาเพิ่มเติมใน Maturase K gene ในคลอโรพลาสต์จีโนม (สุจิตรา, 2554) มีผลการศึกษาไปในทิศทางเดียวกัน ตามที่เข้าใจแต่ครั้งก่อนอย่างไรก็ตามได้ทำการศึกษากการถอดรหัสพันธุกรรมในดีเอ็นเอในยีนเพิ่มเติมรวมทั้งศึกษาในเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อเป็นข้อมูล

ประกอบเพิ่มเติมผลงานกำลังรอตีพิมพ์อยู่ นอกจากนี้จะต้องปรึกษากับผู้เชี่ยวชาญด้านพฤกษศาสตร์ต่อไป ในหว่ายสามารถจำแนกพันธุ์หว่าย 9 ชนิดที่มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันโดยใช้ DNA markers ได้ (Changtragoon *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังใช้วิธีฉายแม่ไม้ที่ถูกขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการเสียบยอด ติดตา ปักชำ ในไม้สะเดาไทย ไม้สัก และไม้กระถินณรงค์ที่ถูกนำมาปลูกในแปลงรวมแม่ไม้พันธุ์ดีว่าเป็นแม่ไม้พันธุ์ดีตามที่ได้คัดเลือกมาที่ถูกต้องหรือไม่ เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และผสมข้ามได้อย่างถูกต้องต่อไป ส่วนการผสมข้ามพันธุ์แม่ไม้พันธุ์ดีในไม้กระถินณรงค์เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะดีตามที่ต้องการนั้น ได้มีการวินิจฉัยลูกผสม (Hybrids) ที่ได้ว่าต้นใดเป็นลูกผสมที่แท้จริงโดยใช้ เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ยีน (isoenzyme gene markers) (สุจิตรา และคณะ, 2536; Changtragoon, 1996; Changtragoon and Woo, 1996; Changtragoon, 1997; Changtragoon *et al.*, 1998; Changtragoon, 2000)

ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่าได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม (molecular genetic markers) หลายชนิด ดังกล่าวข้างต้นในการประเมินสถานภาพแหล่งพันธุกรรมของไม้สนสองใบ ไม้สนสามใบ (Changtragoon and Finkeldey, 1995b; Szmidt *et al.*, 1996a) ไม้สัก (Changtragoon and Szmidt, 1999; Changtragoon and Szmidt, 2000) ไม้สะเดา (Changtragoon *et al.*, 1996a) ไม้ยางนา (สุจิตรา และบุญชูบ, 2542; Changtragoon, 2001b) ไม้เสม็ดขาว (สุจิตรา, 2537) ไม้ตุ่มกว้าว หว่าย ประ (Changtragoon and Finkeldey, 2000) และไม้โกกทางใบเล็กและไม้โกกทางใบใหญ่ (สุจิตรา, 2540; สุจิตรา, 2550) ไม้พะยูน (สุจิตรา และคณะ, 2561; สุจิตรา และคณะ 2562) ไม้ชิงชัน (สุจิตรา และคณะ, 2564; สุจิตรา และกิตติยา 2564) เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการวางแผนและจัดการการอนุรักษ์พันธุกรรม และปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่าและพืชป่าตลอดจนการปลูกสร้างสวนป่าดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป ซึ่งการศึกษาวิจัยดังกล่าวข้างต้นรวมทั้งการศึกษาวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้องได้สรุปไว้ในตารางที่ 1.3 และ 1.4 การพัฒนาตีเอ็นเอบาร์โค้ดในไม้หลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 1.5 รายละเอียดสามารถศึกษาเพิ่มเติมจาก Changtragoon *et al.* (2017) นอกจากนี้ได้สรุปตัวอย่างการศึกษาพันธุกรรมในไม้ป่าด้วยเครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรมเพื่อประยุกต์ใช้งานนิติวิทยาศาสตร์ป่าไม้ในประเทศต่างๆดังตารางที่ 1.6

จนถึงปัจจุบันการเปรียบเทียบสถานภาพการศึกษาด้านพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ molecular genetic markers ของแต่ละกลุ่มประเทศในโลก โดยสรุปพอสังเขปในตารางที่ 1.7 ซึ่งจะเห็นว่าประเทศไทยได้มีการพัฒนาขึ้นมากกว่าอดีต ซึ่งถือว่าอยู่ในระดับกลางของการศึกษาวิจัยด้านนี้อยู่ จึงสมควรอย่างยิ่งที่จะได้มีการสนับสนุนให้มีการศึกษาวิจัยอย่างจริงจังและต่อเนื่อง เพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านอนุรักษ์พันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่า และการปลูกสร้างสวนป่าให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (สุจิตรา, 2543)

ตารางที่ 1.3 การศึกษาพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมไม้ป่า โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular genetic markers) เพื่อการประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ และอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่าในประเทศไทย

ชนิด	การประยุกต์ใช้	เครื่องหมายโมเลกุล	เอกสารอ้างอิง
<i>A. indica</i> var. <i>siamensis</i>	-Genetic diversity -DNA fingerprinting -Mating system	-Isoenzyme - microsatellite -Isoenzyme	- Changtragoon <i>et al.</i> , 1996a - Boontong <i>et al.</i> 2009 - Changtragoon <i>et al.</i> , 1996a
<i>A.exelsa</i>	-Genetic diversity	-Isoenzyme	- Changtragoon <i>et al.</i> , 1996a
<i>Acacia auriculiformis</i>	-Clonal identification -Mating system -Controlled crosses -Hybrid identification	-Isoenzyme -Isoenzyme -Isoenzyme -Isoenzyme	- Changtragoon, 1996 - Changtragoon and Woo, 1996 - Changtragoon, 1997 - Changtragoon <i>et al.</i> , 1998 - Changtragoon, 2000
<i>Avicennia alba</i>	-DNA fingerprinting	-microsatellite	- Arnaud-Haond <i>et al.</i> , 2009
<i>Azadirachta indica</i>	-Genetic diversity	-Isoenzyme -AFLP	- Changtragoon <i>et al.</i> , 1996a - Singh <i>et al.</i> , 1999
<i>Azadirachta indica</i>	-DNA fingerprinting -Clonal identification	- microsatellite -Isoenzyme	- Boontong <i>et al.</i> , 2009 - สุจิตรา และคณะ, 2536; Changtragoon, 1996
<i>Bambusa bambos</i>	-Specie identification and genetic relationship -Genetic diversity -DNA fingerprinting	-AFLP -AFLP -microsatellite	- รังสัน และ สุจิตรา, 2548
<i>Calamus pulustris</i>	-Genetic diversity -Mating system	-Isoenzyme -RAPD -Isoenzyme	- Changtragoon <i>et al.</i> , 2001 - Changtragoon <i>et al.</i> , 1996b - สุจิตรา (ข้อมูลที่ยังไม่ได้เผยแพร่)
<i>Castanopsis acuminatissima</i>	-DNA fingerprinting	-microsatellite	- Blakesley <i>et al.</i> , 2004

ตารางที่ 1.3 (ต่อ)

ชนิด	การประยุกต์ใช้	เครื่องหมายโมเลกุล	เอกสารอ้างอิง
<i>Castanopsis</i> sp. <i>Lithocarpus</i> sp. <i>Quercus</i> sp.	-DNA fingerprinting	-ISSR	- Chokchaichamnankit <i>et al.</i> , 2008
<i>Ceriops tagal</i>	-DNA fingerprinting	-microsatellite	- Ge and Sun, 2001
<i>Cycas siamensis</i>	-Genetic diversity	-Isoenzyme	- Changtragoon and Finkeldey, 2000
<i>Dalbergia oliveri</i>	-DNA fingerprinting -Genetic diversity	-microsatellite -SNPs	- สุจิตรา และ คณะ, 2564 - สุจิตรา และ กิตติยา, 2564: Changtragoon and Singthong, unpublished data
<i>D. cochinchinnensis</i>	-Genetic diversity	-Isoenzyme -SNPs	-Soonhuae <i>et al.</i> , 1995 - สุจิตรา และ คณะ, 2562
<i>D. cochinchinnensis</i>	-DNA fingerprinting	-microsatellite	- สุจิตรา และ คณะ, 2561;
<i>Dipterocarpus alatus</i>	-Genetic diversity	-Isoenzyme	- สุจิตรา และบุญชูบ, 2542 - Changtragoon, 2001b
<i>Eleais guineensis</i>	-DNA fingerprinting	-microsatellite	- Taeprayoon <i>et al.</i> , 2015
<i>Melientha suavis</i>	-Genetic diversity	-RAPD	- Prathepha, 2000
<i>P.khasya</i>	- Genetic diversity	-Isoenzyme -Cp (RFLP's)	- Szmidt <i>et al.</i> , 1996a
<i>Paphiopedilum parishii</i>	-Genetic diversity	-AFLP	- จักรพันธ์ และ สุจิตรา, 2548; กนกอร และ ศุภลักษณ์, 2562
<i>Pinus merkusii</i>	-Genetic diversity -Mating system	-Isoenzyme -Cp (RFLP's) -Isoenzyme	- Changtragoon and Finkeldey, 1995a - Szmidt <i>et al.</i> , 1996a - Changtragoon and Finkeldey, 1995b
<i>Prunus cerasoides</i>	-DNA fingerprinting	-microsatellite	- Pakkad <i>et al.</i> , 2003
<i>Pterocarpus alatus</i>	-Genetic diversity -Mating system	-Isoenzyme -Isoenzyme	- Liengsiri <i>et al.</i> , 1995
<i>Quercus semiserrata</i>	-DNA fingerprinting	-microsatellite	- Pakkad <i>et al.</i> , 2008
<i>R. mucronata</i>	-Genetic diversity	-AFLP	- สุจิตรา, 2550
<i>Rhizophora apiculata</i>	-Genetic diversity -Mating system	-AFLP -Isoenzyme	- สุจิตรา, 2550 - สุจิตรา, 2550
<i>Shorea obtusa</i>	-DNA fingerprinting	-microsatellite	- Senakun <i>et al.</i> , 2011

ตารางที่ 1.3 (ต่อ)

ชนิด	การประยุกต์ใช้	เครื่องหมายโมเลกุล	เอกสารอ้างอิง
<i>Tamarindus indica</i>	-Genetic diversity	-RAPD	- Diallo <i>et al.</i> , 2007
<i>Tectona grandis</i>	-Clonal identification -DNA fingerprinting -Genetic diversity -Mating system	-Isoenzyme -RAPD -microsatellite -Isoenzyme -RAPD -Isoenzyme	- Changtragoon, 1996 - Changtragoon and Szmidt, 2000 - Hansen <i>et al.</i> , 2015; Fofana <i>et al.</i> , 2008; Fofana <i>et al.</i> , 2009 - Changtragoon and Szmidt, 2000 - Changtragoon, 2001a - Changtragoon and Szmidt, 1999
<i>Xylia xylocarpa</i>	-DNA fingerprinting	-SSCPs	- Wattanakulpakin <i>et al.</i> , 2015

ตารางที่ 1.4 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรมเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชและไม้ป่าเขตร้อนและพืชป่าในประเทศไทย

เครื่องหมายโมเลกุล	ชนิด	Genetic Diversity	Genetic differentiation		เอกสารอ้างอิง
			F _{ST}	G _{ST}	
AFLP	<i>Paphiopedilum parishii</i>	0.301	0.082		จักรพันธ์ และสุจิตรา, 2548
				0.21	กนกอร และ ศุภลักษณ์, 2562
	<i>Rhizophora apiculata</i>	0.316	0.250		สุจิตรา, 2550
	<i>Rhizophora mucronata</i>	0.385	0.212		สุจิตรา, 2550
SSR	<i>Bambusa bambos</i>	0.369	0.243		รังสัน และ สุจิตรา, 2548
	<i>Castanopsis acuminatissima</i>	0.483 - 0.537	0.006		Blakesley <i>et al.</i> , 2004
	<i>Eleais guineensis</i>	0.58±0.15	0.20		Taeprayoon <i>et al.</i> , 2015
	<i>Prunus cerasoides</i>	0.480 - 0.574	0.115		Pakkad <i>et al.</i> , 2003
	<i>Quercus semiserrata</i>	0.68 (nSSR) 0.16 (cpSSR)	0.12 0.83		Pakkad <i>et al.</i> , 2008
	<i>Shorea obtusa</i>	0.664	0.030	0.117	Senakun <i>et al.</i> , 2011
	<i>Tectona grandis</i>	0.63	0.227		Hansen <i>et al.</i> , 2015
		0.28-0.78	0.22		Fofana <i>et al.</i> , 2009
		0.489	0.21		Fofana <i>et al.</i> , 2008
	<i>Dalbergia cochinchinensis</i>	0.39	0.18		สุจิตรา และคณะ, 2561
		0.55		0.25	Hartvig <i>et al.</i> , 2017
	<i>Dalbergia oliveri</i>	0.77	0.13		สุจิตรา และคณะ, 2564
	<i>Azadirachta indica</i> var. <i>indica</i>	0.63			Boontong <i>et al.</i> , 2009
	<i>A. indica</i> var. <i>siamensis</i> <i>Avicennia alba</i>	0.61			
			0.06 ^{ns}		Arnaud-Haond <i>et al.</i> , 2009

ตารางที่ 1.4 (ต่อ)

เครื่องหมาย โมเลกุล	ชนิด	Genetic Diversity	Genetic differentiation		เอกสารอ้างอิง
			F _{ST}	G _{ST}	
ISSR	<i>Ceriops tagal</i>	0.0084		0.529	Ge and Sun, 2001
SSCPs	<i>Xylia xylocarpa</i>		0.061		Wattanakupakin <i>et al.</i> , 2015
Isoenzyme Gene markers	<i>Dipterocarpus datus</i>	0.0924	0.182		Changtragoon and Boontawee, 1999
	<i>Pinus merkusii</i>		0.128	0.067	Changtragoon, 2001b
	<i>Tectona grandis</i>	0.058	0.104		Changtragoon and Finkeldey, 1995b
	<i>Tectona grandis</i>	0.31	0.217		Changtragoon and Szmidt, 1999
RAPD	<i>Tectona grandis</i>	0.110-0.371	0.21		Changtragoon and Szmidt, 2000

ตารางที่ 1.5 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของพันธุ์ไม้ป่าเขตร้อนและพืชป่าในประเทศไทย

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด	ชนิด	เอกสารอ้างอิง
• <i>trnH-psbA</i>	<i>Senna alata</i> , <i>S. alexandrina</i> , <i>S. fruticosa</i> , <i>S. garrettiana</i> , <i>S. hirsuta</i> , <i>S. occidentalis</i> , <i>S. pallida</i> , <i>S. siamea</i> , <i>S. spectabilis</i> , <i>S. suljarea</i> , <i>S. surattensis</i> , <i>S. timorensis</i> , <i>S. tora</i>	Monkheang et al., 2011
• <i>MatK</i> • <i>rbcl</i> • <i>trnH-psbA</i>	<i>Avicennia alba</i>, <i>A. marina</i>, <i>Alstonia macrophylla</i>, <i>A. scholaris</i>, <i>Canarium denticulatum</i>, <i>C. subulatum</i>, <i>Anisoptera costata</i>, <i>Dipterocarpus alatus</i>, <i>D. kerrii</i>, <i>Shorea gratissima</i>, <i>S. roxburghii</i>, <i>S. siamensis</i>, <i>Vatica odorata</i>, <i>Diospyros malabarica</i>, <i>D. mollis</i>, <i>D. var. toposioides</i>, <i>Adenanthera pavonina</i>, <i>Albizia saman</i>, <i>Calleya atropurpurea</i>, <i>Cassia bakeriana</i>, <i>C. fistula</i>, <i>Dalbergia cochinchinensis</i>, <i>D. oliveri</i>, <i>Intsia palembanica</i>, <i>Parkia speciosa</i>, <i>Phyllocarpus septentrionalis</i>, <i>Sindora siamensis</i>, <i>Xylocarpus</i>, <i>Invigla malayana</i>, <i>Tectona hamiltoniana</i>, <i>Cinnamomum bejolghota</i>, <i>C. camphora</i>, <i>C. parthenoxylon</i>, <i>Careya arborea</i>, <i>Magnolia thailandica</i>, <i>Michelia baillonii</i>, <i>Neesia altissima</i>, <i>Pterospermum diversilium</i>, <i>P. jackianum</i>, <i>Azadirachta indica</i>, <i>Artocarpus thailandicus</i>, <i>Knema globularia</i>, <i>Fraxinus floribunda</i>, <i>Prunus cerasoides</i>, <i>Gardenia sootepensis</i>, <i>Strychnos nux-vomica</i> <i>Avicennia officinalis</i>, <i>Dracontomelon dao</i>, <i>Holarrhena pubescens</i>, <i>Wrightia arborea</i>, <i>Dillenia scabrella</i>, <i>Dipterocarpus intricatus</i>, <i>Vatica diospyroides</i>, <i>Diospyros hasseltii</i>, <i>D. montana</i>, <i>D. wallichii</i>, <i>Azela xylocarpa</i>, <i>Dalbergia assanica</i>, <i>D. parviflora</i>, <i>D. sissoo</i>, <i>Milletia leucantha</i>, <i>Pterocarpus macrocarpus</i>, <i>Cinnamomum iners</i>, <i>Michelia alba</i>, <i>Toona alata</i>, <i>Xylocarpus moluccensis</i>, <i>Nepenthes mirabilis</i>, <i>Phyllanthus emblica</i>, <i>Morinda coreia</i>, <i>Madhuca motleyana</i>, <i>M. pierrei</i>, <i>Tetrameles nudiflora</i>	สุจิตรา (ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่) รายละเอียดศึกษาได้จากบทที่ 14
• <i>MatK</i> • <i>trnH-psbA</i>	<i>Polyalthia viridi</i>, <i>Archidendron ellipticum</i>, <i>Lithocarpus fenestratus</i>, <i>Apodytes dimidiata</i>, <i>Beilschmiedia globularia</i>, <i>Phoebe lanceolata</i>, <i>Magnolia siirindhorniae</i>, <i>Chionanthus ramiflorus</i>, <i>Adinandra integririma</i>, <i>Xanthophyllum virens</i>, <i>Acronychia pedunculata</i>, <i>Aquilaria crassna</i>,	
• <i>rbcl</i> • <i>trnH-psbA</i>	<i>Hydnocarpus castaneas</i>, <i>Dracaena cochinchinensis</i>, <i>Stereospermum fimbriatum</i>, <i>Mapania cuspidata</i>, <i>Dipterocarpus obtusifolius</i>, <i>Hopea pierrei</i>, <i>H. odorata</i>, <i>Shorea laevis</i>, <i>Castanopsis inermis</i>, <i>Tectona grandis</i>, <i>Gmelina arborea</i>, <i>Vitex pinnata</i>, <i>Sonneratia alba</i>, <i>Aglaia grandis</i>, <i>Chukrasia tabularis</i>, <i>Xylocarpus granatum</i>, <i>Pinus merkusii</i>, <i>Podocarpus nerifolius</i>, <i>Carallia brachiata</i>, <i>Homalium tomentosum</i>, <i>Nephelium lappaceum</i>, <i>Sarcosperma arboretum</i>, <i>Stemonurus malaccensis</i>	

ตารางที่ 1.5 (ต่อ)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด	ชนิด	เอกสารอ้างอิง
MatK	<i>Buchanania arborescens</i>, <i>Semecarpus curtisii</i>, <i>Goniolathalamus laoticus</i>, <i>Cerbera odollam</i>, <i>Ilex confertiflora</i>, <i>Mammea siamensis</i>, <i>Mesua ferrea</i>, <i>Terminalia alata</i>, <i>Dillenia excels</i>, <i>Diospyros areolate</i>, <i>D. castanea</i>, <i>D. glandulosa</i>, <i>Elaeocarpus robustus</i>, <i>Endospermum diadenum</i>, <i>Peltophorum dasyrachis</i>, <i>Castanopsis acuminatissima</i>, <i>Platsea latifolia</i>, <i>Litsea glutinosa</i>, <i>Neolitsea siamensis</i>, <i>N. zeylanica</i>, <i>Lagerstroemia cuspidate</i>, <i>Sonneratia caseolaris</i>, <i>Hibiscus macrophyllus</i>, <i>Chisocheton cumingianus</i>, <i>Ficus benjamina</i>, <i>Eugenia cumini</i>, <i>Syzygium nervosa</i>, <i>S. claviflora</i>, <i>S. cumini</i>, <i>Eurya acuminata</i>, <i>Ardisia nervosa</i>, <i>Ochreinauclea maingayi</i>, <i>Mischocarpus pentapetalus</i>, <i>Styrax apricus</i>, <i>Symplocos lucida</i>, <i>Gmelina arborea</i>, <i>Alseodaphne bimanica</i>	
rbcl	<i>Acanthus ilicifolius</i>, <i>Hydnocarpus calvipetalus</i>, <i>Canaga odorata</i>, <i>Mangifera gedebe</i>, <i>M. lagenifera</i>, <i>Melodorum fruticosum</i>, <i>Mayodendron igneum</i>, <i>Calophyllum inophyllum</i>, <i>Parinari anamensis</i>, <i>Terminalia citrina</i>, <i>Alangium kurzii</i>, <i>Dillenia indica</i>, <i>Cotylelobium melanoxylon</i>, <i>Shorea hypochra</i>, <i>S. obtusa</i>, <i>Diospyros rhodcalyx</i>, <i>D. decandra</i>, <i>D. frutescens</i>, <i>D. undulata</i>, <i>Elaeocarpus rugosus</i>, <i>Cleidion javanicum</i>, <i>Cynometra malaccensis</i>, <i>Peltophorum pterocarpum</i>, <i>Pterocarpus indicus</i>, <i>Castanopsis costata</i>, <i>Fagraea fragrans</i>, <i>Garcinia atroviridis</i>, <i>G. cowa</i>, <i>G. eugenifolia</i>, <i>Cratoxylum cochinchinense</i>, <i>C. maingayi</i>, <i>Tectona philippinensis</i>, <i>Vitex glabrata</i>, <i>Cinnamomum ilicioides</i>, <i>C. verum</i>, <i>Barringtonia acutangula</i>, <i>Lagerstroemia calculata</i>, <i>L. speciose</i>, <i>Magnolia champaca</i>, <i>Heritiera littoralis</i>, <i>H. macrophylla</i>, <i>H. sumatrana</i>, <i>Aglaia cucullata</i>, <i>Lansium parasiticum</i>, <i>Artocarpus thailandicus</i>, <i>Horsfieldia amygdalina</i>, <i>Ochna integririma</i>, <i>Pinus kesiya</i>, <i>Dendrocalamus pendulus</i>, <i>Dacrydium elatum</i>, <i>Coccoloba uvifera</i>, <i>Bruguiera cylindrica</i>, <i>B. gymnorhiza</i>, <i>B. parviflora</i>, <i>Ceriops decandra</i>, <i>C. tagal</i>, <i>C. zippeliana</i>, <i>Limonia acidissima</i>, <i>Mimusops elengi</i>, <i>Palaquium obovatum</i>, <i>Scaphium affine</i>	
tmH-psbA	<i>Canaga odorata</i>, <i>Casuarina equisetifolia</i>, <i>Calocedrus macrolepis</i>, <i>Tamarindus indica</i>, <i>Lithocarpus vestitus</i>, <i>Quercus kingiana</i>, <i>Syzygium siamense</i>, <i>Canthium parvifolium</i>, <i>Lepisanthes rubiginosa</i>, <i>Symplocos longifolia</i>, <i>S. sumuntia</i>,	

ตารางที่ 1.6 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรมเพื่องานด้านนิติวิทยาศาสตร์ไม้ป่าในประเทศต่างๆ

ประเทศที่ศึกษา	ชนิดพืช	ชนิดของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ศึกษา	เครื่องหมายโมเลกุล	อ้างอิง
ประเทศมาเลเซีย	<i>Gonystylus</i> spp. และอีกหลายชนิด	- ใบ - ไม้แปรรูป	SNP markers	Ogden <i>et al.</i> , 2008
	<i>Neobalanocarpus heimii</i>	- ใบ - เปลือกชั้นใน	STR markers	Tnah <i>et al.</i> , 2010
	<i>Neobalanocarpus heimii</i>	- ใบ - เปลือกชั้นใน	cpDNA markers	Tnah <i>et al.</i> , 2009
	<i>Aquilaria malaccensis</i>	- เนื้อไม้สด - เศษไม้	real-time PCR	Mohamed <i>et al.</i> , 2012
	<i>Aquilaria beccariana</i> และอีกหลายชนิด	- ใบสด	DNA barcodes	Lee <i>et al.</i> , 2019
	<i>Shorea platyclados</i>	- ใบ - เปลือกชั้นใน	cpDNA markers	Ng <i>et al.</i> , 2017
	<i>Gonystylus</i> sp.	- ใบ - เปลือกชั้นใน	cpDNA markers	Ng <i>et al.</i> , 2016
ประเทศฝรั่งเศส	<i>Quercus petraea</i>	- เศษไม้	cpDNA markers	Deguilloux <i>et al.</i> , 2014
ประเทศแคนาดา	<i>Thuja plicata</i>	- แผ่นไม้	SSR markers	White <i>et al.</i> , 2000
ประเทศสหรัฐอเมริกา	<i>Quercus geminata</i>	- ใบ	SSR markers	Kathleen <i>et al.</i> , 2007
ประเทศมาดากัสการ์	<i>Dalbergia</i> sp.	- ใบ - ตัวอย่างไม้แห้ง	cpDNA markers	Hassold <i>et al.</i> , 2016
ประเทศไทย	<i>Dalbergia cochinchinensis</i>	- เนื้อไม้ - ชี้เลื่อย	SSR markers	สุจิตรา, 2560
	<i>Tectona grandis</i>	- เนื้อไม้	SSR markers	บทที่ 21 ของเอกสารนี้
ประเทศอินโดนีเซีย	<i>Intsia palembanica</i>	- ใบ	SSR markers	Wong <i>et al.</i> , 2009
ประเทศเยอรมัน	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	- เนื้อไม้	SSR markers	Jolivet and Degen, 2012
ประเทศเยอรมันและบางประเทศในลาตินอเมริกา	<i>Swietenia macrophylla</i>	- เนื้อไม้	SSR markers	Degen <i>et al.</i> , 2013

ตารางที่ 1.7 การเปรียบเทียบสถานภาพการศึกษาพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าของแต่ละกลุ่มประเทศในโลก โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม (molecular genetic markers) ดัดแปลงมาจาก สุจิตรา (2543)

กลุ่มประเทศ	ระดับการศึกษาและการประยุกต์ใช้
ยุโรป	ก้าวหน้า
อเมริกา	ก้าวหน้า
ออสเตรเลีย	ก้าวหน้า
ลาตินอเมริกา	เริ่มต้น-กลาง
แอฟริกา	เริ่มต้น-กลาง
ญี่ปุ่น, เกาหลีใต้, จีน, มาเลเซีย	ก้าวหน้า
ไทย, อินเดีย, ไต้หวัน	กลาง
อินโดนีเซีย, ฟิลิปปินส์, เวียดนาม, พม่า	เริ่มต้น-กลาง
ลาว, กัมพูชา	เริ่มต้นโดยความร่วมมือกับประเทศอื่น

1.4 ประโยชน์ของการศึกษาวิจัยพันธุศาสตร์ด้านป่าไม้ระดับโมเลกุล

สุจิตรา (2543) ได้ประมวลผลรายละเอียดพอสังเขปที่เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากการศึกษาวิจัยด้านพันธุศาสตร์ป่าไม้ระดับโมเลกุลในการศึกษาพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของป่าไม้ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular genetic markers) ชนิดต่าง ๆ ได้แบ่งเป็นหัวข้อพอสังเขปดังต่อไปนี้

1.4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity)

เนื่องจากไม้ป่าเป็นพืชที่มีอายุยาวนานกว่าพืชเกษตรทั่วๆไป ดังนั้นไม้ป่าจะต้องมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เพื่อเป็นการประกันความมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีความผันแปรตลอดเวลา (Changtragoon and Szmidt, 1993) ไม่ว่าจะเกิดจากวงจรธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตคือการระบาดของโรค และแมลง หรือเกิดจากอิทธิพลของการพัฒนาเทคโนโลยีของมนุษย์ เช่น การสร้างโรงงานอุตสาหกรรม ทำให้อากาศและน้ำเสียตลอดจนสภาวะเรือนกระจก (Green house effect) และฝนกรด (acid rain) สาเหตุดังกล่าวมีผลต่อความอยู่รอดของไม้ป่า

ดังนั้น หากพื้นฐานทางพันธุกรรมของไม้ป่าที่เราคัดเลือก ไม่ว่าจะด้วยวัตถุประสงค์ใดก็ตาม คือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ก็อาจจะทำให้ไม่สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ผันแปรตลอดเวลา ซึ่งยากต่อการควบคุมและคาดการณ์ล่วงหน้าได้ (สุจิตรา, 2537; Changtragoon and Szmidt, 1997)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular genetic markers) เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ยีน และเครื่องหมายดีเอ็นเอ (isozyme gene markers และ DNA

markers) มาใช้ในการศึกษาในไม้ป่าหลายชนิด เช่น ไม้ตระกูลสน (Changtragoon and Finkeldey, 1995b; Szmidt and Wang, 1991; 1993; Szmidt *et al.*, 1996a) ไม้ป่าชายเลน (สุจิตรา, 2536ข) ไม้สะเดา (สุจิตรา และคณะ, 2536; Changtragoon *et al.*, 1996a) หวาย (Changtragoon *et al.*, 1995) ไม้พะยุง (สุจิตรา และคณะ, 2561; สุจิตรา และคณะ 2562) ไม้ชิงชัน (สุจิตรา และคณะ, 2564; สุจิตรา และกิตติยา 2564) และไม้ป่าอีกหลายชนิด (สุจิตรา, 2537) ซึ่งข้อมูลและผลการศึกษาทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ที่ได้จะสามารถนำไปใช้ประกอบในการพิจารณาวางแผนการอนุรักษ์พันธุกรรม การปรับปรุงและการปลูกสร้างสวนป่าในไม้ป่าได้อย่างมีประสิทธิภาพ (สุจิตรา, 2537; Changtragoon and Szmidt, 1993; 1997; Changtragoon, 2001a; Changtragoon and Finkeldey, 2000) ทั้งนี้ประเทศไทยยังจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยในพันธุ์ไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและนิเวศวิทยาอีกหลายชนิด

1.4.2 การศึกษาระบบการสืบพันธุ์ (Mating system)

- การศึกษาอัตราการผสมตัวเอง (Selfing rate)

เมล็ดไม้ที่ได้จากหมู่ไม้ที่มีการผสมตัวเอง (Selfing) หรือผสมระหว่างต้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (inbreeding) จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ กล้าไม้จะอ่อนไหว (sensitive) ต่อการถูกทำลายจากโรคและแมลงทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดตายต่ำ นอกจากนี้ ต้นที่รอดตายจะมีการเจริญเติบโตไม่ดีเท่าที่ควร ส่งผลให้ผลผลิตและปริมาตรเนื้อไม้ต่ำกว่าปกติดังตัวอย่างที่พบ inbreeding depression ในไม้ *Picea abies* (Langlet, 1940; Eriksson *et al.*, 1973; Hattemer *et al.*, 1993)

โดยทั่วไปการศึกษาระบบการสืบพันธุ์ของพันธุ์ไม้ป่ามักจะใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ (isoenzyme markers) ในการตรวจสอบดูว่าไม้ป่าแต่ละชนิดมีอัตราการผสมตัวเอง (selfing rate) เท่าไร ดังการศึกษาใน Scots pine seed orchard โดย Szmidt (1984) พบว่าอัตราผสมตัวเองมี 10.8% และ 16% ใน *Pinus sylvestris* 16% (Yeh, 1989) ในการศึกษาในไม้สนสองใบ (*Pinus merkusii*) ซึ่งเป็นไม้สนเขตร้อนที่ขึ้นในประเทศไทย พบว่ามีอัตราของการผสมตัวเองสูงถึง 50% (Changtragoon and Finkeldey, 1995a) ส่วนในไม้สักมีอัตราการผสมตัวเองช่วงระหว่าง 2.5-14.1% (Changtragoon and Szmidt, 1999) ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละต้นและหมู่ไม้ที่ขึ้นในแต่ละท้องถิ่น

ข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการนำไปวางแผนการอนุรักษ์พันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่าว่า ควรจะเก็บเมล็ดไม้จากต้นหรือหมู่ไม้ไหนอย่างไร เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ ตลอดจนสามารถนำไปแนะนำเอกชนในการเก็บเมล็ดไม้ที่ถูกต้องเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด inbreeding depression ได้ ซึ่งจะได้นไม้ที่นำไปปลูกสร้างสวนป่าที่มีประมาณเนื้อไม้มีสูง ซึ่งคุ้มค่าต่อการลงทุนและผลกำไรสูง

- การตรวจเช็คความถูกต้องของ controlled crosses

เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ (isoenzyme markers) ได้นำมาใช้ในการตรวจเช็คความผิดพลาดในการทำ controlled crosses ใน Douglas fir ซึ่งพบความผิดพลาดมากกว่า 30% (Haines, 1994) ใน

ไม้กระถินณรงค์ได้มีการตรวจความถูกต้องของ controlled crosses 7 คู่ผสม และพบว่ากล้าไม้ที่ไม่ใช่ลูกผสมที่แท้จริงมีอยู่ถึงมากกว่า 60% จากคู่ผสม 2 คู่ (Changtragoon, 2000)

นอกจากนี้การใช้ RAPD's โดย Roy *et al.* (1992) พบว่าเกิด pollen contamination ในการทำ controlled crosses ของ *Betula alleghaniensis*

-การตรวจเช็คความปนเปื้อนของ pollen (pollen contamination)

ในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่าส่วนหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์คือการทำ seed orchard ซึ่งได้มาจากการคัดเลือกแม่ไม้ที่มีลักษณะตามต้องการ แล้วนำมาปลูกรวมกันเพื่อให้ผลิตเมล็ดไม้จากต้นแม่ไม้ที่ต้องการ การใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ (isoenzyme markers) เข้าช่วยตรวจเช็คทำให้ทราบว่า การทำ seed orchard ของพันธุ์ไม้ที่คัดเลือกมีการปนเปื้อนของ pollen จากที่อื่นหรือไม่ดังในการศึกษาของ Wang *et al.* (1991) ใน Scots pine seed orchard พบว่า มีการปนเปื้อนของ pollen ที่มาจากต้นไม้ที่ไม่ได้คัดเลือกมากกว่า 50% และใน Douglas fir มีสูงถึง 21-89% (Wheeler and Jech, 1992) ข้อมูลเพิ่มเติมสามารถศึกษาได้จาก Finkeldey (1998), Finkeldey and Hattemer (1993) และ Hattemer *et al.* (1993)

1.4.3 การตรวจสอบแหล่งกำเนิดสายพันธุ์และ clone (Species and clone identification)

การมีข้อมูลทางพันธุกรรมที่แน่นอนของพันธุ์ไม้ ไม่ว่าจะเป็นระดับชนิดหรือ clone มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ และอนุรักษ์พันธุ์ไม้แต่ละชนิด Molecular genetic markers ได้ถูกนำไปใช้ในการวินิจฉัย (identify) พันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าทั้งในระดับชนิด และ clone เช่นการใช้ isoenzymes ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของไม้สะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) สะเดาอินเดีย (*A. indica*) และไม้เตย (A. *excelsa*) ทำให้ทราบสถานภาพทางพันธุกรรมของไม้สะเดาไทยที่แตกต่างจากไม้สะเดาอื่น ๆ อย่างเด่นชัด (Changtragoon *et al.*, 1996a)

สำหรับ nuclear RELP's ได้นำมาจำแนกไม้ *Populus tremuloides* และ *P. grandidentata* ออกจากกันได้ สำหรับ chloroplast RELP's ก็นำมาจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมพันธุ์ไม้สนสองใบ (*Pinus merkusii*) และสามใบ (*Pinus Khaya*) โดย Szmidt *et al.* (1996a)

ในระดับ clone นั้น Molecular genetic markers ที่นำมาวินิจฉัย fingerprinting มีทั้ง isoenzyme markers ในไม้สะเดาไทย (สุจิตรา และคณะ, 2536) ไม้กระถินณรงค์ (*Acacia auriculiformis*) และไม้สัก (*Tectona grandis*) (Changtragoon, 1996) ซึ่งพบว่ามี การเขียนเบอร์ clone ผิด และมีความผิดพลาดในแปลงกรรมพันธุ์ (clone bank)

ส่วน RAPD markers ได้มีการใช้จำแนกหวาย 9 ชนิดออกจากกันได้ (Changtragoon *et al.*, 1996b) และมีการจำแนกต้นที่ได้มาจาก full sited family ในไม้ *Picea glauca* (Hong *et al.*, 1992)

อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดไม้หลายชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดและโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอในไม้สกุล *Dalbergia* spp. การพิสูจน์ลูกผสมในไม้โกงกางลูกผสมได้กล่าวโดยละเอียดในบทถัดๆ ไป

1.4.4 เครื่องหมายที่ช่วยในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ (Marker assisted selection)

การคัดเลือกลักษณะที่ต้องการของพันธุ์ไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมวิธีหนึ่งที่ช่วยได้คือการใช้ Molecular genetic markers ที่สัมพันธ์ (link) กับลักษณะที่ต้องการซึ่งเรียกว่า Quantitative Trait Loci (QTLs) โดยการทำการ mapping ด้วย isoenzymes ในไม้ *Picea glauca*, *Picea nigra*, *Pinus rigida* และ *Pinus albicaulis* (Weeden, 1989) สำหรับ RAPD's ได้มีการทำในไม้ตระกูลสน เช่นในไม้ *Picea glauca* (Tulsieram *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังมีการหาความสัมพันธ์ (link) RAPD's markers กับยีนที่ควบคุม ความหนาของเปลือกในไม้ *Pinus elliotti* และ *Pinus caribaea* (Dale *et al.*, 1993) ส่วน RFLP's map ได้มีการทำในไม้ *Eucalyptus nitens* (Byrne *et al.*, 1992) และในไม้ *Pinus taeda* (Neale *et al.*, 1989)

1.5 สรุป วิจัย และข้อเสนอแนะ

จะเห็นได้ว่าการศึกษพันธุศาสตร์ป่าไม้ ในการศึกษาพันธุ์กรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ป่าโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม (Molecular genetic markers) ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้านเช่น การปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่า การอนุรักษ์พันธุ์กรรมไม้ป่า การปลูกสร้างสวนป่าให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Bergman and Hattemer, 1998; Szmidt and Wang, 1991; Williams and Neale, 1992; Finkeldey and Hattemer, 1993; Changtragoon and Szmidt, 1997; Haines, 1994) โดยที่ Isoenzyme และ DNA fingerprinting ได้ถูกนำมาวินิจฉัยลักษณะพันธุกรรมของแม่ไม้ที่มีลักษณะดี plus trees และพิสูจน์ลูกผสมจากการผสมข้าม (Changtragoon, 1996; 2000; Changtragoon *et al.*, 1998) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและระบบการสืบพันธุ์ได้มีการนำเอา isoenzyme, RAPD's RFLP's และ microsatellites มาใช้ศึกษาเพื่อใช้คัดเลือกและประเมินว่าแหล่งไม้แหล่งใดของแต่ละชนิดเหมาะสมต่อการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์กรรมไม้ป่าชนิดนั้น ๆ ข้อมูลดังกล่าวที่ได้สามารถนำมาหาจำแนกแหล่งพันธุกรรมของเมล็ดไม้และสามารถนำมาพิจารณาคัดเลือกว่า เมล็ดและท่อนพันธุ์แหล่งใดเหมาะสมต่อการนำมาปลูกสร้างสวนป่าเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งรายละเอียดในการทำวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมพันธุ์ไม้ป่าและพืชป่าบางชนิดเพื่อเป็นข้อมูลพิจารณาแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์ป่า และปลูกป่า จะกล่าวถึงรายละเอียดในบทถัดๆ ไป

นอกจากนี้การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล (markers) ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ไม้ป่า เช่น ความหนาแน่นของเนื้อไม้ ความยาวของ fiber ปริมาณ lignin ในเนื้อไม้ โดยการใช้ markers เช่น isoenzyme, RAPD's RFLP's และ microsatellites มาช่วยในการคัดเลือกและหาความสัมพันธ์กับลักษณะที่ต้องการ (QTL's trait loci) โดยการทำการ Mapping ซึ่งสามารถนำมาช่วยการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกลักษณะของพันธุ์ไม้ที่ต้องการได้ และย่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมได้มาก นอกจากนี้การศึกษา somaclonal variation ในพันธุ์ไม้ที่ถูกขยายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้ มีการใช้ RAPD และ RFLP's markers มาใช้ในการตรวจสอบ

อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยและการประยุกต์ใช้ดังกล่าวข้างต้นมีอย่างกว้างขวางในประเทศที่พัฒนาแล้ว ส่วนประเทศที่กำลังพัฒนาโดยเฉพาะประเทศไทยถืออยู่ในระดับกลาง เมื่อเทียบกับประเทศเพื่อนบ้าน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางด้านงบประมาณและผู้เชี่ยวชาญในการศึกษาวิจัย ซึ่งรัฐบาลควรจะทำให้ความสำคัญและให้การสนับสนุนการวิจัยด้านนี้อย่างต่อเนื่อง เพราะสามารถที่จะนำมาช่วยในการจัดการทรัพยากรด้านพันธุกรรมป่าไม้ให้อยู่อย่างยั่งยืนและมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจที่จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอนาคตทั้งทางด้านอาหาร ยา วัสดุ โรค เครื่องนุ่งห่ม ที่อยู่อาศัย และอื่น ๆ ซึ่งยังสามารถเอื้อประโยชน์ได้ในอนาคต ซึ่งเรายังอาจมองไม่เห็นและคิดไม่ถึงอีกมาก ตลอดจนช่วยส่งเสริมให้สิ่งแวดล้อมที่ดี โดยช่วยให้มีอากาศบริสุทธิ์ ฝนตกตามฤดูกาลและแหล่งน้ำให้ยั่งยืนตลอดไป

การพัฒนาการศึกษาวิจัยดังกล่าวข้างต้นยังสามารถช่วยรับรองและคุ้มครองไม้ป่าที่ได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ที่ดี หรือไม้ป่าพันธุ์ใหม่ในการจดสิทธิบัตร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่าและประเทศไทยในอนาคตได้อีกด้วย

นอกจากนี้หากเรามีฐานข้อมูลทางพันธุกรรมไม้ป่าที่มีค่าทางเศรษฐกิจก็ย่อมสามารถป้องกันและติดตามการลักลอบทรัพยากรทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ที่มีคุณค่าไม่ให้ออกไปนอกประเทศได้ (สุจิตรา, 2543)

บทที่ 2

การอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมป่าไม้

หลักการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมป่าไม้

ตั้งแต่ช่วงต้นคริสต์ศตวรรษ 1970 ได้มีความกังวลและห่วงใยของทั่วโลกอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับอัตราการบุกรุกทำลายป่าของป่าเขตร้อน ซึ่งกิจกรรมดังกล่าวได้เกิดขึ้นมาเป็นเวลายาวนาน มีการเพิ่มอัตราการบุกรุกทำลายป่าตั้งแต่ต้นคริสต์ศตวรรษที่ 1960 เนื่องจากผลของการค้าขาย การปรับปรุงการคมนาคม เศรษฐกิจและการเพิ่มของจำนวนประชากร (International Tropical Timber Organization, 2005) เนื่องจากการ บุกรุกทำลายป่าในประเทศกำลังพัฒนามีอัตราที่สูง จึงทำให้ได้มีการจัดทำโครงการปลูกป่าและการอนุรักษ์ป่าไม้

อย่างไรก็ตามประเทศกำลังพัฒนาส่วนใหญ่รวมถึงประเทศไทยมักใช้การบริหารจัดการการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่าโดยวิธีการดั้งเดิม (Conventional means) เช่น การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials) และการทดสอบหมู่ไม้ (Progeny tests) ซึ่งต้องใช้ระยะเวลายาวนาน

นอกจากนี้บางโครงการการอนุรักษ์พันธุกรรมและการปลูกป่าได้มีการดำเนินการโดยขาดความรู้ความเข้าใจของข้อมูลทางพันธุกรรมแต่ละหมู่ไม้ เช่น ความหลากหลายทางพันธุกรรม ความผันแปรทางพันธุกรรม ระบบการสืบพันธุ์ ซึ่งในระยะยาวอาจมีผลต่อความอยู่รอด การเจริญเติบโตและผลผลิตได้ (Changtragoon, 1998) ข้อมูลพื้นฐานหนึ่งที่ต้องการสำหรับการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ของทรัพยากรพันธุกรรมของไม้ป่า คือ ความเข้าใจพลวัตทางชีววิทยาของความผันแปรทางพันธุกรรมที่มีอยู่ภายในและระหว่างแหล่งของชนิดพันธุ์ไม้ ซึ่ง Changtragoon and Szmidt (1993) ได้เสนอแนะว่าการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและระบบสืบพันธุ์ของพันธุ์ไม้แต่ละชนิด ควรที่จะดำเนินการโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) ให้มากที่สุดเท่าที่จะสามารถทำได้

ดังนั้นการอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุกรรมของชนิดพันธุ์หนึ่งๆ นั้นจะต้องเริ่มต้นจากการมีวัตถุประสงค์ของการอนุรักษ์ที่ชัดเจน กล่าวคือ

1. ทรัพยากรทางพันธุกรรมที่ถูกคัดเลือกเพื่อการอนุรักษ์ควรจะ ต้องมีข้อมูลพื้นฐานด้านพันธุกรรมเพื่อเป็นแนวทางในตัดสินใจและวางแผนการอนุรักษ์
2. การอนุรักษ์พันธุกรรมควรมีการดูแลให้มีการสืบต่อพันธุ์ตามธรรมชาติของทรัพยากรพันธุกรรมของชนิดพันธุ์ที่คัดเลือกให้ได้อย่างยั่งยืน (Hattemer, 1995; Finkeldey and Hattemer, 1993)

Finkeldey (1998) ได้ชี้ให้เห็นว่าการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายยีน (Gene markers) เป็นวิธีการที่ดีที่สุดสำหรับการคัดเลือกทรัพยากรทางพันธุกรรมที่เหมาะสม เพราะสามารถทราบถึงศูนย์กลางของความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง (ประชากร) ซึ่งสามารถวินิจฉัยและจำแนกให้ทราบได้

อย่างไรก็ตามก็ยังสามารถที่จะทำให้ทราบได้ว่าแหล่ง (ประชากร) ใดที่มียีนที่หายากหรือยีนที่จำเพาะเฉพาะแหล่งที่มีความถี่ของยีนสูง ซึ่ง Brown (1978) กล่าวว่าการที่ยีนที่จำเพาะของแหล่ง (ประชากร)

หนึ่งๆที่มีความถี่ของยีนสูงถือว่าเป็นแหล่งทรัพยากรทางพันธุกรรมที่มีคุณค่า จะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์ข้อมูลหลายด้านมาประกอบการพิจารณาคัดเลือกแหล่งที่เหมาะสมต่อการอนุรักษ์ จึงมีความสำคัญ

ดังนั้นหลังจากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของแต่ละแหล่ง (ประชากร) และพบว่าความผันแปรทางพันธุกรรมภายในและระหว่างแหล่งของแต่ละชนิดพันธุ์ที่ศึกษาใดมีความผันแปรทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีอัตราการผสมข้ามสูง (สำหรับชนิดพันธุ์ที่เป็นแบบผสมข้าม: Outcross species) ก็ควรจะถูกคัดเลือกให้เป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมของชนิดพันธุ์ที่ศึกษานั้นๆ

เนื่องจากไม้ปามีอายุยืนยาวกว่าพืชล้มลุกหรือพืชเกษตรอายุสั้น ดังนั้นระดับของความหลากหลายทางพันธุกรรมและอัตราการผสมข้ามที่สูงจะสามารถช่วยเพิ่มโอกาสความอยู่รอด อายุที่ยืนยาว ความต้านต่อโรค และแมลงทั้งในปัจจุบันและในอนาคตของรุ่นต่อไปให้สูงขึ้นได้ (Changtragoon and Szmidt, 1997)

อย่างไรก็ตามการใช้ข้อมูลการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมจากเครื่องหมายโมเลกุลมาประกอบข้อมูลศึกษาการปรับตัวและข้อมูลทางระบบนิเวศ ก็จะยอมทำให้โครงการอนุรักษ์ชนิดพันธุ์ไม้ป่าแต่ละชนิดที่อยู่ในแต่ละสังคมป่ามีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Changtragoon, 2005)

ประเภทของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์ป่าไม้

Szmidt (1995) ชี้ให้เห็นว่ากระบวนการทำงานทางด้านชีววิทยาของพืชนั้นขึ้นอยู่กับการทำงานร่วมกันระหว่าง 3 แหล่งพันธุกรรม (Genomes) กล่าวคือในนิวเคลียส (Nuclear) คลอโรพลาสต์ (Chloroplast) และไมโทคอนเดรียล (Mitochondrial) ซึ่งทั้งแหล่งพันธุกรรมทั้งหมดนี้มีเยื่อเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีความสำคัญต่อการมีชีวิตอยู่รอดได้ ซึ่งทำให้เกิดการเจริญเติบโต สังเคราะห์แสง หายใจ และกระบวนการทางชีววิทยาอื่นๆ ดังนั้นการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรม ควรที่จะคำนึงถึงทั้ง 3 องค์ประกอบของแหล่งพันธุกรรมของระบบพันธุกรรมของพืช

นอกจากนี้แต่ละองค์ประกอบยังมีโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) ยีน รหัสพันธุกรรมที่ไม่ใช่ยีนและมีระบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลทำให้ความแตกต่างระหว่างแต่ละแหล่ง(ประชากร) แตกต่างกันระหว่างการศึกษาแหล่งพันธุกรรมในนิวเคลียสที่มีระบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านทางทั้งพ่อและแม่กับในคลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียลที่มีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมผ่านทางพ่อหรือแม่อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลและการกระจายตัวในแหล่งพันธุกรรม และแนวโน้มที่จะเกี่ยวข้องกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัว (Potential adaptive significance) จึงควรนำมาพิจารณาเลือกใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Karp *et al.*, 1996; Krutovskii and Neale, 2001; Szmidt and Wang, 2000; Szmidt, 1995) ได้แนะนำว่าก่อนที่จะใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษานั้นจะต้องมีคำถามที่ชัดเจนว่าต้องการข้อมูลอะไรควรจะเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดใด ควรมีหลักการในการสุ่มตัวอย่างและมีข้อมูลที่จะวิเคราะห์ที่เพียงพอในการตอบคำถามดังกล่าว ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลได้ถูกพัฒนาขึ้นมา เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งในพืชและไม้ป่าในหลายสิบปีที่ผ่านมา เช่นเครื่องหมายไอโซเอนไซม์ยีน (Isoenzyme gene markers) เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) หลายชนิด เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) SSR (Simple Sequence Repeat) นอกจากนี้

ยังมี EST (Expressed Sequence Tag) และรหัสพันธุกรรม (DNA sequences) เป็นต้น ซึ่งรายละเอียดของเครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรมดังกล่าว และการใช้ประโยชน์สามารถศึกษาได้จาก Amaral (2001), Harry *et al.*, (1998), FAO (2001), Karp *et al.* (1997), Kristensen *et al.* (2001), Krutovskii and Neale (2001), Ratnam (2001), Szmidt (1995) Szmidt and Wang (2000) และ Wang and Szmidt (2001), ส่วนวิธีการศึกษาในเครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรมบางชนิด เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellites) ได้สอดแทรกอยู่ในการศึกษาวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ป่าและพืชป่าในบทต่อไป

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไม้ป่า

ในการศึกษาวิจัยโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการสำรวจทรัพยากรพันธุกรรมที่ตำแหน่งจำเพาะของยีน สามารถที่จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนและการกระจายของความผันแปรทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างประชากร นอกจากนี้การวิเคราะห์ข้อมูลเครื่องหมายของยีนสามารถที่จะทำให้ทราบถึงค่าการประเมินอัตราการผสมข้าม ซึ่งสามารถที่จะสำรวจการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมที่เกิดจากปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อระบบการสืบพันธุ์ที่ศึกษาได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล จึงมีคุณค่าต่อการวินิจฉัยแหล่ง(ประชากร) ของชนิดพันธุ์ที่ศึกษา ซึ่งเหมาะสมต่อการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์เพื่อใช้ประโยชน์ได้ (Changtragoon and Szmidt, 1997) ดังนั้นจะพบว่า เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) มีประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์ป่าไม้หลายด้าน

นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นการสืบหาประวัติความเป็นมาและความสัมพันธ์ทางภูมิศาสตร์ระหว่างกลุ่มของชนิดพันธุ์ (Hedrick, 2001) การใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรมทำให้การศึกษาระบบการสืบพันธุ์ได้ง่ายขึ้นไม่ว่าจะศึกษาการเคลื่อนย้ายของยีนและการกระจายของเมล็ดพันธุ์ ผลจากการศึกษาดังกล่าวทำให้มีประโยชน์ต่อการใช้ข้อมูลในการดำเนินการโดยการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ เช่น ทำให้ทราบว่าควรจะคุ้มครองอย่างไรที่เป็นตัวแทนของแหล่ง (ประชากร) การวางแผนสวนผลิตเมล็ดพันธุ์และการจัดการที่เหมาะสมการจัดทำแปลงขยายพันธุ์ไม้ป่า เพื่อการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ที่ถูกต้องและเหมาะสม (Haines, 1994) นอกจากนี้การใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาจจะสามารถนำมาใช้วัดค่าที่ต้องการที่เหมาะสมต่อการจัดการการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิดและนอกถิ่นกำเนิดของไม้ป่าที่มีประสิทธิภาพได้ เช่น การมีลักษณะเฉพาะ (Identity) ความเหมือนกัน (Similarity) โครงสร้างทางพันธุกรรมและข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของแต่ละต้น สายพันธุ์ แหล่ง (ประชากร) และชนิดพันธุ์ (Karp *et al.*, 1996) ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถนำมาดำเนินการโดยสรุปดังนี้

1. เพื่อจำแนก วินิจฉัยชนิดพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของชนิดพันธุ์และการสืบหาความเป็นมาของการวิวัฒนาการของกลุ่มของชนิดพันธุ์ที่ศึกษา
2. เพื่อวินิจฉัย Clones และ Ramets ใน Gene bank เพื่อป้องกันและตรวจสอบการเขียนชื่อ Clones ผิด การซ้ำซ้อนและกำจัดการปนเปื้อนของพันธุกรรมที่ไม่พึงประสงค์
3. เพื่อประเมินขนาดและการกระจายตัวของความผันแปรทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างแหล่ง (ประชากร)

4. เพื่อประเมินระบบการสืบพันธุ์ (อัตราการผสมตัวเองและผสมข้าม) และการถ่ายเทของยีน
5. เพื่อประเมินสถานภาพทรัพยากรพันธุกรรมป่าไม้ เพื่อเป็นแนวทางพิจารณาการอนุรักษ์ในถิ่นและนอกถิ่นกำเนิด โดยอาศัยข้อมูลดังกล่าวข้างต้น
6. เพื่อให้การบริหารจัดการอนุรักษ์ป่าไม้อย่างมีประสิทธิภาพเต็มที่ควรประมวลผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลร่วมกับ การศึกษาลักษณะการปรับตัวและนิเวศภูมิศาสตร์ (Changtragoon, 2003a)

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมของไม้ป่าในประเทศไทย

ควรจะดำเนินการ 2 ขั้นตอน กล่าวคือ

1. ควรใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการประเมินสถานภาพของข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของป่าที่เคยปลูกเพื่อจัดทำกรอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด และแหล่งที่ใช้ในการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิด ซึ่งเคยจัดทำและดำเนินการโดยใช้วิธีวนวัฒนวิจัยดั้งเดิมในไม้ป่าชนิดต่างๆ เพราะการศึกษาดังกล่าวสามารถใช้ในการตรวจสอบว่าป่าอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดที่ปลูกมาจากต้นพันธุ์ (Clones and ramets) ว่าถูกต้องหรือไม่และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเพียงพอต่อการที่เป็นตัวแทนของแหล่งทางพันธุกรรมชนิดพันธุ์นั้นๆ เพื่อการอนุรักษ์หรือไม่ ถ้าไม่เพียงพอก็ต้องมีการสำรวจศึกษาเพิ่มเติม โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลศึกษาและคัดเลือกเพื่อให้ได้ตัวแทนที่เหมาะสม
2. สามารถใช้ในการประยุกต์ในการประเมินสถานภาพทรัพยากรทางพันธุกรรมของชนิดพันธุ์ที่แปลงอนุรักษ์พันธุกรรมยังไม่ได้จัดตั้งและดำเนินการมาก่อน ซึ่งสามารถดำเนินการโดยศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมภายในและความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง (ประชากร) ระบบการสืบพันธุ์และถ่ายเทของยีนโดยการศึกษา ที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าว สามารถใช้เป็นแนวทางได้ว่าควรจะเก็บตัวอย่างอย่างไรและที่ไหน เพื่อใช้สำหรับการจัดตั้งแปลงอนุรักษ์พันธุกรรมนอกถิ่นกำเนิดและสามารถวินิจฉัยได้ว่าแหล่งหรือประชากรใดเหมาะที่จะจัดทำเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมในถิ่นกำเนิด อย่างไรก็ตามในการที่จะให้ได้ผลเต็มที่ควรจะต้องมีการประมวลผลร่วมกับข้อมูลลักษณะการปรับตัวและการสำรวจนิเวศภูมิศาสตร์ด้วย (Changtragoon, 2005)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Diversity)

ในประเทศไทยมีการอนุรักษ์พันธุกรรมในไม้ป่าหลายชนิด ซึ่งได้มีการจัดตั้งแปลงธนาคารยีน (Gene bank) การอนุรักษ์พันธุกรรมนอกถิ่นกำเนิด (*Ex situ* gene conservation) และการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิด (*In situ* gene conservation) ซึ่งมักจะดำเนินการโดยใช้วนวัฒนวิธีดั้งเดิม เช่น การคัดเลือกแม่ไม้ การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trails) หลังจากนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาพันธุ์ไม้ป่าหลายชนิด เช่น ไม้สัก (*Tectona grandis*) (Changtragoon and Szmidt, 2000) ไม้สน (*Pinus* spp.) (Changtragoon and Finkeldey, 1995a) ไม้ยางนา (*Dipterocarp alatus*) (สุจิตรา และ บุญชู, 2542; Changtragoon, 2001b) ไม้โกงกาง เช่น ไม้โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) ไม้โกงกางใบใหญ่ (สุจิตรา, 2550) ไม้พะยูน (สุจิตรา และ คณะ, 2561; สุจิตรา และคณะ 2562) ไม้ชิงชัน (สุจิตรา และคณะ, 2564; สุจิตรา และกิตติยา 2564) เป็นต้น

ดังสรุปในตารางที่ 2.1 ส่วนการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ไม้ในไม้ป่าและพืชป่าบางชนิดในประเทศไทย ได้สรุปในตารางที่ 2.2 ซึ่งรายละเอียดในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการประเมินสถานภาพทรัพยากรพันธุกรรมไม้ป่าหลายชนิดตลอดจนแนวทางการคัดเลือกแหล่งพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์ จะกล่าวบทถัดๆ ไป

การศึกษาระบบการสืบพันธุ์ (Mating system)

ระบบการสืบพันธุ์สามารถศึกษาได้โดยการประเมินอัตราการผสมข้าม สัมประสิทธิ์การผสมพันธุ์ในหมู่เครือญาติ และการถ่ายเทของยีนโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีลักษณะซิมคูกัน (Codominant markers) เช่น เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ยีน (Isoenzyme gene markers) และเครื่องหมายไมโครแซเทลไลท์ (Microsatellite markers) ตารางที่ 2.3 ได้แสดงให้เห็นถึง การประเมินอัตราการผสมข้ามในป่าเขตร้อนเปรียบเทียบกับไม้ป่าในประเทศไทยที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดพันธุ์ อย่างไรก็ตามแม้ภายในชนิดเดียวกันก็พบว่ามี ความแตกต่างกันในระหว่างแหล่ง (ประชากร) และระหว่างต้นดังแสดงใน ตารางที่ 2.4 และตารางที่ 2.5 ซึ่งข้อมูลในการศึกษาดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ เพื่อใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่า การฟื้นฟูป่า และปลูกป่า ภาพที่ 2.1 ได้แสดงให้เห็นถึงลักษณะด้อยอันผลมาจากการผสมตัวเองในหมู่เครือญาติในการผสมตัวเองในไม้ *Picea abies* ที่มีอายุ 61 ปี (Eriksson *et al.*, 1973; Hattemer *et al.*, 1993)

ดังนั้นในการหลีกเลี่ยงลักษณะด้อยที่เกิดจากการผสมพันธุ์กันในหมู่เครือญาตินั้น จึงควรคัดเลือกวัสดุพันธุ์ และเมล็ดพันธุ์ก่อนการปลูกป่า โดยการวินิจฉัยว่าต้นใดและแหล่ง (ประชากร) ใดที่มีอัตราผสมข้ามค่อนข้างสูง เพื่อที่จะทำให้มีความสามารถในการรอดตายเติบโตดีและต้านทานต่อโรคและแมลง รวมถึงการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีทางคาดการณ์ได้ในอนาคต

ซึ่งรายละเอียดในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ป่าและพืชป่าที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและระบบนิเวศน์ของประเทศไทย โดยเป็นตัวแทนของระบบนิเวศและชนิดป่าที่หลากหลายนี้จะกล่าวพอสังเขปในบทถัดๆ ไป

ตารางที่ 2.1 การอนุรักษ์พันธุ์กรรมและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไม้ป่าในประเทศไทย

ชนิด (Species)	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic variation study)		การอนุรักษ์ ยีน (Gene conservation)	
	(Conventional practices)	พันธุศาสตร์ประชากรโมเลกุล (Molecular population genetics)	ในถิ่นกำเนิด (In situ)	นอกถิ่นกำเนิด (Ex situ)
<i>Acacia auriculiformis</i> *	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation)		
<i>Acacia mangium</i> *	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)			
<i>Azela xylocarpa</i>				x
<i>Alstonia scholaris</i>	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)			
<i>Azadirachta indica</i> var. <i>siamensis</i>	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation)		x
<i>Azadirachta excelsa</i>		ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation)		x
<i>Chukrasia velutina/tabularis</i>	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation)		
<i>Cotylelobium melanoxylon</i>		ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation)	x	
<i>Dalbergia cochinchinensis</i>		ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation) / ความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอ (DNA variation)		x
<i>Dalbergia oliveri</i>		ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation) / ความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอ (DNA variation)		x
<i>Dipterocarpus alatus</i>	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation)	x	x
<i>Dipterocarpus tuberculatus</i>			x	
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> *	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)			x
<i>Hopea odorata</i>			x	
<i>Mangifera caloneura</i>				x
<i>Pinus caribaea</i> *	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)			x
<i>Pinus khasya (kesiya)</i>	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation)	x	x

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Species	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic variation study)		การอนุรักษ์ ยีน (Gene conservation)	
	Conventional practices	พันธุศาสตร์ประชากรโมเลกุล (Molecular population genetics)	ในถิ่นกำเนิด (<i>In situ</i>)	นอกถิ่นกำเนิด(<i>Ex situ</i>)
<i>Pinus merkusii</i>	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation)	×	×
<i>Pinus tecunumanii</i> *	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)			×
<i>Pinus oocarpa</i> *	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)			×
<i>Pterocarpus macrocarpus</i>	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation)		×
<i>Rhizophora apiculata</i>		ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation) / ความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอ(DNA variation)		
<i>Rhizophora muconata</i>		ความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอ (DNA variation)		
<i>Shorea henryana</i>				×
<i>Shorea roxburghii</i>				×
<i>Shorea obtusa</i>		ความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอ (DNA variation)		
<i>Tectona grandis</i>	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme variation) / ความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอ (DNA variation)	×	×
<i>Toona ciliata</i>	การทดสอบถิ่นกำเนิด (Provenance trials)			
<i>Xylocarpa (kerrii)</i>		ความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอ (DNA variation)		×

* ไม้ต่างถิ่น (Exotic Species)

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งประชากรของพันธุ์ไม้ป่าและพืชป่าบางชนิดในประเทศไทย

ชนิด (Species)	ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง (Genetic differentiation among populations)	เอกสารอ้างอิง
<i>Pinus khasya</i>	0.023 (2.3%)	Szmidt <i>et al.</i> , 1996a
<i>Pinus merkusii</i>	0.104(10.4%)	Changtragoon and Finkeldey, 1995a; 1995b Changtragoon and Finkeldey, 2000
<i>Tectona grandis</i>	0.234(23%)	Changtragoon and Szmidt, 1999, 2000
<i>Mitragyna brunonis</i>	0.110(11.0%)	Changtragoon and Finkeldey, 2000
<i>Dipterocarpus alatus</i>	0.182(18.2%)	สุจิตรา และบุญชูบ, 2542
	0.128(13%)	Changtragoon, 2001b
<i>Calamus pulustris</i>	0.259(25.9%)	Changtragoon <i>et al.</i> , 2001
<i>Cycas siamensis</i>	0.078(7.8%)	Changtragoon and Finkeldey, 2000
<i>Paphiopedilum exul</i>	0.082(8%)	จักรพันธ์ และ สุจิตรา, 2548
<i>Bambusa bambos</i>	0.243(24%)	รังสัน และ สุจิตรา, 2548
<i>Rhizophora apiculata</i>	0.250(25%)	สุจิตรา, 2550
<i>Rhizophora mucronata</i>	0.210(21%)	สุจิตรา, 2550
<i>Dalbergia cochinchinensis</i>	0.13(13%)	สุจิตราและคณะ, 2561
<i>Dalbergia oliveri</i>	0.18(18%)	สุจิตราและคณะ, 2564

ตารางที่ 2.3 การประเมินอัตราการผสมข้าม (t_m) โดยใช้ไอโซเอนไซม์ยีนและ mixed mating model

ชนิด (Species)	อัตราการผสมข้าม (t_m)	เอกสารอ้างอิง
<i>Shorea megistophylla</i>	0.71 - 0.87	Murawski <i>et al.</i> , 1994
<i>Stemonoporus oblongifolius</i>	0.84	Murawski and Bawa, 1994
<i>Shorea congestiflora</i>	0.874	Murawski <i>et al.</i> , 1994
<i>Shorea trapezifolia</i>	0.519 - 0.602	Murawski <i>et al.</i> , 1994
<i>Pterocarpus indicus</i>	0.908	Finkeldey <i>et al.</i> , 1998; 1999
<i>Pinus merkusii</i>	0.017 - 0.843	Changtragoon and Finkeldey, 1995a
<i>Tectona grandis</i>	0.95	Kjaer and Suangtho, 1995
<i>Tectona grandis</i>	0.83	Kertardikara and Prat, 1995
<i>Tectona grandis</i>	0.872 - 0.995	Changtragoon and Szmidt, 1999
<i>Pterocarpus macrocarpus</i>	0.719 - 0.959	Liengsiri <i>et al.</i> , 1995
<i>Calamus palustris</i>	0.862 - 0.980	สุจิตรา (ข้อมูลที่ยังไม่เผยแพร่)
<i>Rhizophora apiculata</i>	0.2 - 0.97	สุจิตรา, 2550

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Finkeldey, 1998 และ สุจิตรา, 2543

ตารางที่ 2.4 การประเมินค่าของอัตราการผสมข้ามของประชากรไม้โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) ในประเทศไทย

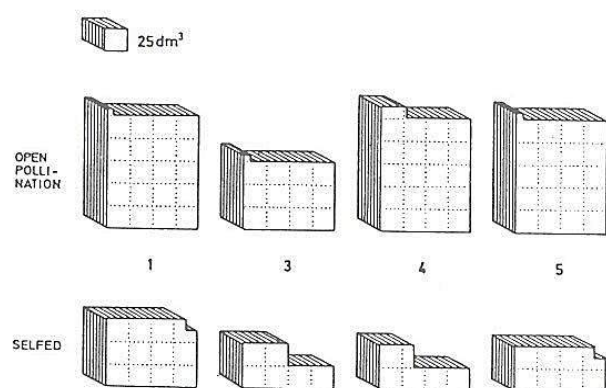
ชื่อประชากร (Population names)	จังหวัด (Provinces)	Multilocus t estimate	Single locus t estimate	Difference $t_m - t_s$
อ. ก้นต้ง	ตรัง	0.978 ± 0.189	0.994 ± 0.197	-0.016 ± 0.076
อ. ชลุง	จันทบุรี	1.00 ± 0.109	0.998 ± 0.024	0.002 ± 0.092
บางขุนเทียน	กรุงเทพ	0.241 ± 0.091	0.214 ± 0.091	0.000

ที่มา: สุจิตรา, 2550

ตารางที่ 2.5 การประเมินค่าของอัตราการผสมข้ามระหว่างต้นของประชากรไม้โกงกางใบเล็ก อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง ประเทศไทย

หมายเลขของต้น	อัตราการผสมข้าม (Outcrossing rate) Multilocus estimate
02	0.75 ± 0.11
03	0.27 ± 0.09
04	1.00 ± 0.00
06	0.51 ± 0.14
12	0.26 ± 0.13
15	1.00 ± 0.00
16	1.00 ± 0.00

ที่มา: สุจิตรา, 2550



ภาพที่ 2.1 การเกิด Inbreeding depression ของปริมาตรเนื้อไม้ *Picea abies* อายุ 61 ปี อันเนื่องมาจากการผสมตัวเองซึ่งจะเห็นว่าปริมาตรเนื้อไม้น้อยกว่าต้นที่เกิดจาก Open pollination อย่างเด่นชัด (ที่มา Eriksson *et al.*, 1973; Hattemer *et al.*, 1993)

บทที่ 3

วิธีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellites markers)

ในไม้ป่าพร้อมกรณีศึกษา

คำนำ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการพิสูจน์สายสัมพันธ์เอ็นเอของต้นไม้จะต้องใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงซึ่งอยู่ในนิวเคลียส โดยปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้คือไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellites markers) ซึ่งในบางกรณีไม้บางชนิดที่มีเอกสารทางวิชาการว่าได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้แล้วก็สามารถที่จะนำเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นๆ มาใช้ได้ถ้าเป็นชนิดเดียวกันหรือเป็นสกุลเดียวกันโดยจะต้องนำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการ หากในบางกรณีไม้บางชนิดไม่มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้มาก่อน จึงต้องมีการพัฒนาขึ้นขึ้นมาในห้องปฏิบัติการนั้นๆ ในกรณีนี้จึงขอเสนอวิธีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ตามวิธีการของ Pandey (2005) ที่ได้ประมวลข้อมูลและใช้เป็นแนวทางในการดำเนินการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชในไม้ป่าหลายชนิดดังนี้

Microsatellites หรือ Simple Sequence Repeats (SSRs)

Pandey (2005) กล่าวว่าไมโครแซทเทลไลต์เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ ที่ละ 1-6 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเรียงต่อกันในทิศทางเดียวกันตลอด (Hancock, 1999) เรียกอีกอย่างว่า Short Tandem Repeats (STR) หรือ Simple Sequence Repeats (SSRs) ไมโครแซทเทลไลต์แบ่งออกเป็น mononucleotide (รูปแบบที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำตัวเดียว), dinucleotide (รูปแบบที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำ 2 ตัว), trinucleotide (รูปแบบที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำ 3 ตัว) และอื่น ๆ ขึ้นอยู่กับจำนวนของนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์แบ่งออกเป็นสองประเภท คือ 1. แบบต่อเนื่อง (ไมโครแซทเทลไลต์บริสุทธิ์) 2. แบบไม่ต่อเนื่อง (ไมโครแซทเทลไลต์ไม่บริสุทธิ์) แต่ผสมกับนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ภายในชุดซ้ำไมโครแซทเทลไลต์ส่วนใหญ่พบในบริเวณ non-coding regions (เช่น introns) ของจีโนมและพบได้น้อยมากในบริเวณ coding regions (exons) ของจีโนม (Hancock, 1995) ไมโครแซทเทลไลต์ที่มีความหลากหลายสูงและถูกนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุดคือ ไมโครแซทเทลไลต์แบบต่อเนื่อง (Weber, 1990) ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดจนถึงขณะนี้มีการตรวจพบไมโครแซทเทลไลต์ที่มีความถี่สูงกว่าที่คาดไว้ (Hancock, 1999) ไมโครแซทเทลไลต์ดูเหมือนจะกระจายอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งจีโนม Edwards *et al.* (1991) ได้ตรวจสอบตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ในจีโนมของมนุษย์ พวกเขาสังเกตว่าอย่างน้อยใน 1 ชุดซ้ำของ SSR จะมีขนาดความยาวอยู่ที่ 300 - 500 กิโลเบส สาเหตุของความแปรปรวนสูงของไมโครแซทเทลไลต์คืออัตราการกลายพันธุ์ที่สูง อัตราการกลายพันธุ์ในไมโครแซทเทลไลต์จะสูงกว่าเมื่อเทียบกับอัตราการกลายพันธุ์โดยทั่วไปซึ่งอยู่ในระดับ 10^{-9} - 10^{-10} (Hancock, 1999) Levinson and Gutman (1987) พบว่าจะอยู่ที่ประมาณ 10^{-2} ต่อการจำลอง DNA ใน *E. coli* และ Weber and Wong (1993) พบว่าอยู่ที่ประมาณ 10^{-3}

ต่อตำแหน่งและในแต่ละชั่วรุ่นของมนุษย์ ในแมลงหวี่พบอัตราการกลายพันธุ์ที่ค่อนข้างต่ำก็คือประมาณ 6×10^{-6} (Schug *et al.*, 1997) โดยทั่วไปอัตราการกลายพันธุ์ของลำดับไมโครแซทเทลไลต์คือประมาณ 10^{-3} - 10^{-5} ต่อตำแหน่งและต่อรุ่น (Edwards *et al.* 1992; Schlötterer and Tautz, 1992; Bowcock *et al.*, 1994; Forbes *et al.*, 1995) Microsatellites ดูเหมือนจะมีอยู่ในพืชน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Lagercrantz *et al.*, 1993) ในแง่ของประเภทชุดซ้ำ dinucleotide repeat (GT)_n ถูกพบบ่อยที่สุดในจีโนมของมนุษย์และดูเหมือนจะพบยากที่สุดในจีโนมของพืช ในขณะที่ (AT)_n จะถูกพบมากที่สุดที่สุดในพืช (Lagercrantz *et al.*, 1993; Pandey, 2005)

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (SSRs)

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ Pandey (2005) ได้ใช้วิธีการที่พัฒนาโดย Fischer and Bachmann (1998)

ทั้งนี้ได้สรุปขั้นตอนการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellites markers) มีวิธีการ 13 ขั้นตอนดังนี้ คือ 1. การสกัดดีเอ็นเอ 2. การย่อยจีโนมิกดีเอ็นเอ 3. การเชื่อมต่อเส้นดีเอ็นเอกับ adapters 4. การ hybridization ของโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ 5. การแยกด้วยแม่เหล็ก 6. การชะล้าง 7. การเพิ่มปริมาณ PCR 8. การโคลนเข้าสู่ plasmid vector 9. การถ่ายสารพันธุกรรมเข้าสู่ Bacterial 10. Colony PCR 11. การหาลำดับดีเอ็นเอในโคลนี 12. ออกแบบไพรเมอร์ และ 13. การทดสอบไพรเมอร์ (ภาพที่ 3.1) รายละเอียดการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ศึกษาได้จาก Pandey (2005) โดยวิธีการดังกล่าวข้างต้นได้นำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ในไม้ป่า คือ ไม้พะยูน 10 ตำแหน่ง (สุจิตรา และคณะ 2552) ไม้สะเดา 11 ตำแหน่ง (Boontong *et al.*, 2009) ไม้มะขามป้อม (Pandey and Changtragoon, 2012) โดยขอยกการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอในไม้พะยูนเป็นกรณีศึกษา ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (SSRs) โดยสุรูป

การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์มาร์กเกอร์ในไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre.)

บทนำ

ไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre.) เป็นไม้มีค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ ไทย มีการใช้ประโยชน์ของไม้พะยูนอย่างแพร่หลาย ทั้งในรูปของการใช้ประโยชน์จากเนื้อไม้ที่มีสีสนและ ลวดลายสวยงามจนถือได้ว่าเป็นไม้ที่มีราคาแพงที่สุดชนิดหนึ่งในตลาดโลก ทำให้ไม้พะยูนในประเทศไทย กำลังเผชิญกับสถานะที่ล่อแหลมต่อการสูญพันธุ์และมีผลกระทบต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม ใน ปัจจุบันมีการลักลอบตัดไม้พะยูนในพื้นที่อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และป่าสงวน มากขึ้น (น้ำชาติ, 2551) ซึ่ง IUCN (2006) ได้จัดไม้พะยูนอยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (Vulnerable) ดังนั้นการอนุรักษ์พันธุกรรมของไม้พะยูน จึงเป็นกิจกรรมที่สำคัญและเร่งด่วน อย่างไรก็ตามในการอนุรักษ์ พันธุกรรมของไม้พะยูนอย่างมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องทราบสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ พะยูนซึ่งสามารถดำเนินการโดยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์มาร์กเกอร์แต่ เนื่องจากยังไม่มีผู้พัฒนาไมโครแซทเทลไลท์มาร์กเกอร์ชนิดนี้มาก่อนจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนามาร์กเกอร์ชนิด นี้ขึ้นมา (สุจิตรา และคณะ, 2552)

ทั้งนี้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ หรือที่เรียกว่า simple sequence repeat (SSR) เป็นเครื่องหมาย ทางพันธุกรรมอย่างหนึ่งซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเรียงตัวกันประมาณ 1-6 นิวคลีโอไทด์ โดยมีการซ้ำ ติดต่อกันไปเรื่อยๆ เป็นช่วงยาวตั้งแต่ 2 ซ้ำขึ้นไป มีกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (Litt and Luty, 1989; Handcock, 1999) ปัจจุบันไมโครแซทเทลไลท์เป็นดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ ที่นิยมใช้ในการประเมินความหลากหลายทาง พันธุกรรม เพราะให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงและแสดงให้เห็นสภาพข่มร่วมกัน จึงมีประโยชน์ใน การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม ระบบการสืบพันธุ์ การเคลื่อนย้ายและการถ่ายเทของยีนระหว่าง ประชากร

ในการศึกษาในครั้งนี้ สุจิตรา และคณะ (2552) ได้พัฒนาไมโครแซทเทลไลท์มาร์กเกอร์ที่เหมาะสม สำหรับไม้พะยูน เพื่อสามารถนำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากร เพื่อใช้เป็น ข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาระบบการสืบพันธุ์และลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของไม้พะยูนเพื่อใช้ ประโยชน์ในการวินิจฉัยต้นพันธุ์และแหล่งที่มาเพื่อป้องกันการลักลอบตัดไม้พะยูนและเพิ่มประสิทธิภาพใน การอนุรักษ์ไม้พะยูนในอนาคต

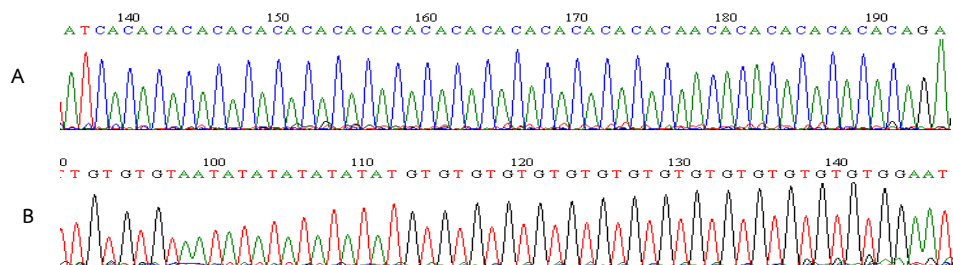
วัสดุและวิธีการศึกษาวิจัย

การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์มาร์กเกอร์ครั้งนี้ใช้ตามวิธีการของ Fischer and Bachmann (1998) โดยสุจิตรา และคณะ (2552) ได้นำใบอ่อนของไม้พะยูน มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดข้างต้นมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำคือ GT/AC และต่อกับ adapter ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ adapter I, 5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3' และ adapter II, 5'TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGACA3' จากนั้นทำความสะอาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยชุด MinElute™ Gel Extraction kit (QIAGEN, Hilden) ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้

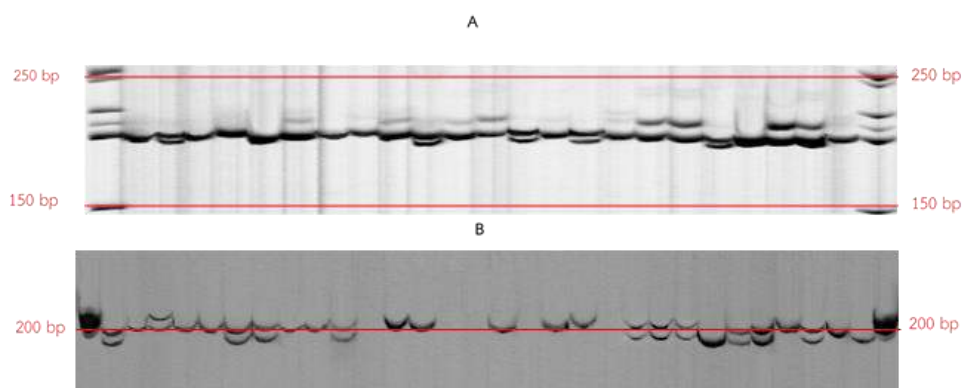
ด้วยการทำพีซีอาร์แล้วนำดีเอ็นเอมาจับกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นมาเป็นชุดซ้ำแบบ ไดนิวคลีโอไทด์ชนิด (CT)₁₀ เพื่อให้จับกับส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่เป็น GA โดยใช้ MagneSphere® Magnetic Separation (Promega) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ hybridization มาตรวจสอบด้วยการทำ PCR อีกครั้งหนึ่งจากนั้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำไฮบริดเซชันนำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T easy vector system (Promega) แล้ว transformation เข้าสู่ แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α คัดเลือกโคลนีที่ได้โดยใช้ X-gal เพื่อให้ได้โคลนีสีฟ้าและสีขาวนำโคลนีสีขาวที่ได้มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ และนำมาสกัดพลาสมิดด้วย GenElute™ Plasmid Miniprep kit (Sigma) นำพลาสมิดที่ได้มาหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem) และใช้ universal primer คือ SP6 และ T7 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น ‘5 ATTTAGGTGACACTATAG 3’ และ 5’ TAATACGACTCACTATAGG 3’ ตามลำดับและทำพีซีอาร์ตามวิธีการซึ่งแนะนำโดย Applied Biosystem หาลำดับเบสโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem Foster City, CA) นำชิ้นดีเอ็นเอที่มีส่วนของไมโครแซทเทลไลต์มาออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000)

ผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์

จากการหาลำดับเบส ชิ้นดีเอ็นเอจาก 80 clones จาก genomic libraries สุจิตราและคณะ (2552) พบส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมดมี 55 ชิ้นดีเอ็นเอ(clones)คิดเป็น เปอร์เซ็นต์ 76.36% ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็นชุดซ้ำแสดงดังภาพที่ 3.2 โดยมีชุดซ้ำ CA/AC 23 ชิ้น, ชุดซ้ำ TG/GT 25 ชิ้น, ชุดซ้ำ TA/AT 3 ชิ้น, ชุดซ้ำ GA/AG 3 ชิ้น และชุดซ้ำ CT/TC 1 ชิ้น มีความยาวโดยเฉลี่ยของชุดซ้ำเท่ากับ 9 ชุดซ้ำ (18 bp) โดยชุดซ้ำที่สั้นที่สุดคือ (TC)₃ และชุดซ้ำที่ยาวที่สุดคือ (GT)₃₁ จากการนำชิ้นดีเอ็นเอที่มีส่วนของไมโครแซทเทลไลต์มาออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000) ส่วนที่ออกแบบไม่ได้นั้นเนื่องจากส่วนที่เป็นชุดซ้ำนั้นอยู่ติดกับส่วนที่เป็นดีเอ็นเอเวกเตอร์มากเกินไปซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 13 ชิ้น และจากการทดสอบคู่ไพรเมอร์ทั้ง 42 คู่ ในเบื้องต้นพบว่า มี 10 คู่ไพรเมอร์ที่มี polymorphism แสดงดังภาพที่ 3.3 ตำแหน่งที่ให้อัลลีลต่ำสุดคือ 2 อัลลีล และตำแหน่งที่ให้อัลลีลสูงสุดคือ 5 อัลลีลโดยมีค่าเฉลี่ยของอัลลีลเท่ากับ 3.5 อัลลีลต่อตำแหน่งดังแสดงในตารางที่ 3.1



ภาพที่ 3.2 แสดงส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ซึ่งพบในไม้พะยูน (A) แสดงส่วนที่เป็นชุด CA 27 ซ้ำ (B) แสดงส่วนที่เป็นชุด TA 7 ซ้ำและ GT 16 ซ้ำ (ที่มา: สุจิตรา และคณะ, 2552)



ภาพที่ 3.3 แสดงรูปแบบอัลลีลของตัวอย่างไม้พะยูนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ (A) แสดงรูปแบบอัลลีลที่แตกต่างกันของไพรเมอร์ Delb_120 (B) แสดงรูปแบบอัลลีลที่แตกต่างกันของไพรเมอร์ Delb_90 (ที่มา: สุจิตรา และคณะ, 2552)

ตารางที่ 3.1 แสดงไพรเมอร์ที่มี polymorphism ในไม้พะยูน

ไพรเมอร์	ลำดับเบสแกน	ลำดับเบส	ขนาดของ ผลผลิตพีซีอาร์	จำนวนอัลลีล/ ตำแหน่ง
DELB_1	(GA) ₃	F: TTACGCGTGGACTAACCTAAG R: AAAGCTCCTTGCTCAGCACT	157	3
DELB_10	(GA) ₃	F: GCTTACGCGTGGACTAACCT R: CAGGCCCTTGAGCTCTATCA	239	2
DELB_18	(CA) ₆	F: ACATCTCCGTCTCGCTCACT R: TTGTCGTTTTGGGGAGAGTC	163	3
DELB_44	(GA) ₄	F: AACAGGCCCTTCTGTTGAAA R: AGAATGAAGGCGTCTTTTCG	191	3
DELB_46	(GT) ₂₄	F: GCCTCCTAGTCCTTAGCGAGT R: CCTGGGCGAATAAATGGATA	167	5
DELB_57	(GAA) ₇	F: GGTGGTTTGGGATTGAGATG R: TCTTCCCCCTCATCCTTTTT	202	3
DELB_239	(AG) ₃	F: GATCCTGCCTGCTATGCACT R: AAGGGGGTTTTAGGTGAGGA	203	3
DL4	(AT) ₁₃	F: AAATCAAGAGCATTGGGTCAA R: TTCACAGGTTTCGTCGTTCC	166	5
DELB_120	(CA) ₃	F: GTGGGTCAAGCCACAAA R: GACTGGGCCCATTTGAGTAA	195	5
DELB_90	(TA) ₃	F: GGGTACCCTTACCGTATATCTTCC R: TGGATTCCCCTGTTGAAGTC	201	3
เฉลี่ย				3.5

ที่มา: สุจิตรา และคณะ, 2552

สรุปผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์

การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไม้พะยูนโดยการหาลำดับเบสจากทั้งหมด 80 clones พบส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด 55 clones สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 42 คู่ และจากการทดสอบคู่ไพรเมอร์ทั้ง 42 คู่ ในเบื้องต้นพบว่า มี 10 คู่ไพรเมอร์ที่มี polymorphism ตำแหน่งที่ให้อัลลีลต่ำสุดคือ 2 อัลลีล และตำแหน่งที่ให้อัลลีลสูงสุดคือ 5 อัลลีลโดยมีค่าเฉลี่ยของอัลลีลเท่ากับ 3.5 อัลลีลต่อตำแหน่ง (สุจิตรา และคณะ 2552)

อย่างไรก็ตาม ในไม้ชนิดอื่นที่มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์แล้ว เช่น ไม้สัก ได้ดำเนินการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแล้ว จำนวน 10 ตำแหน่ง (Verhaegen *et al.*, 2005) ไม้ประดู่ จำนวน 12 ตำแหน่ง (Li *et al.*, 2010) และไม้ชิงชัน จำนวน 7 คู่ (Hartvig *et al.*, 2017) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้

ส่วนในไม้ที่ไม่เคยมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์มาก่อนจะต้องใช้เวลาอย่างน้อย 1 ปี ค่าใช้จ่ายประมาณ 400,000 บาท แต่ในปัจจุบันสามารถจ้างให้บริษัทพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ได้โดยมีค่าใช้จ่ายประมาณ 20,000 บาท/ชนิดพืช/ชนิดเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในกรณีที่มีการศึกษาตัวอย่างชนิดไม้ที่มีความใกล้เคียงกันมาแล้วก็สามารถนำมาใช้ได้

บทที่ 4

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในไม้สนสองใบ (*Pinus merkusii*) โดยใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ยีน

คำนำ

ไม้สนสองใบ (*Pinus merkusii*) เป็นไม้สนเขาเพียงหนึ่งในสองชนิดของประเทศไทยเท่านั้นที่ขึ้นตามธรรมชาติ (Cooling, 1968) ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจและนิเวศวิทยาของประเทศไทยอย่างมาก ทั้งนี้เพราะมีเนื้อเยื่อ(Fibers) ยาวและมีคุณภาพดี เหมาะสำหรับการทำเนื้อเยื่อกระดาษ (FAO/UNDP, 1968) นอกจากนี้ยังมียาง Resin และเนื้อไม้ที่สวยงามเหมาะสำหรับการทำอุตสาหกรรมก่อสร้างและเครื่องเรือน แต่เนื่องจากไม้สนสองใบมีปัญหาในเรื่องการเจริญเติบโตในช่วงระยะแรกคือมี Grass stage ประกอบกับปัญหาในการเพาะกล้าไม้ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ และเก็บเมล็ดไว้ได้ไม่นาน นอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องไฟและน้ำท่วม ตลอดจนปัญหาการบุกรุกทำลาย ลักลอบตัด และเจาะยางสนจากไม้สนสองใบเป็นจำนวนมาก อย่างน่าเป็นห่วง (Sa-ardavut *et al.*, 1988) แม้ว่าโครงการ DANIDA จากรัฐบาล เดนมาร์กได้ให้ความช่วยเหลือในการคัดเลือกพันธุ์โดยการทำการทดลองถิ่นกำเนิดนานาชาติ (International provenance trials) ปี 1970 และการอนุรักษ์ยีนในถิ่นกำเนิด (*In situ* gene conservation) ปี 1979 ไม้สนสองใบในสถานะปัจจุบันซึ่งอยู่ในสภาพที่น่าเป็นห่วงอยู่ เพราะไม้สนสองใบในแหล่งธรรมชาติได้ลดน้อยลงไปเรื่อย ๆ ตลอดจนการผลิตเมล็ดไม้ก็ลดลงไปมาก ซึ่งไม่พอต่อการรองรับการปลูกสร้างสวนป่าในปัจจุบันและอนาคต ถ้าจะให้มีความปลอดภัย ไม้สนสองใบตามที Pausajja *et al.* (1988) ได้เคยประเมินไว้

ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น Changtragoon and Finkeldey (1995a) จึงได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในไม้สนสองใบเพื่อหาแนวทางในการอนุรักษ์ยีนไม้สนสองใบ โดยการใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ยีน (Isoenzyme gene marker) เป็นตัวช่วยวินิจฉัยว่าการที่เมล็ดไม้สนสองใบมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำมีผลมาจากการเกิดการผสมตัวเองหรือไม่ (Selfing) และระบบสืบพันธุ์ (Mating system) เป็นอย่างไร จะได้ช่วยในการปรับปรุงการผสมข้ามให้มากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถอาศัยข้อมูลของความถี่ของยีน (Allele frequency) ในการวินิจฉัยแหล่งที่มา (Provenances) ได้และความผันแปรทางพันธุกรรม (Genetic variation) ในการวินิจฉัยว่าเมล็ดไม้สนสองใบ ควรจะเก็บอย่างไร และจากท้องที่ไหนเพื่อนำไปปลูกสร้างสวนป่าและการอนุรักษ์ยีนต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษาวิจัย

Changtragoon and Finkeldey (1995a) ได้เก็บเมล็ดสนสองใบจาก 11 แหล่ง(ประชากร) ที่กระจายตามป่าธรรมชาติทางภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเก็บจำนวน 8 - 30 แบบ สุ่มตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของประชากร บางประชากรมีน้อย เช่น ที่หมู่บ้านภูมินิยม จังหวัดสุรินทร์ มีความหนาแน่นของประชากรต่ำจึงต้องเก็บเมล็ดต่อต้นเพิ่มขึ้นจากแหล่งอื่น จาก 6 เมล็ดต่อต้น เป็น 15 เมล็ดต่อต้น ดังแสดงตามตารางที่ 4.1 เมื่อได้เมล็ดมาแล้วได้นำมาแยก Embryo และ Endosperm เพื่อศึกษา

ไอโซเอนไซม์ 11 ระบบ โดยวิธี Horizontal starch gel electrophoresis ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Changtragoon and Finkeldey (1995b) ซึ่งสามารถวินิจฉัยไอโซเอนไซม์ยีน ได้ 17 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อได้ข้อมูลจากการศึกษาแล้วนั้นได้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม BIOSYS (Swofford and Selander, 1981) และ GSED (Gillet, 1994) เพื่อใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และใช้ MLT Computer program (Ritland and Jain, 1981; Ritland, 1990) เพื่อใช้ประเมินอัตราการผสมข้าม

ผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในไม้สนสองใบ 11 แหล่ง (ประชากร) ในประเทศไทย โดยการใช้ไอโซเอนไซม์ยีน (Isoenzyme gene) 14 ตำแหน่ง (Loci) Changtragoon and Finkeldey (1995a) พบว่ามีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำคือมีแค่ 5.8เปอร์เซ็นต์ ($H_e=0.058$) อย่างไรก็ตาม ไม้สนสองใบที่ห้วยทา จังหวัดศรีสะเกษมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด ดังแสดงในตาราง 4.3 ส่วนความแตกต่างของยีนระหว่างแหล่งก็มีค่าต่ำเช่นกัน ($d=0.034$) แต่ถ้าวัดสัดส่วนของความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งเมื่อเทียบกับความผันแปรทางพันธุกรรมทั้งหมดทุกแหล่งมี 10.4 เปอร์เซ็นต์ ($F_{st}=0.104$) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.1 ส่วนผลการวิเคราะห์ค่าของความสมดุลของประชากร (Hardy-Weinberg expectations) นั้นโครงสร้างทางพันธุกรรมของเมล็ดสนที่เก็บมาศึกษานั้นพบว่ามีค่าของเฮเทอโรไซโกต (Heterozygotes) มีค่าต่ำกว่าค่าความสมดุลของประชากรในเกือบทุกแหล่ง (ประชากร) ในขณะที่จากการศึกษาในตัวอย่างที่ได้มาจากต้นสนสองใบในแต่ละแหล่ง (ประชากร) พบว่าไม่มี ความแตกต่างจากค่าของสมดุลของประชากร (Changtragoon and Finkeldey, 1995a)

สำหรับการประเมินอัตราการผสมข้ามจากไม้สนสองใบ 9 ใน 10 แหล่ง (ประชากร) พบว่า มีอัตราการผสมตัวเองค่อนข้างสูง ($0.017 < t_m < 0.65$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ทั้งนี้อาจเนื่องจากการที่มีจำนวนต้นของไม้สนสองใบส่วนใหญ่ในแต่ละแหล่ง (ประชากร) มีอยู่น้อยประกอบกับมีอายุค่อนข้างมากทำให้ข้อจำกัดในการออกดอก ทำให้โอกาสที่ดอกจะออกพร้อมกันจึงมีน้อย จึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ ไม้สนสองใบมีค่าสัมประสิทธิ์การผสมในหมู่เครือญาติ (Inbreeding coefficient) ค่อนข้างสูง นั่นก็คือ มีอัตราการผสมตัวเองสูงนั่นเอง (Changtragoon and Finkeldey, 1995a)

ตารางที่ 4.1 11 แหล่ง (ประชากร) ของไม้สนสองใบที่ใช้ทำการศึกษา

ลำดับที่	แหล่ง(ประชากร)	ชื่อย่อ	พื้นที่ศึกษา	ปีที่เก็บเมล็ด	ระดับความสูง โดยประมาณ	ประเภท สังคมป่า	จำนวนต้น ที่เก็บ	จำนวน เมล็ดที่เก็บ ต่อต้น
1	หมู่บ้านวัดจันทร์1 (Ban Wat Chan) จ.เชียงใหม่	BW 1	ภาคเหนือ	1992	1,000	PD	23	6
2	หมู่บ้านวัดจันทร์2 (Ban Wat Chan) จ.เชียงใหม่	BW 2	ภาคเหนือ	1993	1,000	PD	18	6
3	อ.ขุนยวม (Khun Yuam) จ.แม่ฮ่องสอน	KY	ภาคเหนือ	1992	600	PD	21	6
4	อ.อมก๋อย (Omkoï) จ.เชียงใหม่	OM	ภาคเหนือ	1992	1,000	PD	23	6
5	จ.พิษณุโลก1 (Pitsanuloke1)	PI 1	ภาคกลาง	1993	800	PS	30	6
6	จ.พิษณุโลก2 (Pitsanuloke2)	PI 2	ภาคกลาง	1993	800	PS	26	6
7	หมู่บ้านหนองคู (Nong Khu) อ.สังขะ จ.สุรินทร์	NK	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	1992	170	SPR	25	6
8	หมู่บ้านภูมินิยม (Poomniyom) อ.สังขะ จ.สุรินทร์	PO	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	1992	170	SPR	8	15
9	ห้วยทา (Huey Tha) จ.ศรีสะเกษ	HT	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	1992	150	SPR	23	6
10	อ.โขงเจียม (Kong Chiam) จ.อุบลราชธานี	KC	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	1992	130	SPR	18	6
11	อ.บุนตริก (Buntarik) จ.อุบลราชธานี	BU	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	1992	140	SPR	30	6

(ที่มา: Werner, 1993: PD-Pine Dipterocarp Forest; PS-Pine Savannah; SPR-Seasonal Pine Rainforest; Changtragoon and Finkeldey, 1995a)

ตารางที่ 4.2 ไอโซเอนไซม์ 11 ระบบที่ใช้ศึกษา และตำแหน่งของไอโซเอนไซม์อื่น 17 ตำแหน่งที่ได้ถูก
วินิจฉัย

ระบบของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme system)	อักษรย่อ (Abbreviation)	รหัสของเอนไซม์ (Enzyme code)	ตำแหน่งของไอโซเอนไซม์อื่น (Gene Loci)
Leucine aminopeptidase	<i>LAP</i>	3.4.11.1	<i>Lap-A, Lap-B</i>
Glutamate-oxaloacetate transaminase	<i>GOT</i>	2.6.1.1	<i>Got-A, Got-B, Got-C</i>
Glutamate dehydrogenase	<i>GDH</i>	1.4.1.3	<i>Gdh-A</i>
Formate dehydrogenase	<i>FDH</i>	1.2.1.2	<i>Fdh-A</i>
Malate dehydrogenase	<i>MDH</i>	1.1.1.37	<i>Mdh-A, Mdh-B, Mdh-C</i>
Shikimate dehydrogenase	<i>SKDH</i>	1.1.1.25	<i>Skdh-A</i>
6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>6-PGDH</i>	1.1.1.44	<i>6-pgdh-A, 6-pgdh-B</i>
Phosphoglucomutase	<i>PGM</i>	2.7.5.1	<i>Pgm-A</i>
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	<i>G-6-PDH</i>	1.1.1.49	<i>G-6-pdh-B</i>
Isocitrate dehydrogenase	<i>IDH</i>	1.1.1.42	<i>Idh-A</i>
Diaphorase	<i>DIA</i>	1.6.4.3	<i>Dia-A</i>

ที่มา: Changtragoon and Finkeldey, 1995a

ตารางที่ 4.3 การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากร

แหล่งประชากรที่ศึกษา	N	PPL (no)	PPL (95%)	A/L	u	δ_T (= H_e)	H_0	u_{gam}
หมู่บ้านวัดจันทร์1 (Ban Wat Chan) จ.เชียงใหม่	126	50.0	21.4	1.6	1.040	0.038	0.019	1.781
หมู่บ้านวัดจันทร์2 (Ban Wat Chan) จ.เชียงใหม่	108	57.1	21.4	1.6	1.050	0.048	0.037	2.019
อ.ขุนยวม (Khun Yuam) จ.แม่ฮ่องสอน	126	35.7	7.1	1.4	1.029	0.029	0.006	1.552
อ.อมก๋อย (Omkoï) จ.เชียงใหม่	139	50.0	21.4	1.7	1.082	0.076	0.042	3.532
จ.พิษณุโลก1 (Pitsanuloke1)	180	50.0	21.4	1.8	1.097	0.088	0.063	4.602
จ.พิษณุโลก2 (Pitsanuloke2)	156	42.9	14.3	1.4	1.051	0.048	0.032	2.270
หมู่บ้านหนองคู(Nong Khu) อ.สังขะ จ.สุรินทร์	150	42.9	21.4	1.6	1.075	0.070	0.051	3.257
หมู่บ้านภูมินิยม(Poomniyom) อ.สังขะจ.สุรินทร์	120	28.8	7.1	1.3	1.041	0.039	0.030	2.093
ห้วยทา (Huey Tha)จ.ศรีสะเกษ	138	57.1	35.7	1.6	1.112	0.109	0.061	6.213
อ.โขงเจียม (Kong Chiam)	108	50.0	21.4	1.5	1.058	0.055	0.044	2.361
จ.อุบลราชธานี								
อ.บุนทรริก (Buntarik)จ.อุบลราชธานี	180	42.9	14.3	1.6	1.044	0.042	0.025	1.932
ค่าเฉลี่ย	139.1	46.1	18.8	1.6	1.062	0.058	0.037	2.873

หมายเหตุ : Percentage of polymorphic gene loci (PPL; and 95% criterions), mean number of alleles per locus (A/L), gene pool allelic diversity (u), gene pool differentiation within population δ_T (= “expected heterozygosity” H_e), average observed heterozygosity, and hypothetical gametic diversity (u_{gam})

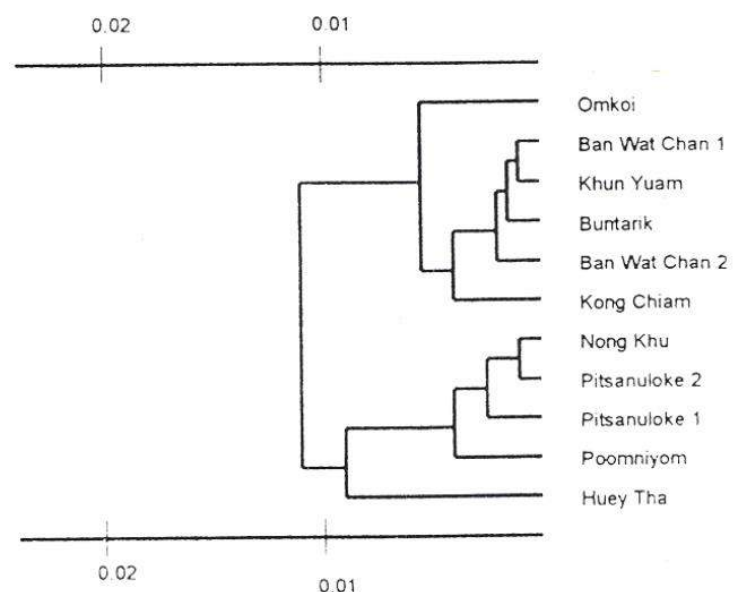
ที่มา: Changtragoon and Finkeldey, 1995a

ตารางที่ 4.4 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง D_j และ δ และ F_{st} ความแตกต่างของยีนทั้งหมด

ตำแหน่งของยีน (Gene locus)	D _j										δ	F _{ST}	
	BW 1	BW 2	KY	OM	PI 1	PI 2	NK	PO	HT	KC			BU
Lap-A	0.000	0.015	0.015	0.015	0.019	0.015	0.019	0.015	0.005	0.047	0.015	0.016	0.024
Lap-B	0.048	0.076	0.048	0.032	0.059	0.026	0.018	0.038	0.094	0.022	0.038	0.045	0.040
Gdh-A	0.014	0.049	0.031	0.199	0.102	0.033	0.016	0.115	0.013	0.108	0.024	0.064	0.056
Pgm-A	0.083	0.002	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.009	0.013	0.017	0.013	0.019	0.053
Mdh-A	0.018	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.002	0.002	0.004	0.013
Mdh-B	0.000	0.025	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.015	0.005	0.007	0.018
Mdh-C	0.004	0.026	0.000	0.001	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.006	0.016
Skdh-A	0.038	0.038	0.038	0.038	0.030	0.038	0.067	0.038	0.211	0.038	0.017	0.054	0.131
6-pgdh-A	0.046	0.046	0.046	0.010	0.043	0.043	0.046	0.046	0.176	0.074	0.076	0.059	0.101
6-pgdh-B	0.004	0.034	0.027	0.025	0.016	0.016	0.014	0.016	0.014	0.016	0.016	0.018	0.019
G-6-pdh-B	0.009	0.009	0.034	0.009	0.034	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.004	0.013	0.023
Fbh-A	0.193	0.221	0.240	0.018	0.242	0.090	0.163	0.343	0.067	0.040	0.195	0.165	0.173
Idh-A	0.002	0.055	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.010	0.048
Gene pool	0.033	0.043	0.036	0.027	0.041	0.021	0.027	0.046	0.045	0.049	0.030	0.034	0.104

การคำนวณอ้างอิงมาจาก: Gregorius and Roberd, 1986; Nei, 1973

ที่มา: Changtragoon and Finkeldey, 1995a;



ภาพที่ 4.1 การวิเคราะห์ Cluster analysis (UPGMA) โดยใช้ Nei's genetic distance ที่ยืน 16 ตำแหน่ง ในการศึกษาใบไม้สนสองใบ 11 ประชากร (ที่มา: Changtragoon and Finkeldey, 1995a)

ตารางที่ 4.5 การประเมินอัตราการผลิตข้ามที่ยืนตำแหน่งเดียว (t_s) และ มียืนหลายตำแหน่ง (t_m)

แหล่ง(ประชากร)	t_s	t_m
1. หมู่บ้านวัดจันทร์1 (Ban Wat Chan) จ.เชียงใหม่	0.424±0.307	0.444±0.322
2. หมู่บ้านวัดจันทร์2 (Ban Wat Chan) จ.เชียงใหม่	0.571±0.204	0.593±0.202
3. อ.อมก๋อย (Omkoi) จ.เชียงใหม่	0.014±0.011	0.017±0.013
4. อ.ขุนยวม (Khun Yuam) จ.แม่ฮ่องสอน	0.385±0.102	0.422±0.120
5. จ.พิษณุโลก1 (Pitsanuloke1)	0.600±0.134	0.644±0.154
6. จ.พิษณุโลก2 (Pitsanuloke2)	0.372±0.099	0.395±0.095
7. หมู่บ้านหนองคู (Nong Khu) อ.สังขะ จ.สุรินทร์	0.433±0.114	0.455±0.115
8. หมู่บ้านภูมิเนียม (Poomniyom) อ.สังขะ จ.สุรินทร์	0.767±0.145	-
9. ห้วยทา (Huey Tha) จ.ศรีสะเกษ	0.395±0.068	0.468±0.077
10. อ.โขงเจียม (Kong Chiam) จ.อุบลราชธานี	0.863±0.068	0.843±0.087
11. อ.บุนทริก (Buntarik) จ.อุบลราชธานี	0.396±0.089	0.400±0.088

ที่มา: Changtragoon and Finkeldey, 1995a

ข้อเสนอแนะในการอนุรักษ์พันธุ์กรรมไม้สนสองใบ

จากพื้นฐานผลจากการศึกษาวิจัยดังกล่าวข้างต้น จึงได้เสนอแนะให้มีการอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุ์กรรมของไม้สนสองใบ (*P. merkusii*) อย่างมีประสิทธิภาพในการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิด (*In situ* conservation) ที่แหล่ง (ประชากร) ห้วยทา จังหวัดศรีสะเกษ เนื่องจากมีความหลากหลายทางพันธุ์กรรมสูงที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งอื่นและควรคัดเลือกแหล่งสำหรับการอนุรักษ์พันธุ์กรรมในถิ่นกำเนิดสำหรับภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีความหลากหลายทางพันธุ์กรรมที่สูงลดลงมา เช่น ที่แหล่ง (ประชากร) หมู่บ้านหนองคู จังหวัดสุรินทร์และอำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี และแหล่ง (ประชากร) ที่อยู่ทางภาคเหนือ เช่น หมู่บ้านวัดจันทร์ จังหวัดเชียงใหม่ นอกจากการอนุรักษ์พันธุ์กรรมในถิ่นกำเนิดควรมีการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดด้วยข้อดีในการดำเนินการดังกล่าวนี้ เนื่องจากการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดจะทำให้บริหารจัดการง่ายและช่วยทำให้มีการปลูกป่าไม้สนสองใบนอกถิ่นกำเนิดที่มีอายุใกล้เคียงกัน และมีความหนาแน่นของต้นสูง จึงทำให้เพิ่มโอกาสที่ทำให้มีการออกดอกพร้อมกัน ซึ่งจะทำให้อัตราการผสมตัวเองลดลงกว่าในพื้นที่ธรรมชาติดั้งเดิมที่มีอายุมากแล้ว ดังนั้นจึงขอแนะนำดังนี้คือ ควรจัดทำแปลงอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด 3-6 แปลง อย่างน้อยควรมีหนึ่งแปลงในแต่ละภูมิภาคที่มีการกระจายพันธุ์ทางธรรมชาติของ ไม้สนสองใบขึ้นกล่าวคือในภาคเหนือ ภาคกลางและตะวันออกเฉียงเหนือในการเก็บเมล็ดไม้สนสองใบนั้นควรเก็บจากประมาณ 20 ต้น จาก 3 แหล่ง (ประชากร) ที่อยู่ในภูมิภาคเดียวกัน เนื่องจากไม้สนสองใบมีความหลากหลายทางพันธุ์กรรมค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจำนวนที่กล่าวถึงจะมีข้อมูลและฐานทางพันธุ์กรรมที่เพียงพอสำหรับการอนุรักษ์ไม้สนสองใบนอกถิ่นกำเนิดในประเทศไทย ซึ่งเมล็ดจากภูมิภาคเดียวกันควรเก็บโดยสุ่มที่เป็นตัวแทนของภูมิภาคและนำมารวมกันอย่างทั่วถึง (Bulked) และปลูกเป็นแปลงปลูกนอกถิ่นกำเนิดที่มีขนาดแต่ละแปลง 6.25 ไร่ (1 เฮกเตอร์) ซึ่งควรทำ 2 แห่ง ที่ง่ายต่อการปกป้องดูแลในแต่ละภูมิภาค ดังนั้นเมื่อรวมทุกภูมิภาคแล้วควรปลูกป่าเพื่อทำเป็นแปลงอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด รวมทั้งหมด 37.5 ไร่ (6 เฮกเตอร์) (Changtragoon and Finkeldey, 1995a)

บทที่ 5

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้สัก (*Tectona grandis*)

5.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้สักในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์

คำนำ

ไม้สัก (*Tectona grandis*) เป็นไม้เขตร้อนที่ผลัดใบ ซึ่งมีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในเขตประเทศอินเดีย พม่า ไทย ลาว และอินโดนีเซีย (ส่วนใหญ่บนเกาะชวา แต่สันนิษฐานว่าเป็นป่าปลูกในอดีต) เนื่องจากความต้องการไม้สักมีเพิ่มขึ้นอย่างมาก ทำให้ได้มีการนำเอาไม้สักไปปลูกในประเทศต่างๆ ในเขตร้อน และกึ่งเขตร้อนหลายประเทศ (Kaosa-ard, 1986) ในประเทศไทยไม้สักมีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในท้องที่ภาคเหนือ เช่น จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง แพร่ อุตรดิตถ์ และตาก และภาคกลาง ในจังหวัดกาญจนบุรี อย่างไรก็ตามพื้นที่ที่มีไม้สักขึ้นได้ถูกทำลายไปมาก (Kjaer *et al.*, 1996) ทำให้ต้องมีการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมของไม้สักไว้ ดังนั้นการที่จะอนุรักษ์พันธุกรรมของไม้สักให้มีประสิทธิภาพ ควรที่จะทราบพื้นฐานพันธุกรรมของไม้สักก่อน ดังนั้น Changtragoon and Szmidt (1999) จึงได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้สักเพื่อเป็นพื้นฐานในการวางแผนการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้สักให้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป ซึ่งรายละเอียดการศึกษาดังกล่าวมีดังต่อไปนี้

วัสดุและวิธีการศึกษาวิจัย

Changtragoon and Szmidt (1999) ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างผลไม้สัก (*Tectona grandis*) แบบสุ่ม 11 แหล่ง (Population) จากป่าธรรมชาติในทางภาคเหนือและภาคกลางของประเทศ เช่น ในจังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง แม่ฮ่องสอน แพร่ ตาก อุตรดิตถ์ และกาญจนบุรี ดังแสดงในตารางที่ 5.1.1

การศึกษาไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme analysis)

เมล็ดได้ถูกคัดแยกออกจากผลเป็นจำนวน 40 เมล็ดต่อแหล่ง และสกัดเอนไซม์จากเมล็ดแต่ละเมล็ด ในบัฟเฟอร์ (Homogenizing buffer) และจุ่มในกระดาษกรองและนำไปแยกโมเลกุลของเอนไซม์ในแผ่นแป้ง (Starch gel) ในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแนวนอน (Horizontal electrophoresis) เป็นเวลา 4 - 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นแป้งไปตัดแผ่นบางประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร แล้วนำไปย้อมสีสำหรับ enzymes ชนิดต่างๆ ตามตารางที่ 5.1.2 ดังวิธีการของ Conkel *et al.* (1982); Changtragoon and Finkeldey 1995b; Changtragoon *et al.* (1996a)

ตารางที่ 5.1.1 แหล่ง (ประชากร) ไม้สัก(*Tectona grandis*) ที่ทำการศึกษา

แหล่ง (Population no.)	ชื่อแหล่ง และสถานที่ (Population name and location)	ลองติจูด และแลตติจูด (Longitude and Latitude)	ความสูงเหนือ ระดับน้ำทะเล (Altitude)
1	อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ Chiangdao, Chiangmai	E 98° 57' 36" N 19° 21' 36"	390 ม.
2	อ.ฮอด จ.เชียงใหม่ Hod, Chiangmai	E 98° 36' N 18° 11' 24"	343 ม.
3	หมู่บ้านบ้านใหม่ อ.แม่ทะ จ.ลำปาง Banmai Maetha, Lampang	E 102° 55' 48" N 18° 16' 48"	233 ม.
4	อช.ถ้ำผาไทย จ.ลำปาง Thumpathai, Lampang	E 99° 58' 48" N 18° 45'	290 ม.
5	ดอยประตู่ผา จ.ลำปาง Prathupa, Lampang	E 140° 40' 48" N 13° 46' 48"	380 ม.
6	อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน Maesaraeng, Mae Hongson	E 97° 58' 48" N 18° 9'	320 ม.
7	หมู่บ้านแก่งปะลอม จ.กาญจนบุรี Kangpalom, Kanchanaburi	E 98° 52' 12" N 14° 21' 36"	98 ม.
8	หมู่บ้านวังน้ำวน จ.กาญจนบุรี Wangnamwon, Kanchanaburi	E 98° 52' 12" N 14° 21' 36"	98 ม.
9	สวนรุกขชาติโป่งสไล จ.เชียงราย Pongsaree, Chaingrai	E 99° 49' 48" N 19° 54'	400 ม.
10	ต.สะเอียบ อ.สอง จ.แพร่ Mae Saeab, Prae	E 100° 10' 48" N 18° 27' 36"	197 ม.
11	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี Thongphaphum, Kanchanaburi	E 98° 47' N 14° 43'	98 ม.

ที่มา: Changtragoon and Szmidt, 1999

ตารางที่ 5.1.2 รายชื่อของระบบไอโซเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษา

ระบบของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme system)	อักษรย่อ (Abbreviation)	รหัสของเอนไซม์ (Enzyme code)
1. Leucine aminopeptidase	LAP	3.4.11.1
2. Glutamate-oxaloacetate transaminase	GOT	2.6.1.1
3. Glutamate dehydrogenase	GDH	1.4.1.3
4. Isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.42
5. 6-Phosphogluconate dehydrogenase	6-PGDH	1.1.1.44
6. Phosphoglucomutase	PGM	2.7.5.1
7. Malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37
8. Glucose 6-phosphate dehydrogenase	G-6PDH	1.1.1.49
9. Diaphorase	DIA	1.1.4.3
10. Formate dehydrogenase	FDH	1.6.99.3
11. Shikimate dehydrogenase	SKDH	1.1.1.25
12. NDH-dehydrogenase	NDH	1.6.99.1
13. Phosphoglucose-isomerase	PGI	5.3.1.9

ที่มา: Changtragoon and Szmidt, 1999

การคำนวณทางสถิติ (Statistical analysis)

ศึกษาภาพแบบของเอนไซม์ที่ปรากฏบนแผ่นแป้งที่ได้ย้อมสีแล้ว เพื่อแปรเป็นลักษณะทางพันธุกรรมของตัวอย่างเมล็ดแต่ละเมล็ดและแต่ละแหล่ง การคำนวณทางสถิติได้ใช้คำนวณหาความถี่ ของยีน ความหลากหลายทางพันธุกรรม ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง โดยใช้ BIOSYS Computer program (Swofford and Selander, 1981) และ TFGA Computer program (Miller, 1997)

ผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์

จากการศึกษาไอโซเอนไซม์ 13 ระบบ (Systems) โดย Changtragoon and Szmidt (1999) สามารถวินิจฉัย Putative Isoenzyme genes ได้ 14 ตำแหน่ง ตามตารางที่ 5.1.3 ซึ่งพบว่า GOT-3, PGM-1, MDH-1, IDH-1, G6P-1, 6PD-2 เป็น Polymorphic loci ส่วน GOT-1, GOT-2, MDH-3, FDH-1, DIA-1, DIA-2, NDH-1 เป็น Monomorphic loci จำนวนอัลลีล (Allele) สูงสุดต่อตำแหน่งของยีน (Maximum alleles per locus) มีอยู่ 3 อัลลีล (Allele) ซึ่งความถี่ของยีนในแต่ละตำแหน่งในแต่ละแหล่ง (ประชากร) ได้แสดงในตารางที่ 5.1.4 ส่วน Polymorphic loci ของไม้สักแต่ละแหล่งได้แสดงในตารางที่ 5.1.5 ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0 - 28.6 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะไม้สักที่อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอนและโป่งสาส์ จังหวัดเชียงราย มี Polymorphic loci สูงสุดโดยมีค่า 28.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนรองลงมาคือ ตำบลสะเอียบ จังหวัดแพร่ มีค่า 21.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแหล่งไม้สักที่เหลือมีค่า 7.1 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งไม้สัก (Theta P) พบว่ามีค่า 0.028 (3 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งนับว่าไม่สูงนักแต่ก็สอดคล้องกับการศึกษาของ Kjaer and Suangtho, (1995) ซึ่งศึกษา Isoenzyme genetic variation กับไม้สักจากหลายประเทศในเอเชีย และแอฟริกา ซึ่งมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง ($F_{st} = 0.038$) ส่วน

ไม้สักที่ถ้ำผาไท จังหวัดลำปาง ไม่มี Polymorphic loci เลย ในตารางที่ 5.1.6 และภาพที่ 5.1.1 ได้แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง เมื่อเทียบกับไม้สักแหล่งอื่น

อย่างไรก็ตาม Kertardikara and Prat (1995) ได้ศึกษา Isoenzyme variation จากไม้สักหลายแหล่งโดยเปรียบเทียบกับไม้สักจากประเทศไทย อินโดนีเซีย Ivory cost และ Tanzania พบว่ามีค่า $F_{st} = 0.12$ ซึ่งนับว่ามีค่าความแตกต่างระหว่างแหล่งสูงกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะได้ใช้ Polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งต่างจากการศึกษาครั้งนี้และของ Kjaer and Suangtho (1995) ที่ใช้ Starch gel electrophoresis และใช้ Isoenzyme systems ที่ต่างกัน และจำนวน loci ที่ศึกษาก็มากกว่า และเปรียบเทียบกับแหล่งที่มีความแตกต่างทางภูมิศาสตร์มากกว่า จึงทำให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งมีค่าสูงกว่า ซึ่งคาดว่าการศึกษาในระดับ DNA ของการศึกษาไม้สักในประเทศไทยน่าจะได้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงขึ้นกว่าการศึกษาค้นนี้

ตารางที่ 5.1.3 ตำแหน่งของยีนและจำนวนสูงสุดของอัลลีลต่อตำแหน่งของยีนที่ศึกษาในแหล่ง (ประชากร) ของไม้สัก (*Tectona grandis*)

ตำแหน่งของยีน	จำนวนสูงสุดของอัลลีลต่อตำแหน่งของยีน
GOT-1	1
GOT-2	1
GOT-3	2
PGM-1	2
MDH-1	3
MDH-3	1
IDH-1	2
FDH-1	2
DIA-1	1
DIA-2	1
G6P-1	3
6PD-2	3
NDH-1	1
NDH-2	1

ที่มา: Changtragoon and Szmidt, 1999

ตารางที่ 5.1.4 ความถี่ของยีนในทุกประชากรที่ศึกษา

Locus	Population										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
GOT-1 (N)	120	120	120	40	120	40	120	80	80	120	40
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
GOT-2 (N)	120	120	120	40	120	40	120	80	80	120	40
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
GOT-3 (N)	120	120	120	40	120	40	120	80	80	120	40
1	.050	.396	.058	.000	.063	.363	.000	.000	.281	.250	.050
2	.950	.604	.942	1.000	.938	.637	1.000	1.000	.719	.750	.950
PGM-1 (N)	120	120	120	40	120	40	120	80	80	120	40
1	.000	.000	.000	.000	.021	.000	.000	.000	.275	.000	.000
2	1.000	1.000	1.000	1.000	.979	1.000	1.000	1.000	.725	1.000	1.000
MDH-1 (N)	120	120	120	40	120	40	120	80	80	80	40
1	.000	.000	.008	.000	.025	.063	.000	.019	.181	.000	.000
2	1.000	.996	.992	1.000	.975	.850	.979	.975	.819	.994	1.000
3	.000	.004	.000	.000	.000	.087	.021	.006	.000	.006	.000
MDH-3 (N)	80	120	120	40	120	40	120	80	80	80	40
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
IDH-1 (N)	120	120	120	40	120	40	120	80	80	120	40
1	.000	.017	.000	.000	.021	.338	.142	.369	.225	.237	.000
2	1.000	.983	1.000	1.000	.979	.663	.858	.631	.775	.762	1.000
FDH-1 (N)	120	120	120	40	120	40	120	80	80	120	40
1	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.004	.000
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.996	1.000
DIA-1 (N)	40	80	80	40	81	40	120	80	80	80	40
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
DIA-2 (N)	40	80	80	40	81	40	120	80	80	80	40
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
G6P-1 (N)	1	80	80	40	120	40	120	80	80	80	40
1	.000	.000	.025	.013	.000	.000	.000	.000	.000	.106	.000
2	1.000	1.000	.962	.975	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.894	1.000
3	.000	.000	.013	.013	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
6PD-2 (N)	120	80	40	40	120	40	120	41	80	120	40
1	.004	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.024	.000	.000	.025
2	.996	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.976	1.000	.996	.975
3	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.004	.000
NDH-1 (N)	80	40	120	40	120	40	120	80	80	120	40
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
NDH-2 (N)	80	40	120	40	120	40	120	80	80	120	40
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ที่มา: Changtragoon and Szmidt, 1999

ตารางที่ 5.1.5 ความผันแปรทางพันธุกรรมที่ไอโซเอนไซม์ยีน 14 ตำแหน่งในทุกแหล่ง (ประชากร) ของไม้สัก (*Tectona grandis*) (Standard errors in parentheses)

ประชากร (Population)	ค่าเฉลี่ยของขนาดตัวอย่างต่อตำแหน่ง	ค่าเฉลี่ยของจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง	% ของตำแหน่ง polymorphic*	ค่าเฉลี่ยของ Heterozygosity		Theta P
				Directcount	HdyWbg expected**	
1. อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	91.5 (10.6)	1.1 (0.1)	7.1	0.007	0.007	
2. อฮอด จ.เชียงใหม่	97.1 (8.1)	1.2 (0.1)	7.1	0.039	0.037	
3. หมู่บ้านบ้านใหม่ แม่ทะ จ.ลำปาง	105.7 (6.8)	1.3 (0.2)	7.1	0.015	0.014	
4. อ.ลำพูน จ.ลำปาง	40.0 (0.0)	1.1 (0.1)	0.0	0.004	0.004	
5. ดอยประดิษฐ์ จ.ลำปาง	105.9 (8.9)	1.4 (0.1)	7.1	0.016	0.017	
6. อ.แม่สร้อย จ.มุกดาหาร	40.0 (0.0)	1.4 (0.2)	28.6	0.141	0.121	
7. หมู่บ้านแม่สะลม อ.ไพร่ไทย จ.กาญจนบุรี	120.0 (0.0)	1.1 (0.1)	7.1	0.017	0.020	
8. หมู่บ้านวังน่าน อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	77.2 (2.8)	1.3 (0.2)	7.1	0.031	0.040	
9. สวนรุกขชาติโป่งสราญ จ.เชียงราย	80.0 (0.0)	1.3 (0.1)	28.6	0.069	0.085	
10. ด.ส.เอียบ อ.สอง จ.แพร่	105.7 (5.3)	1.4 (0.1)	21.4	0.068	0.069	
11. อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	40.0 (0.0)	1.1 (0.1)	7.1	0.011	0.010	0.028

* A locus is considered polymorphic if the frequency of the most common allele does not exceed 95

** Unbiased estimate (Nei, 1978)

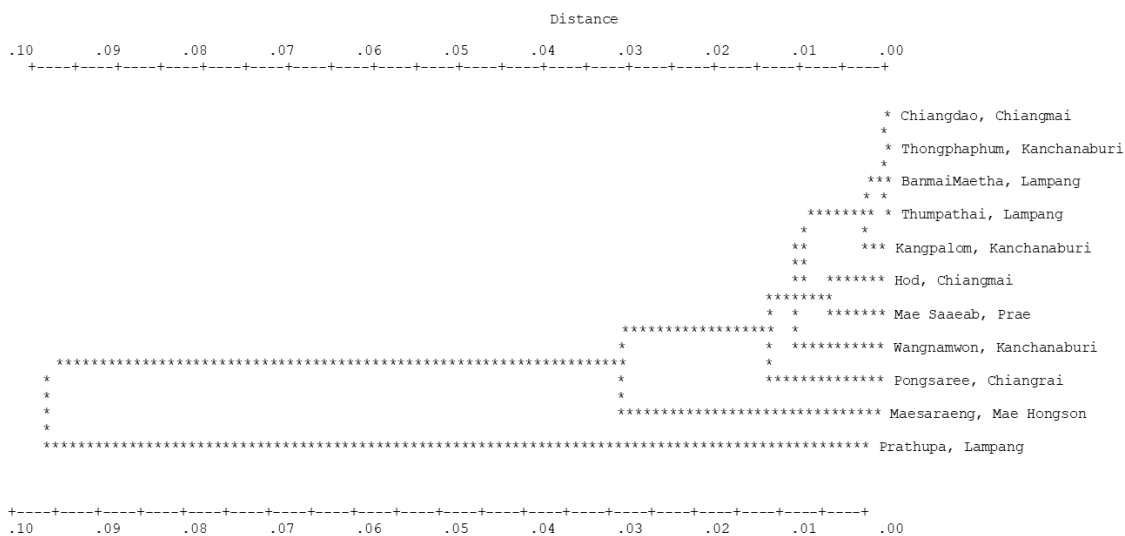
ที่มา: Changtragoon and Szmidt, 1999

อย่างไรก็ตามการศึกษาค้างนี้พบว่าได้ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของไม้สักในระดับหนึ่ง และเป็นที่น่าสนใจเกี่ยวกับไม้สักที่อยู่ทางเหนือสุด เช่น จังหวัดแม่ฮ่องสอนและจังหวัดเชียงราย มีเปอร์เซ็นต์ของ Polymorphic loci ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไม้สักในท้องที่จังหวัดที่ระดับความสูงทางภูมิศาสตร์ต่ำ ซึ่งจะต้องรอข้อมูลการศึกษาในระดับ DNA ว่ามีความสอดคล้องกันหรือไม่ ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อถัดไป ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการวางแผนการอนุรักษ์พันธุกรรมของไม้สักของประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป นอกจากนี้ Changtragoon and Szmidt (1999) และ Changtragoon (2005) ได้ศึกษาอัตราการผสมข้ามในสักพบว่าอัตราการผสมข้ามของไม้สักอยู่ระหว่าง 0.87 - 0.99 ดังแสดงในตารางที่ 5.1.7 ซึ่งแตกต่างตามแหล่ง (ประชากร) แม้ว่าจะมีอัตราการผสมข้ามค่อนข้างสูงแต่ก็มีพบว่าบางต้นอัตราการผสมตัวเองสูงเช่นกัน (Changtragoon and Szmidt, 1999)

ตารางที่ 5.1.6 Matrix of Nei (1978) unbiased genetic distance coefficients ที่ตำแหน่งไอโซเอนไซม์

ประชากร (Population)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	*****										
2. อ.ฮอด จ.เชียงใหม่	0.009	*****									
3. หมู่บ้านบ้านใหม่ อ.แม่ทะ จ.ลำปาง	0.000	0.008	*****								
4. อ.งิ้วไทย จ.ลำปาง	0.000	0.011	0.000	*****							
5. ดอยประตุม้า จ.ลำปาง	0.096	0.107	0.094	0.095	*****						
6. อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน	0.034	0.027	0.034	0.037	0.055	*****					
7. หมู่บ้านแก่ง ปะลอม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	0.002	0.013	0.002	0.001	0.099	0.031	*****				
8. หมู่บ้านวังน้ำวน อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	0.010	0.021	0.010	0.010	0.104	0.027	0.004	*****			
9. สวนรุกขชาติ โป่งสลิ จ.เชียงราย	0.015	0.012	0.014	0.016	0.116	0.028	0.013	0.015	*****		
10. ต.สะเอียบ อ.สอง จ.แพร่	0.007	0.006	0.007	0.009	0.098	0.022	0.006	0.007	0.009	*****	
11. อ.ทองภามูมิ จ.กาญจนบุรี	0.000	0.009	0.000	0.000	0.092	0.033	0.002	0.010	0.015	0.007	*****

ที่มา: Changtragoon and Szmidt, 1999



ภาพที่ 5.1.1 การวิเคราะห์ Cluster analysis โดยใช้ unweighted pair group method coefficient used: Nei (1978) unbiased genetic (ที่มา: Changtragoon and Szmidt, 1999)

ตารางที่ 5.1.7 การประเมินอัตราการผสมข้ามของไม้สัก (*Tectona grandis*)

ประชากร (Population)	อัตราการผสมข้าม (Outcrossing rate)
1. สวนรุกขชาติโป่งสไล จ.เชียงราย Pongsaree, Chaingrai	0.963 ±0.070
2. ต.สะเอียบ อ.สอง จ.แพร่ Mae Saeab, Prae	0.995±0.026
3. อ. ฮอด จ.เชียงใหม่ Hod, Chiangmai	0.939±0.034
4. หมู่บ้านบ้านใหม่ อ.แม่ทะ จ.ลำปาง Banmai Maetha, Lampang	0.922±0.084
5. ดอยประตู่ผา จ.ลำปาง Prathupa, Lampang	0.889±0.019
6. อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน Maesaraeng, Mae Hongson	0.884±0.059
7. หมู่บ้านแก่งปะลอม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี Kangpalom, Kanchanaburi	0.877±0.114
8. หมู่บ้านวังน้ำวน อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี Wangnamwon, Kanchanaburi	0.917±0.085

ที่มา: Changtragoon and Szmidt, 1999

5.2 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้สักในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมาย

อาเอพีดี (Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD))

คำนำ

ไม้สัก (*Tectona grandis* Linn. F.) เป็นไม้ผลัดใบในป่าเขตร้อน กระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในประเทศอินเดีย พม่า ไทย ลาว และอินโดนีเซีย (ยังไม่แน่ชัดนักว่าเป็นป่าธรรมชาติ) (Kaosa-ard, 1991; White, 1991) ซึ่งไม้สักในประเทศไทยมีการกระจายพันธุ์ไปทางภาคเหนือและภาคกลางในจังหวัด กาญจนบุรี ไม้สักถือว่าเป็นแหล่งของไม้ที่นำมาใช้ประโยชน์ใช้สอยที่ดีที่สุดในโลกชนิดหนึ่ง ซึ่งความต้องการที่สูงทำให้ไม้สักถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างมากทั้งถูกกฎหมายและผิดกฎหมาย ทำให้จำนวนของไม้สักในป่าธรรมชาติลดลงไปมาก ดังนั้นการจัดการแหล่งพันธุกรรมของไม้สักที่เหลืออยู่ จึงจำเป็นที่จะต้องทราบพื้นฐานทางพันธุกรรมของไม้สักของประเทศไทยว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอย่างไรในแต่ละแหล่ง (ประชากร) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers มาใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้สักในประเทศไทยเพิ่มเติมจากที่เคยศึกษาโดยใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์มาก่อนหน้านี้ (Changtragoon and Szmidt 2000)

วัสดุและวิธีการศึกษาวิจัย

Changtragoon and Szmidt (2000) ได้เก็บกิ่งของไม้สักจำนวน 18 - 45 ต้นต่อแหล่ง (Population) จาก 15 แหล่ง (ประชากร) ในท้องที่ทางภาคเหนือและภาคกลางของประเทศ (ตารางที่ 5.2.1) เพื่อนำมาปักชำเพื่อให้แตกตาและใบอ่อน

ตารางที่ 5.2.1 ชื่อของแหล่ง (ประชากร) ไม้สัก (*Tectona grandis*) ที่ศึกษา

หมายเลขประชากร (Population no.)	ชื่อแหล่ง(ประชากร) (Population name)	จังหวัด (Province)
1	สวนรุกขชาติโป่งสลิ อ.เมือง	เชียงราย
2	อุทยานแห่งชาติแม่ยม	แพร่
3	อ.เชียงดาว	เชียงใหม่
4	อ.ฮอด	เชียงใหม่
5	หมู่บ้านบ้านใหม่ อ.แม่ทะ	ลำปาง
6	อุทยานแห่งชาติถ้ำผาไทย	ลำปาง
7	ดอยประตู่ผา อ.งาว	ลำปาง
8	อ.แม่สะเรียง	แม่ฮ่องสอน
9	อุทยานแห่งชาติลานสาง 1อ.เมือง	ตาก
10	อุทยานแห่งชาติลานสาง 2 อ.เมือง	ตาก
11	อุทยานแห่งชาติแม่เมย 1	ตาก
12	อ. น้ำปาด	อุตรดิตถ์
13	อ.เทพนิมิต	อุตรดิตถ์
14	หมู่บ้านแก่งปะลอม อ.ไทรโยค	กาญจนบุรี
15	หมู่บ้านวังน้ำวน อ.ไทรโยค	กาญจนบุรี

ที่มา: Changtragoon and Szmidt, 2000

การสกัด DNA

Total DNA ของไม้สักได้ถูกสกัดจากใบอ่อนของไม้สักแต่ละต้นโดยใช้ CTAB Buffer ซึ่งขั้นตอนการสกัดได้ดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1990) และ Changtragoon *et al.* (1996b) ซึ่ง DNA ที่สกัดได้ได้นำมาละลายและเก็บรักษาใน TE buffer 0.1 mM EDTA

การวิเคราะห์เครื่องหมายอาเอพีดี (RAPD markers)

ในการศึกษาเครื่องหมายอาเอพีดี (RAPD) ในไม้สักได้เตรียมปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน DNA โดยสูตรดังนี้ : ได้ใช้ 25 - 50 ng Template DNA, 0.3 uM Per random primer, 150 uM dNTPs, 1x reaction buffer, 0.5 U Tag DNA Polymerase (Quigen) โดยเตรียมในปริมาตร 25 ul (Changtragoon *et al.*, 1996b; Lu *et al.*, 1995)

การเพิ่มจำนวน DNA (Amplification) ได้ใช้เครื่อง Thermocycler PTC 100 (MJ Research) โดยการตั้งเวลา, อุณหภูมิ, จำนวนรอบที่จะเพิ่มจำนวน DNA แบบอัตโนมัติ Primer ที่ใช้ได้คัดเลือก 20 Primers จาก 220 Primers จาก Operon Technologies (Alameda, CA, USA) เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ หลังจากที่ได้ Amplification products แล้ว นำ DNA ที่ถูกเพิ่มจำนวนโดยสูตรมาวิ่งในกระแสไฟฟ้า 80 V ด้วยเครื่อง Submarine electrophoresis ที่มี 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel แช่ใน 0.5 x TBE Buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที โดยมี 1 Kb ladder (BRL) เป็น DNA standard รูปแบบของ DNA สามารถมองเห็นได้ภายใต้แสง UV และถ่ายภาพและบันทึกภาพลงวิธีโอและ computer (Changtragoon and Szmidt, 2000)

การคำนวณทางสถิติ

สำหรับ Dominant markers เช่น RAPD Changtragoon and Szmidt (2000) ไม่สามารถคำนวณค่าความถี่ของยีน (Allele frequencies) ได้โดยตรง ดังนั้นการคำนวณค่าความถี่ของยีนจะสามารถทำได้โดยใช้วิธี Taylor expansion (Lynch and Milligan, 1994) ตำแหน่งของ RAPD ที่ถือว่าเป็น Polymorphic เมื่อความถี่ของยีนที่พบทั่วไปมากที่สุดไม่เกิน 95 เปอร์เซ็นต์ ของความถี่ของยีนที่พบทั้งหมดในแต่ละตำแหน่ง วิธีการประเมินความถี่ของ Dominant markers ในเนื้อเยื่อที่มีโครโมโซม 2 ชุดนั้นได้สันนิษฐานว่าแหล่ง (ประชากร) ที่ใช้ในการศึกษาอยู่ภายใต้ Hardy - Weinberg equilibrium (HWE) การประเมินค่า Gene diversity ได้ใช้การคำนวณของ Nei (1978) ส่วนการคำนวณ Genetic variation ภายในและระหว่างแหล่ง (ประชากร) ได้การวิเคราะห์โดยวิธีของ Weir and Cockerham (1984) และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่ของยีนได้ใช้วิธีการของ Fisher's exact test (Raymond and Rousset, 1995) การคำนวณดังกล่าวข้างต้นได้ใช้ TFGPA computer program (Miller, 1997)

ผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์

จากการศึกษา RAPD ในไม้ป่าชนิดต่างๆ Changtragoon and Szmidt (2000) พบว่าจำนวนของ Polymorphic loci ค่อนข้างสูง (Isabel *et al.*, 1995) ซึ่งการศึกษาดังนี้ก็สอดคล้องกับการศึกษาข้างต้น ในการศึกษาครั้งนี้เราสามารถได้ 20 Primers ในการวินิจฉัย 51 Putative RAPD Loci ในไม้ป่า RAPD จะมีระดับของ Polymorphism พอๆ กันหรือมากกว่า Markers ชนิดอื่น (Chong *et al.*, 1994; Isabel *et al.*, 1995; Liu and Furnier, 1993; Szmidt *et al.*, 1996b) ในการวัดค่า Genetic variability โดยใช้ RAPD ในการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาข้างต้น สัดส่วนของ Polymorphic loci ที่ได้จากการศึกษาดังนี้ที่ 0.95 Criterion พบว่ามี

ค่าตั้งแต่ 27.4 เปอร์เซ็นต์ - 92.2 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 5.2.2 ส่วนค่าของ Gene diversity ก็มีค่าสูงเช่นกัน คือมีค่าตั้งแต่ 0.110 - 0.373 ในทางตรงกันข้ามพบว่าระดับของ Polymorphism ใน Allozyme จากตัวอย่างของแหล่ง (ประชากร) ที่ศึกษาในชุดเดียวกันมีค่าต่ำกว่ามาก (Changtragoon and Szmidt, 1997; Changtragoon and Szmidt, 1999) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าสามารถศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจาก RAPD ใน genome ของไม้สักได้ทั่วถึงมากกว่า Allozyme ซึ่งจำกัดอยู่เฉพาะยีนที่ Code proteins เท่านั้น ส่วนความแตกต่างทางพันธุกรรมของไม้สักแต่ละแหล่ง (ประชากร) ในการศึกษาครั้งนี้มีค่า 21 เปอร์เซ็นต์ (Theta $p = 0.21$)

ในการศึกษา genetic variation ในไม้สักในอดีตได้มีการศึกษาใน Allozyme เท่านั้น (Kertardikara and Prat 1995; Kjaer and Seigismund, 1996; Kjaer *et al.*, 1996; Kjaer and Suangtho, 1995) ซึ่ง Kjaer *et al.* (1996) ได้ศึกษา Genetic variation ในไม้สักในเอเชีย ซึ่งพบว่ามีค่าความแตกต่างระหว่างแหล่ง (ประชากร) น้อยกว่าการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม Kertardikara and Prat (1995) ได้ศึกษาไม้สักในประเทศไทย อินเดีย และอินโดนีเซีย ซึ่งพบว่ามีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งสูงกว่าของ Kjaer *et al.* (1996) แต่ก็ยังน้อยกว่าการศึกษาครั้งนี้จากการศึกษาครั้งนี้ได้ชี้ให้เห็นว่าประชากรชาติของไม้สักมีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ซึ่งสามารถที่จะนำมาประกอบการวางแผนและจัดการแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการจัดการป่าไม้สักอย่างยั่งยืนต่อไป (Changtragoon and Szmidt, 2000)

ตารางที่ 5.2.2 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในแหล่ง (ประชากร) ของไม้สัก (*Tectona grandis*)

หมายเลขแหล่ง (ประชากร) (Population no.)	ชื่อแหล่ง (ประชากร) (Population name)	ค่าเฉลี่ยของขนาด ตัวอย่าง (Average sample size)	ค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง ตำแหน่งที่มีความผันแปร ทางพันธุกรรม (%) (Polymorphic loci in %)	ความหลากหลาย ทางพันธุกรรม Expected (Heterozygosity)
1	สวนรุกขชาติโป่งสาส์ อ.เมือง จ.เชียงราย	45	58.8	0.205
2	อุทยานแห่งชาติแม่ยม จ.แพร่	41	82.4	0.343
3	อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	20	78.4	0.335
4	อ.ฮอด จ.เชียงใหม่	33	82.4	0.367
5	หมู่บ้านบ้านใหม่ อ.แม่ทะ จ.ลำปาง	20	80.4	0.373
6	อุทยานแห่งชาติถ้ำผาไทย จ.ลำปาง	18	68.6	0.334
7	ดอยประตู่ผา อ.งาว จ.ลำปาง	34	84.3	0.345
8	อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน	30	84.3	0.365
9	อุทยานแห่งชาติลานสาง 1 อ.เมือง จ.ตาก	30	80.4	0.347
10	อุทยานแห่งชาติลานสาง 2 อ.เมือง จ.ตาก	20	62.8	0.278
11	อุทยานแห่งชาติแม่เมย 1 จ.ตาก	21	82.4	0.353
12	อ.น้ำปาด จ.อุตรดิตถ์	18	50.9	0.226
13	อ.เทพนิมิต จ.อุตรดิตถ์	30	92.2	0.371
14	หมู่บ้านแก่งปะลอม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	20	27.4	0.110
15	หมู่บ้านวังน่าน อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	22	72.6	0.297
ค่าเฉลี่ย		27	72.5	0.309

ที่มา: Changtragoon and Szmidt, 2000

ข้อเสนอแนะในการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้สัก

จากพื้นฐานข้อมูลการศึกษาวิจัยดังกล่าวข้างต้นโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RAPD ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าการใช้ไอโซเอนไซม์ยีนศึกษานั้น จะเห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้สักมีค่อนข้างสูง และความแตกต่างระหว่างแหล่งก็มีค่อนข้างสูงเช่นกัน ดังนั้นควรคัดเลือกสนับสนุนให้อุทยานแห่งชาติและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าที่เป็นพื้นที่อนุรักษ์ และมีไม้สักขึ้นอยู่ตามธรรมชาติอยู่แล้วทุกแห่งเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมในถิ่นกำเนิดของไม้สัก จากผลการศึกษาดังกล่าว นั้นจะเห็นว่าไม้สักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ซึ่งมีสถานภาพเป็นแหล่งทรัพยากรทางพันธุกรรมของไม้สักของประเทศไทยที่หลากหลาย ดังนั้นควรที่จะมีอย่างน้อย 1 แหล่ง (ประชากร) ในแต่ละจังหวัดที่เป็นพื้นที่อนุรักษ์อยู่แล้ว ให้เป็นแหล่งอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิด โดยเฉพาะภาคเหนือ อย่างไรก็ตามจังหวัดลำปางที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงจึงควรเลือกรวบรวมมากกว่า 1 แหล่ง (ประชากร) เช่น อุทยานแห่งชาติถ้ำผาไท จังหวัดลำปาง และอีกแหล่งที่อยู่นอกพื้นที่อนุรักษ์ แต่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด คือ หมู่บ้านบ้านใหม่ อำเภอแม่ทะ จังหวัดลำปางและจังหวัดอื่นๆ เช่น อำเภอเทพนิมิต จังหวัดอุดรดิตถ์ อุทยานแห่งชาติลานสาง จังหวัดตาก อำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่ อุทยานแห่งชาติแม่ยม จังหวัดแพร่ และอำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน ในกรณีของอุทยานแห่งชาติแม่ยม จังหวัดแพร่ นั้น สมควรที่จะเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมในถิ่นกำเนิดของไม้สักในประเทศไทยด้วย ถ้าจะมีการพิจารณาสร้างเขื่อนบริเวณดังกล่าวก็ควรไต่รตรงให้รอบคอบ หากเป็นนโยบายของประเทศ ที่ให้ดำเนินและหลีกเลี่ยงไม่ได้ ก็ควรเก็บเมล็ดและท่อนพันธุ์จากพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่ยม โดยควรเก็บอย่างน้อย 100 ต้นขึ้นไป ที่สามารถเป็นตัวแทนฐานพันธุกรรมของแหล่ง (ประชากร) ดังกล่าวได้ และนำมาอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดโดยปลูกทั้งแบบธนาคารยีน (Gene bank) และเพาะกล้าไม้แบบแยกต้น (Families) ก่อนการคัดเลือกต้นกล้าที่เป็นตัวแทนของแต่ละต้นเพื่อเป็นตัวแทนของแหล่งดังกล่าวในที่ที่เหมาะสมและปลอดภัยต่อการถูกคุกคาม

อย่างไรก็ตามหากแหล่งใดเสื่อมโทรมต่อการบุกรุกทำลายป่าก็สมควรที่จะนำมาอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดด้วย จากพื้นฐานข้อมูลการประเมินอัตราการผสมข้ามที่พบในไม้สัก พบว่ามีอัตราการผสมข้ามสูง แต่ก็ยังมีบางต้นที่มีอัตราการผสมตัวเองสูงเช่นกัน ดังนั้นในการเก็บเมล็ดไม้สักเพื่อนำมาปลูกเพื่อการอนุรักษ์ควรเก็บแบบแยกต้นและแยกแหล่ง (ประชากร) และควรระบุปีที่เก็บด้วย เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกเมล็ดก่อนการปลูกนอกถิ่นกำเนิดเพราะเมล็ดที่มีอัตราการผสมตัวเองหรือในหมู่เครือญาติจะทำให้โอกาสการรอดตายมีต่ำและมีความต้านทานต่อโรคและแมลงต่ำกว่าเมล็ดไม้ที่มีอัตราการผสมข้ามสูง และควรคัดเลือกเมล็ดไม้ที่มีอัตราการผสมข้ามสูงเท่านั้นไปปลูกเป็นแหล่งพันธุกรรมของไม้สักของแหล่ง (ประชากร) นั้นๆ (Changtragoon and Szmidt, 1999; Changtragoon, 2001a) ส่วนในไม้สักที่อยู่นอกพื้นที่อนุรักษ์ เช่น หมู่บ้านแก่งประหลอม และหมู่บ้านวังน้ำวน จังหวัดกาญจนบุรี ที่อยู่นอกพื้นที่อนุรักษ์ มีอยู่ปะปนกับชุมชน หมู่บ้าน และยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าที่อื่น ควรเก็บเมล็ดและท่อนพันธุ์ที่เป็นตัวแทนของแหล่งดังกล่าวแหล่ง (ประชากร) ของจังหวัดกาญจนบุรีมาปลูกเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมนอกถิ่นกำเนิดที่สามารถดูแลได้ง่าย และปลอดภัยต่อการบุกรุกทำลาย (Changtragoon and Szmidt, 2000)

บทที่ 6

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ยางนา (*Dipterocarpus alatus*)

6.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ยางนาในป่าธรรมชาติเทียบกับป่าปลูกโดยใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์

คำนำ

ไม้ยางนา (*Dipterocarpus alatus*) เป็นพันธุ์ไม้ที่ชอบขึ้นเป็นกลุ่มตามที่ราบชายลำธารในป่าดิบทั่วไป ที่สูงจากระดับน้ำทะเลปานกลางเฉลี่ย 200-600 เมตร มีลักษณะการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวาง ตั้งแต่ประเทศบังคลาเทศตอนใต้ของพม่า ไทย ลาว กัมพูชา และเวียดนาม สำหรับการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยนั้น ไม้ยางนาสามารถขึ้นอยู่ทุกภาคของประเทศ ได้แก่ ภาคเหนือในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงใหม่ ลำพูน และกระจายกระจายทั่วไปในป่าสองข้างถนนสายลำพูน - ตาก- กำแพงเพชร และจากกำแพงเพชร - นครสวรรค์ ยางนาสามารถกระจายอยู่ทั้งสองฝั่งถนน และมีมากในจังหวัดนครสวรรค์และอุทัยธานี ปัจจุบันนี้มีปริมาณลดน้อยลงอย่างมากเนื่องมาจากการจัดสรรที่ดิน ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบทั่วไปในจังหวัดเลย ขอนแก่น และนครราชสีมา ในภาคกลางขึ้นอยู่ทั่วไปแถบจังหวัดสระบุรีและกาญจนบุรี ในภาคตะวันออกสามารถขึ้นอยู่ได้ในพื้นที่จังหวัดปราจีนบุรี ชลบุรี จันทบุรี และตราด ในภาคใต้พบที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และตรัง (อิติ และคณะ, 2536)

อย่างไรก็ตามข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของไม้ยางนาในประเทศไทยยังไม่มีมาก่อน ดังนั้นการศึกษารังนี้ สุจิตรา และบุญชู (2542) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ยางนาในเบื้องต้น โดยใช้ Isoenzyme gene markers เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการวางแผนการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ ไม้ยางนาของประเทศไทยในอนาคตต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษาวิจัย

สุจิตราและบุญชู (2542) ได้เก็บเมล็ดไม้ยางนาจาก 4 แหล่งในประเทศไทย โดยมีจากป่าธรรมชาติ 2 แหล่ง คือจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดศรีสะเกษ ส่วนป่าปลูกจากจังหวัดกำแพงเพชรและจังหวัดตรัง ดังแสดงในตารางที่ 6.1.1 ได้ถูกเก็บมาศึกษา โดยนำเอา Embryo หรือ ใบอ่อนจากกล้าไม้ที่เพาะจากเมล็ดของแต่ละแหล่งมาสกัด Crude enzyme เพื่อศึกษา Isoenzyme 13 Systems ดังแสดงในตารางที่ 6.1.2 โดยวิธี Horizontal starch gel electrophoresis ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Changtragoon and Finkeldey (1995b) และ Changtragoon *et al.* (1996a) เมื่อได้ข้อมูลทางพันธุกรรมของไม้ยางนาแต่ละแหล่งจาก Isoenzyme gene แต่ละตำแหน่งแล้วจึงนำมาคำนวณหาความถี่ของยีน (Allelic frequency), ความแตกต่างและหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic differentiation and diversity) โดยวิธีการของ Nei (1978) และ BIOSYS-1 Computer program ของ Swofford and Selander (1981)

ตารางที่ 6.1.1 ชื่อแหล่ง (ประชากร) ที่ศึกษา

จำนวนประชากร (Population no.)	ชื่อประชากร(แหล่ง) (Population name)	จำนวนเมล็ดเพาะกล้าไม้และ จำนวนตัวอย่างกล้าไม้ (Investigated seed and seedlings)
1	จ. ประจวบคีรีขันธ์ (ป่าธรรมชาติ)	40
2	จ. ศรีสะเกษ (ป่าธรรมชาติ)	40
3	จ. กำแพงเพชร (ป่าปลูก)	18
4	จ. ตรัง (ป่าปลูก)	39

ที่มา: สุจิตราและบุญชู, 2542

ตารางที่ 6.1.2 รายชื่อของระบบไอโซเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษา

ระบบของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme system)	อักษรย่อ (Abbreviation)	รหัสของเอนไซม์ (Enzyme code)
1. Leucine aminopeptidase	LAP	3.4.11.1
2. Glutamate-oxaloacetate transaminase	GOT	2.6.1.1
3. Glutamate dehydrogenase	GDH	1.4.1.3
4. Isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.42
5. 6-Phosphogluconate dehydrogenase	6-PGDH	1.1.1.44
6. Phosphoglucomutase	PGM	2.7.5.1
7. Malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37
8. Glucose 6-phosphate dehydrogenase	G-6PDH	1.1.1.49
9. Diaphorase	DIA	1.1.4.3
10. Formate dehydrogenase	FDH	1.6.99.3
11. Shikimate dehydrogenase	SKDH	1.1.1.25
12. NDH-dehydrogenase	NDH	1.6.99.1
13. Phosphoglucose-isomerase	PGI	5.3.1.9

ที่มา: สุจิตราและบุญชู, 2542

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้สุจิตรา และบุญชูบ (2542) พบว่าสามารถวินิจฉัย Isoenzyme gene ได้ 8 ตำแหน่ง และหาความถี่ของยีนแต่ละตำแหน่งจากไม้ยางนาทั้ง 4 แหล่ง โดยแสดงในตารางที่ 6.1.3 ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่าไม้ยางนาจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มีจำนวนของ Alleles ต่อตำแหน่งของ Gene สูงที่สุด คือมี 3.3 Alleles ส่วนไม้ยางนาที่จังหวัดตรังมีจำนวน Alleles ต่อตำแหน่งของ Gene ต่ำที่สุดคือมี 2.1 Alleles ส่วนค่า Percentage of polymorphic loci จาก Isoenzyme gene 8 ตำแหน่ง มีค่าสูงสุดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์คือมีค่า 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าต่ำสุดที่จังหวัดตรัง คือมีค่า 62.5 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 6.1.4 สำหรับค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง Genetic differentiation among populations (F_{st}) ของไม้ยางนาทั้ง 4 แหล่ง พบว่ามีค่า 0.182 หรือประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง (Genetic distance) โดยการเปรียบเทียบแหล่ง แต่ละแหล่งได้แสดงในตารางที่ 6.1.5 และภาพที่ 6.1.1 ซึ่งพบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของไม้ยางนาในจังหวัดตรังจากจังหวัดอื่นมีมาก ในขณะที่ความแตกต่างทางพันธุกรรมของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จังหวัดศรีสะเกษ และจังหวัดกำแพงเพชรมีไม่มากนัก

การที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ยางนาที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มีมากที่สุดรองลงมาคือจังหวัดศรีสะเกษและจังหวัดกำแพงเพชร และจังหวัดตรังมีน้อยลงตามลำดับ อาจเนื่องมาจากไม้ยางนาที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดศรีสะเกษเป็นป่าธรรมชาติ จึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าป่าในจังหวัดกำแพงเพชร และจังหวัดตรัง ซึ่งเป็นป่าปลูก ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นเป็นเบื้องต้นว่า การรักษาสภาพป่าไม้ยางนาให้คงอยู่ตามธรรมชาติในลักษณะ *In situ* gene conservation จะเป็นการช่วยรักษาความหลากหลายทาง พันธุกรรมเอาไว้ หากจะนำมาปลูกเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์จะต้องมีการจัดการในการเก็บเมล็ดไม้ที่นำมาปลูกให้คงความหลากหลายทางพันธุกรรมให้มากที่สุดเท่าที่จะมากได้

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังนับว่ายังเป็นการศึกษาเบื้องต้น ในอนาคตควรที่จะมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไม้ยางนาให้ทั่วประเทศเพื่อเป็นฐานข้อมูลที่จะวางแผนการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์ไม้ยางนาได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพต่อไป ดังที่ได้มีการศึกษามาแล้วในไม้สนสองใบ (Changtragoon and Finkeldey, 1995a; Changtragoon and Finkeldey, 1995b; Changtragoon and Finkeldey, 2000; Szmidt *et al.*, 1996a) และกำลังจะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการจัดการอนุรักษ์พันธุกรรมของไม้ดังกล่าว (สุจิตราและบุญชูบ, 2542)

ตารางที่ 6.1.3 ความถี่ของอัลลีลใน 4 ประชากรของยางนา (*Dipterocarpus alatus*)

Locus	Population			
	1	2	3	4
GOT-A				
(N)	40	40	18	39
1	.100	.087	.083	.000
2	.863	.887	.917	1.000
3	.038	.025	.000	.000
PGM-A				
(N)	40	40	18	39
1	.038	.038	.000	.000
2	.363	.313	.500	1.000
3	.587	.650	.500	.000
4	.013	.000	.000	.000
MDH-A				
(N)	40	40	18	39
1	.025	.013	.028	.000
2	.475	.475	.472	.500
3	.013	.063	.056	.141
4	.488	.438	.444	.359
5	.000	.013	.000	.000
SKDH-A				
(N)	40	40	18	39
1	.038	.038	.028	.295
2	.950	.962	.917	.705
3	.013	.000	.056	.000
IDH-A				
(N)	40	40	18	39
1	.013	.063	.000	.077
2	.488	.438	.500	.423
3	.500	.500	.500	.500
FDH-A				
(N)	40	40	18	39
1	.050	.000	.000	.000
2	.950	.925	1.000	1.000
3	.000	.075	.000	.000
6-PGDH-A				
(N)	40	40	18	39
1	.013	.000	.000	.077
2	.900	.988	1.000	.333
3	.087	.013	.000	.538
4	.000	.000	.000	.051
NDH-A				
(N)	40	40	18	39
1	.013	.000	.000	.179
2	.313	.050	.139	.821
3	.637	.825	.722	.000
4	.038	.125	.139	.000

ตารางที่ 6.1.4 ความผันแปรทางพันธุกรรมของไม้ยางนา (*Dipterocarpus alatus*) ที่ไอโซเอนไซม์ยีน 8 ตำแหน่ง (Standard errors in parentheses)

ประชากร	ค่าเฉลี่ยของขนาดตัวอย่างต่อตำแหน่ง	ค่าเฉลี่ยของจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง	% ของตำแหน่ง polymorphic*	ค่าเฉลี่ยของ Heterozygosity	
				Directcount	HdyWbg expected**
1. จ. ประจวบคีรีขันธ์	40.0 (0.0)	3.3 (0.3)	100.0	0.466 (0.141)	0.340 (0.071)
2. จ. ศรีสะเกษ	40.0 (0.0)	2.9 (0.4)	100.0	0.400 (0.149)	0.298 (0.079)
3. จ. กำแพงเพชร	18.0 (0.0)	2.3 (0.4)	75.0	0.486 (0.162)	0.299 (0.087)
4. จ. ตรัง	39.0 (0.0)	2.1 (0.4)	62.5	0.413 (0.153)	0.312 (0.098)

* A locus is considered polymorphic if more than one allele was detected

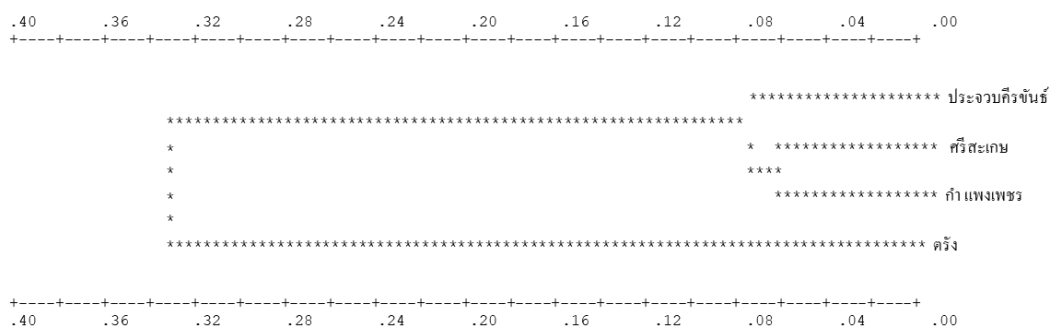
** Unbiased estimate (Nei, 1978)

ที่มา: สุจิตราและบุญชูบ, 2542

ตารางที่ 6.1.5 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไม้ยางนา (*Dipterocarpus alatus*)

ประชากร	1	2	3	4
1. จ. ประจวบคีรีขันธ์	*****			
2. จ. ศรีสะเกษ	0.008	*****		
3. จ. กำแพงเพชร	0.000	0.001	*****	
4. จ. ตรัง	0.218	0.320	0.237	*****

ที่มา: สุจิตราและบุญชูบ, 2542



ภาพที่ 6.1.1 ความแตกต่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้ยางนา (*Dipterocarpus alatus*) 4 แหล่ง (ประชากร) (ที่มา: สุจิตราและบุญชู, 2542)

6.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ยางนาในประเทศไทยโดยใช้ เครื่องหมาย

ไอโซเอนไซม์ยีน

คำนำ

ไม้ยางนาเป็นไม้ป่าเขตร้อนที่กระจายพันธุ์ตามธรรมชาติทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ซึ่งมีค่าทางเศรษฐกิจ และระบบนิเวศซึ่งได้กล่าวรายละเอียดไปในหัวข้อ 6.1 ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมครั้งนี้ Changtragoon (2001b) ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมจากหัวข้อ 6.1 โดยศึกษาในไม้ยางนา 16 แหล่ง (ประชากร) ดังตารางที่ 6.2.1 ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ของประเทศไทย โดยการใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ยีน (Isoenzyme gene markers) ซึ่งวิธีการศึกษาดำเนินการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1

ผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์

Changtragoon (2001b) พบว่าผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเฉลี่ยมีค่าระดับปานกลาง ($H_e=0.092$) เมื่อเทียบกับการศึกษาในไม้ป่าชนิดอื่น โดยแต่ละแหล่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 6.2.2 และมีความแตกต่างระหว่างแหล่ง (ประชากร) ค่อนข้างสูง ($F_{st}=0.128$) อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งนั้นมีค่าน้อยกว่าการศึกษาของสุจิตราและบุญชู (2542) ที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 6.1 ทำให้เห็นว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างป่าธรรมชาติและป่าปลูกมีสูงกว่า ($F_{st}=0.182$) ซึ่งแสดงว่าป่าธรรมชาติมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าป่าปลูก ดังนั้นการอนุรักษ์ไม้ยางนาในถิ่นกำเนิดจึงมีความสำคัญโดยเฉพาะไม้ยางนาที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ที่น่าสังเกตคือเมื่อดูผลการศึกษาในครั้งแรกในหัวข้อ 6.1 นั้น จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าในการศึกษาในครั้งนี้ ที่ได้ทำการศึกษาใน 16 แหล่ง (ประชากร) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าในการศึกษาในครั้งแรก (หัวข้อ 6.1) นั้น ส่วนใหญ่ใช้ตัวอย่างใบอ่อนจากกล้าไม้ แต่การศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้ในส่วน of ตัวอย่างที่เป็น Embryo ดังนั้นทำให้ผลการศึกษาที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ในภาพรวมต่ำกว่าการศึกษาในชุดแรก ซึ่งเป็นไปได้ว่า Embryo จากเมล็ดไม้ยางนาบางเมล็ดที่ศึกษาอาจมียืนด้อยอยู่ ซึ่งเมื่อถ้านำมาเพาะเป็นกล้าไม้อาจจะไม่ออกก็เป็นไปได้ ดังนั้นจึงมีผลให้การศึกษาครั้งนี้ ได้ค่าของความ

หลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาแรกที่ตัวอย่างเป็นกล้าไม้ ซึ่งการที่ไม่ลืตสามารถ
งอกเป็นต้นได้ย่อมมีพื้นที่หลากหลายเพียงพอให้เติบโตเป็นกล้าไม้ได้

ข้อเสนอแนะในการอนุรักษ์ไม้ยางนา

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น จึงได้ข้อมูลเป็นแนวทางได้ว่าไม้ยางนาแต่ละแหล่ง (ประชากร) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมแตกต่างกัน แม้ลักษณะภายนอกของไม้ยางนาโดยทั่วไปไม่แตกต่างกันนัก โดยมีความสูงเปลาตรง หากดูเผินๆ แล้วคิดว่าแต่ละแหล่ง (ประชากร) ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรให้ความสำคัญแหล่งพันธุกรรมของไม้ยางนาในแต่ละภูมิภาคโดยควรจัดให้มีการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิดทุกภูมิภาค และให้ความสำคัญในการอนุรักษ์แหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงและและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าค่าเฉลี่ยของไม้ยางนา จาก 16 แหล่ง (ประชากร) ที่ทำการศึกษาทั้งหมด เช่น หมู่บ้านดงฟ้าห่วน จังหวัดอุบลราชธานี ตำบลห้วยเขย่ง อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และ อำเภอลอง จังหวัดแพร่ เป็นต้น

อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความผันแปรในแต่ละตำแหน่งสูง เช่นเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซเทลไลท์ (Microsatellite markers: SSR) ในอนาคตเพื่อจะได้ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมมากขึ้น (Changtragoon, 2001b)

ตารางที่ 6.2.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างไม้ยางนา (*Dipterocarpus alatus*)

ชื่อแหล่ง (Population name)	ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (Longitude and Latitude)		ความสูงจากระดับน้ำทะเล (Altitude)
1. อ.ศรีมาศ จ.สุโขทัย	E 99° 42' 18"	N 16° 52' 24"	200
2. อ.ลอง จ.แพร่	E 99° 50'	N 18° 3'	100
3. อ.สามเงา จ.ตาก	E 99° 3'	N 17° 20' 30"	120
4. อ.โพทะเล จ.พิจิตร	E 100° 36'	N 16° 48'	26
5. อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม	E 103° 2'	N 16° 15'	144
6. วัดภูพระโกนา ต.สระคู อ.สุวรรณภูมิ จ.ร้อยเอ็ด	E 103° 50' 26"	N 15° 34'	141
7. หมู่บ้านดงฟ้าห่วน ต.ขามใหญ่ อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	E 104° 52'	N 15° 14'	113
8. พื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกกราช อ.ปักธงชัย จ.นครราชสีมา	E 101° 54'	N 14° 27' 57"	224
9. วัดจันทรังษี ต.หัวไผ่ อ.เมือง จ.อ่างทอง	E 100° 18'	N 14° 7'	6
10. ป่าเขาพระฤๅษี จ.กาญจนบุรี	E 98° 47'	N 14° 43'	100
11. ต.ห้วยเขย่ง อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	E 98° 34'	N 14° 37'	100-200
12. ต.เกาะสำโรง อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	E 99° 31'	N 13° 57'	30
13. อ.เมือง จ.ราชบุรี	E 99° 48'	N 13° 32'	56
14. อ.บางสะพานน้อย จ.ประจวบคีรีขันธ์	E 99° 33'	N 11° 12'	90
15. อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี	E 99° 16'	N 9° 23'	8
16. อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	E 100° 26' 36"	N 7° 28'	5

ที่มา: Changtragoon, 2001b

ตารางที่ 6.2.2 การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของไม้ยางนา (*Dipterocarpus alatus*) แต่ละแหล่ง (ประชากร) ในประเทศไทย

ชื่อแหล่ง (Population)	จำนวนตัวอย่าง (Sample size)	ค่าเฉลี่ยของยีนต่อตำแหน่ง (Mean no. alleles per locus)	เปอร์เซ็นต์ของตำแหน่งที่มีความผันแปร (Percentage of polymorphic loci)		ค่าเฉลี่ยความหลากหลายทาง พันธุกรรม (Mean heterozygosity)	
			ทางพันธุกรรม at criteria		Observed	Expected
			95%	99%		
1. อ.ศรีมหา จ.สุโขทัย	90	1.57	25.00	62.50	0.0597	0.0588
2. อ.ลอง จ.แพร่	40	1.50	25.00	50.00	0.1344	0.1045
3. อ.สามเงา จ.ตาก	90	1.75	25.00	50.00	0.0417	0.0402
4. อ.โพทะเล จ.พิจิตร	45	1.88	25.00	62.50	0.1694	0.1169
5. อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม	85	1.75	37.50	62.50	0.0709	0.0918
6. วัดกุฎะโกนา ต.สระคู อ.สุวรรณภูมิ จ.ร้อยเอ็ด	40	1.50	25.00	37.50	0.0513	0.0533
7. หมู่บ้านดงฟ้าห่วน ต. ขามใหญ่ อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	40	2.00	75.00	75.00	0.1750	0.1595
8. พื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกราช อ.ปักธงชัย จ.นครราชสีมา	40	1.63	25.00	50.00	0.1625	0.1044
9. วัดจันทรังสี ต.หัวไผ่ อ.เมือง จ.อ่างทอง	85	1.88	37.50	50.00	0.1483	0.1591
10. ป่าเขาพระฤๅชี จ.กาญจนบุรี	68	1.88	50.00	62.50	0.0616	0.1255
11. ต.ห้วยเขย่ง อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	85	2.00	37.50	62.50	0.0794	0.1333
12. ต.เกาะสัโรง อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	90	1.63	25.00	50.00	0.0319	0.0586
13. อ.เมือง จ.ราชบุรี	45	1.75	12.50	50.00	0.0514	0.0681
14. อ.บางสะพานน้อย จ.ประจวบคีรีขันธ์	45	1.57	12.50	37.50	0.0056	0.0267
15. อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี	45	1.57	25.00	37.50	0.0250	0.0238
16. อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	90	2.00	37.50	75.00	0.1458	0.1542
ค่าเฉลี่ย (Average)	64	1.74	31.25	54.69	0.0883	0.0924

ที่มา: Changtragoon, 2001b

บทที่ 7

การประเมินสถานภาพแหล่งพันธุกรรมของไม้โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) และโกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและไอโซเอนไซม์ยีนเพื่อเป็นแนวทางใน การอนุรักษ์และการฟื้นฟูป่า

คำนำ

เนื่องจากผลของการบุกรุกทำลายป่าในอัตราที่สูงทั้งในอดีตและในปัจจุบันได้ส่งผลให้พื้นที่ป่าชายเลนลดลงจากอดีตเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามขณะนี้ได้มีการตื่นตัวทั้งภาครัฐและเอกชนได้เห็นความสำคัญของป่าไม้และได้ร่วมมือกันช่วยในการปลูกป่าเพื่อฟื้นฟูพื้นที่ป่าชายเลนให้อยู่ในสภาพเดิมเพื่อรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าและสภาวะแวดล้อม

ในการที่จะวางแผนการปลูกป่าไม้โกงกาง (*Rhizophora* sp.) ซึ่งต้องอาศัยกำลังทั้งงบประมาณแรงงานและเวลาอย่างมาก จึงต้องมีการวางแผนอย่างรอบคอบเพื่อให้ได้ผลที่คุ้มค่า และเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้ ในที่นี้ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่า ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการช่วยประกอบการพิจารณาที่จะวางแผนการปลูกป่าให้บรรลุจุดประสงค์ ไม่ว่าจะเป็นเพื่อการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรม รักษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และการฟื้นฟูป่า เพื่อพัฒนาสิ่งแวดล้อม ซึ่งการที่จะเตรียมเมล็ดและกล้าไม้ และพื้นที่ที่จะปลูกต้องคำนึงถึงด้วยว่าเมล็ดและกล้าไม้ที่จะนำมาปลูกมาจากแหล่งไหน มีคุณภาพดีพอหรือไม่และจะสามารถมีชีวิตอยู่รอดภายใต้สภาพแวดล้อมที่ผันแปรตลอดเวลาได้หรือไม่ ตลอดจนจะให้ผลผลิตสูงตามคาดหวังไว้หรือไม่

เนื่องจากข้อมูลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้โกงกางใบเล็ก และไม้โกงกางใบใหญ่มีอยู่น้อยมาก ดังนั้นสุจิตรา (2550) จึงได้ประเมินสถานภาพแหล่งพันธุกรรมของไม้โกงกางใบเล็กและไม้โกงกางใบใหญ่ในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) และไอโซเอนไซม์ยีน (Isoenzyme gene markers) เพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณาวางแผนอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมตลอดจนการปลูกและฟื้นฟูของไม้โกงกางทั้งสองชนิดให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งรายละเอียดในการศึกษาดังกล่าวมีดังนี้

วัตถุประสงค์และวิธีการศึกษาวิจัย

สุจิตรา (2550) ได้เก็บใบของไม้โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) และไม้โกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) 11- 40 ต้นต่อแหล่ง (Population) จาก 20 และ 16 แหล่ง (ประชากร) ดังแสดงในตารางที่ 7.1 และ ตารางที่ 7.2 ตามลำดับ ในบริเวณอ่าวไทยและชายฝั่งทะเลฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามันของประเทศไทย

การสกัด DNA

สกัด DNA ของไม้โกงกางใบเล็กและไม้โกงกางใบใหญ่ โดยสกัดจากใบอ่อนของไม้โกงกาง ใบเล็ก และไม้โกงกางใบใหญ่แต่ละต้นโดยใช้ CTAB buffer ซึ่งขั้นตอนการสกัดได้ดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1990) และ Changtragoon *et al.* (1996b) ซึ่ง DNA ที่สกัดได้ ได้นำมาละลายและ เก็บรักษาใน TE buffer 0.1 mM EDTA

ตารางที่ 7.1 แหล่ง (ประชากร) และขนาดของตัวอย่างของไม้โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) ในประเทศไทย

ลำดับ (Number)	ชื่อแหล่ง (ประชากร) (Population Name)	จำนวนของตัวอย่าง (Sample size)
1	หมู่บ้านเสมชัย จ.เพชรบุรี (Samaechay, Petchaburi)	40
2	หมู่บ้านบางขุนไทร อ.บ้านแหลม จ.เพชรบุรี(Bangkunsai, Pechaburi)	17
3	เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ (Bangkuntien, Bangkok)	30
4	อำเภอกะเบนนอ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี (Kungkraben, Chantaburi)	37
5	อ. เมือง จ.ตราด (Amphoe Muang, Trat)	28
6	อ.คลองพร้าว เกาะช้าง จ.ตราด (Klong Prao, Chang Island, Trat)	27
7	หมู่บ้านสลักคอก เกาะช้าง จ.ตราด (Salak Kok, Chang Island, Trat)	25
8	อ.ขลุง จ.จันทบุรี (Klung, Chantaburi)	30
9	ต.ทุ่งคา อ.เมือง จ.ชุมพร (Thungka, Chumporn)	40
10	อ.สวี จ.ชุมพร (Sawee, Chumporn)	12
11	อ. เมือง จ.สตูล (Amphur Muang, Satoon)	19
12	อ. เมือง จ.ระนอง (Amphur Muang, Ranong)	28
13	อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี (Donsak, Suratthani)	19
14	อ.ขนอม จ.สุราษฎร์ธานี (Kanom, Suratthani)	11
15	จ.สงขลา (Songkhla)	28
16	เกาะภูเก็ต (Phuket Island)	35
17	อ.กันตัง จ.ตรัง (Kantang, Trang)	17
18	อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี (Amphur Muang, Suratthani)	30
19	ต.ท่าแดง จ.กระบี่ (Tha Dang, Krabi)	29
20	ต.ท่าพรุ จ.กระบี่ (Tha Pru, Krabi)	40
ค่าเฉลี่ย (Average)		27.1

ที่มา: สุจิตรา, 2550

ตารางที่ 7.2 แหล่ง (ประชากร) และ ขนาดของตัวอย่างของไม้โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) ในประเทศไทย

ลำดับ (Number)	ชื่อแหล่ง (ประชากร) (Population Name)	จำนวนของตัวอย่าง (Sample size)
1	หมู่บ้านแสมชัย จ.เพชรบุรี (Samaechay, Petchaburi)	20
2	หมู่บ้านบางขุนไทร อ.บ้านแหลม จ.เพชรบุรี (Bangkunsai, Pechaburi)	40
3	เขตบางขุนเทียน จ.กรุงเทพ (Bangkuntien, Bangkok)	40
4	อ. เมือง จ.ตราด (Amphoe Muang, Trat)	35
5	หมู่บ้านสลักคอก เกาะช้าง จ.ตราด (Salak Kok, Chang Island, Trat)	25
6	อ.ขลุง จ.จันทบุรี (Klung, Chantaburi)	37
7	อ. เมือง จ.สตูล (Amphur Muang, Satoon)	20
8	อ. เมือง จ.ระนอง (Amphur Muang, Ranong)	40
9	อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี (Donsak, Suratthani)	18
10	อ.ขนอม จ.สุราษฎร์ธานี (Kanom, Suratthani)	20
11	ทะเลสาบสงขลา จ.สงขลา (Songkla Lake, Songkhla)	23
12	เกาะภูเก็ต (Phuket Island)	27
13	อ.กันตัง จ.ตรัง (Kantang, Trang)	16
14	อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี (Amphur Muang, Suratthani)	17
15	อ.ละอุ่น จ.ระนอง (La Aun, Ranong)	34
16	ต.ท่าพรุ จ.กระบี่ (Tha Pru, Krabi)	10
ค่าเฉลี่ย (Average)		26.37

ที่มา: สุจิตรา, 2550

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์โดยเทคนิคเอเอฟแอลพีตามวิธีของ Vos *et al.* (1995) และแยกชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องแยกขนาดแบบ Non-denaturing polyacrylamide ด้วยเครื่อง Gel-scan 3000 (Corbett research, Australia) ที่ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ 6 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.6 X TBE buffer ที่ผสมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ผ่านกระแสไฟฟ้า 800 โวลต์ นาน 60 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 bp แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยแปรผลข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของไมโทคอนไดรียอลและไมโทคอนไดรียอลใหญ่แต่ละชนิดเปรียบเทียบจากความเหมือนและความแตกต่างของรูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และคำนวณความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ TFGPA computer program (Miller, 1998) ส่วนค่าความเหมือนทางพันธุกรรมคำนวณด้วยวิธี Simple matching (Sneath and Sokal, 1973) นำมาเข้าสู่ตาราง Matrix โดยใช้ Nei and Li (1979) Similarity index เพื่อใช้ในการจัดกลุ่มศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Unweighed Pair Group Method of Arithmetic Average (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.01e (Rohlf, 1993) และแสดงผลในรูปแบบของ Phylogenetic tree

ระบบการสืบพันธุ์ (Mating system)

การศึกษาระบบการสืบพันธุ์ได้นำใบอ่อนจากกล้าไม้ของไมโทคอนไดรียอลเล็กที่ได้จากการเพาะแบบแยกต้นที่เก็บฝักจากแต่ละแม่ไม้จำนวน 20 กล้าไม้ต่อแม่ไม้ วิเคราะห์ไอโซเอนไซม์ที่ยีนแต่ละตำแหน่ง และคำนวณทางสถิติเพื่อคำนวณหาอัตราผสมข้าม (Outcrossing rate) และอัตราผสมตัวเอง (Selfing) หรืออัตราผสมระหว่างต้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (Inbreeding rate)

สำหรับไมโทคอนไดรียอลใหญ่ได้เก็บฝักมาจากแต่ละแหล่งและเพาะกล้าไม้ไว้เช่นกันแต่ไม่สามารถวิเคราะห์ผลด้วยไอโซเอนไซม์ยีนได้ จึงไม่ได้วิเคราะห์อัตราผสมข้ามได้

ผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์

จากการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ดังแสดงในภาพที่ 7.1 และภาพที่ 7.2 ตามลำดับ ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม สุจิตรา (2550) พบว่าไม้โกงกางใบเล็กและไม้โกงกางใบใหญ่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง กล่าวคือความหลากหลายทางพันธุกรรมในไม้โกงกางใบเล็กและไม้โกงกางใบใหญ่มีค่าแต่ละแหล่งแตกต่างกันไป โดยมีค่าเฉลี่ย 0.31 และ 0.38 ตามลำดับดังรายละเอียดในตารางที่ 7.3 และตารางที่ 7.4 ตามลำดับ และความแตกต่างระหว่างแหล่งของไม้โกงกางใบเล็กและไม้โกงกางใบใหญ่มีค่า 0.25 (Theta $P = 0.25$) และ 0.21 (Theta $P = 0.21$) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามแหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำในไม้โกงกางใบเล็กและไม้โกงกางใบใหญ่เมื่อเทียบกับแหล่งอื่น คือ จากแหล่งอำเภอกลองพราวน์ เกาะช้าง และหมู่บ้านแส้มชัย จังหวัดเพชรบุรีตามลำดับ และแหล่งที่เหมาะสมต่อการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิดคือแหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เช่น แหล่งอำเภอกันตัง จังหวัดตรัง ดังรายละเอียดในตารางที่ 7.3 และตารางที่ 7.4 ตามลำดับ ส่วนแหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำควรมีการฟื้นฟูฐานพันธุกรรมโดยปลูกฟื้นฟูป่า โดยควรมีการคัดเลือกฝักจากต้นจากแหล่งเดียวกันที่มีอัตราผสมข้ามสูงโดยรวบรวมมาจากหลากหลายต้นมาปลูก

จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมข้างต้นแม้พบว่าทั้งไม้โกงกางใบเล็กและไม้โกงกางใบใหญ่ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงแต่จากค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแต่ละแหล่งของไม้โกงกางใบเล็กและไม้โกงกางใบใหญ่ดังภาพที่ 7.3 และภาพที่ 7.4 ตามลำดับ จะเห็นว่ามีบางแหล่งไม่สอดคล้องกับที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ ซึ่งอาจจะสันนิษฐานได้ว่าการปลูกป่าทดแทนจากการทำสัมปทานในอดีตอาจนำฝักไม้โกงกางจากแหล่ง (Population) อื่นที่ไม่ใช่แหล่งกำเนิดเดิมของแต่ละแหล่งมาปลูกปะปนกัน

เป็นที่น่าสังเกตว่า ในไม้โกงกางใบเล็กมีความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยต่ำกว่าไม้โกงกางใบใหญ่ เนื่องจากผลของการบุกรุกทำลายป่าและทำให้ป่าเสื่อมโทรมโดยการจัดทำโรงแรมและรีสอร์ทในบริเวณอำเภอกลองพราวน์ เกาะช้าง จังหวัดตราด เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ หมู่บ้านสลักคอก เกาะช้าง จังหวัดตราด ซึ่งอยู่ในบริเวณพื้นที่อนุรักษ์ของเกาะดังกล่าว โดยจากผลการศึกษาพบว่าการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic erosion) อย่างเด่นชัด กล่าวคือบริเวณอำเภอกลองพราวน์ เกาะช้าง จังหวัดตราด มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_e) = 0.150 ในขณะที่พื้นที่ป่าชายเลน หมู่บ้านสลักคอก เกาะช้าง จังหวัดตราด มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_e) = 0.318 ซึ่งมีความแตกต่างกันถึง 1 เท่าตัว จึงแสดงให้เห็นว่าผลของการบุกรุกทำลายป่าทำให้ป่าเสื่อมโทรมมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งในกรณีของเกาะช้างพบว่าลดลงถึง 1 เท่าตัว ดังนั้นจึงต้องมีมาตรการในการป้องกันปัญหาดังกล่าวในอนาคตอย่างเป็นรูปธรรม (สุจิตรา, 2550)

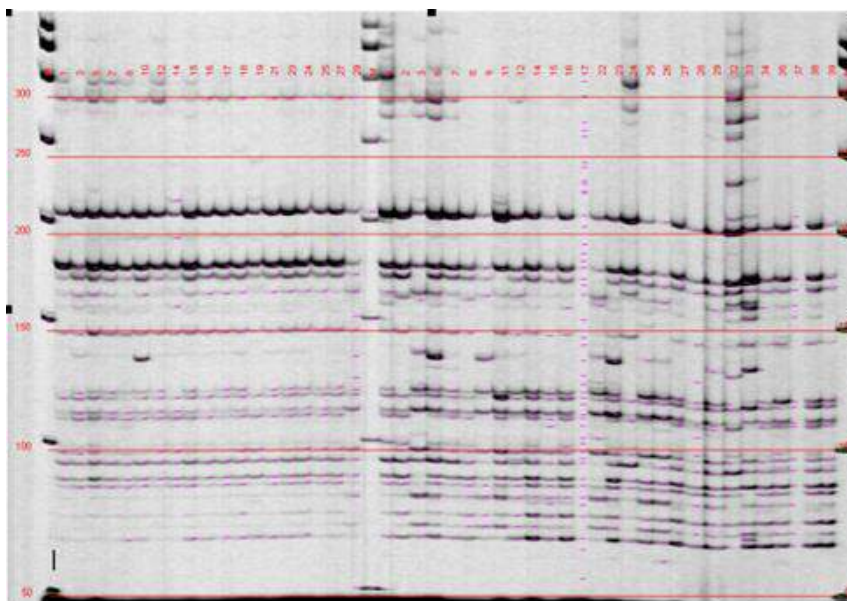
ส่วนการศึกษาระบบการสืบพันธุ์ในไม้โกงกางใบเล็กใน 3 แหล่ง พบว่ามีอัตราผสมข้ามแตกต่างกันไป กล่าวคือที่เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ มีอัตราผสมข้ามต่ำที่สุดคือมีค่า 0.24 (24 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่ามีอัตราผสมตัวเองหรือในหมู่เครือญาติ 76 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตราผสมข้ามของไม้โกงกางใบเล็กจากอำเภอลำลูก

จังหวัดจันทบุรีและอำเภอกันตัง จังหวัดตรังมีค่าสูงถึง 1.00 (100 เปอร์เซ็นต์) และ 0.97 (97 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ รายละเอียดตามตารางที่ 7.5 ซึ่งจะเห็นว่า อัตราการผสมข้ามของแหล่งที่มีการบุกรุกทำลายสูง และมีจำนวนต้นอยู่น้อยกว่า เช่น ในเขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ ส่งผลให้มีอัตราผสมตัวเองและในหมู่เครือญาติสูง ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการอยู่รอดของไม้โกงกางใบเล็กของกรุงเทพฯ ในอนาคต ส่วนกล้าไม้โกงกางใบเล็กจากอำเภอลำลูก จังหวัดจันทบุรี และอำเภอกันตัง จังหวัดตรัง เหมาะสมต่อการนำไปปลูกฟื้นฟูป่า เพราะมีอัตราผสมข้ามสูงทำให้มีโอกาสอยู่รอดและเจริญเติบโตตลอดจนสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ผันแปรในอนาคตได้ดีกว่าจากแหล่งเขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ

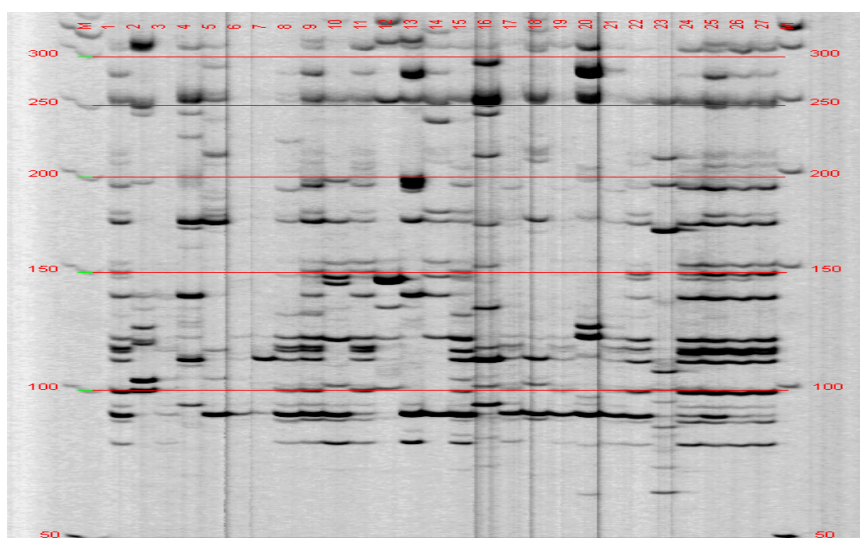
อย่างไรก็ตามแม้แต่ต้นไม้แหล่งเดียวกันอัตราการผสมข้ามของไม้โกงกางใบเล็ก แต่ละต้นก็ไม่เท่ากัน ดังตัวอย่างอัตราการผสมข้ามของไม้โกงกางใบเล็กบางต้นของอำเภอกันตัง จังหวัดตรัง มีค่าอัตราผสมข้ามตั้งแต่ 0.27 (27 เปอร์เซ็นต์) จนถึง 1.0 (100 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงในตารางที่ 7.6

ดังนั้นสามารถคัดเลือกแหล่งเพาะกล้าไม้ของไม้โกงกางใบเล็กได้ว่าจะเก็บเลือกได้ที่ไหนและต้นใด โดยประเมินอัตราผสมข้ามในระยะกล้าไม้ก่อนการนำไปปลูกป่า โดยเลือกจากแหล่งและต้นที่มีอัตราผสมข้ามสูง เพื่อให้มั่นใจว่าต้นไม้จะรอดตายและเจริญเติบโตได้ดีและมีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่ผันแปรในอนาคตได้ (Changtragoon, 2001a; Changtragoon, 2005; Changtragoon and Szmidt, 1993).

แม้ว่าไม้โกงกางใบใหญ่ไม่สามารถวิเคราะห์ไอโซเอนไซม์ยีนได้ เนื่องจากสารบางอย่างที่ใบของไม้โกงกางใบใหญ่ ทำให้ Enzyme ไม่ทำปฏิกิริยากับ Substrate อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะฝักและกล้าไม้ที่เพาะ ทำให้เห็นว่าไม้โกงกางใบใหญ่มีการผสมกันเองในหมู่เครือญาติซึ่งทำให้เกิดลักษณะด้อย ดังแสดงในภาพ 7.5 (สุจิตรา, 2550)



ภาพที่ 7.1 DNA profile ของเครื่องหมายเอเอฟแอลพีของไม้โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) ในประเทศไทย (ที่มา: สุจิตรา, 2550)



ภาพที่ 7.2 DNA profile ของเครื่องหมายเอเอฟแอลพีของไม้โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora muconata*) ในเกาะภูเก็ต (ที่มา: สุจิตรา, 2550)

ตารางที่ 7.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) ในประเทศไทย

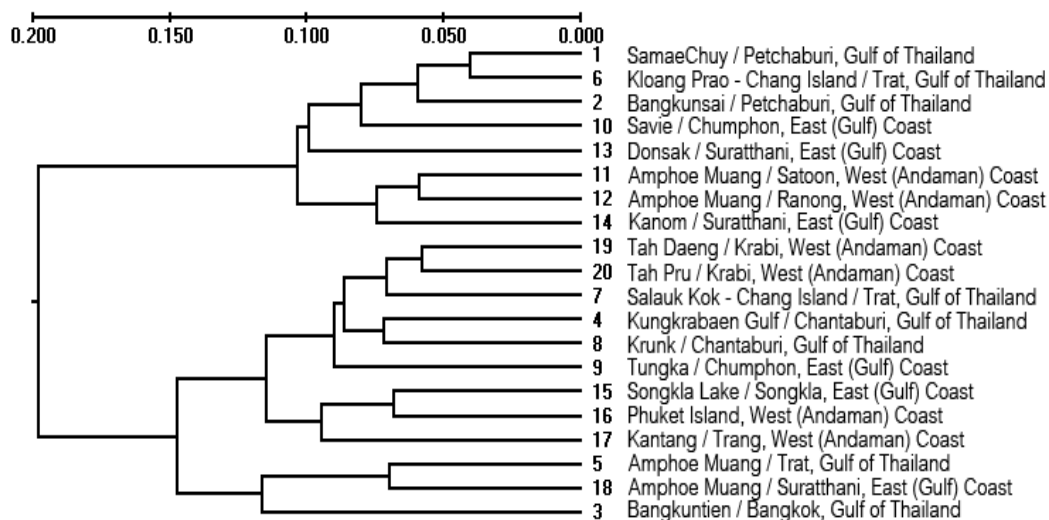
ลำดับ (Number)	ชื่อแหล่ง(ประชากร) (Population Name)	ตำแหน่งที่มีความผันแปรทางพันธุกรรม (Polymorphic loci in %)		ความหลากหลายทาง พันธุกรรม (Gene Diversity)
		99% criterion	95 % criterion	Unbiased (expected) heterozygosity
1	Samaechay, Petchaburi	63.5135	63.5135	0.1938
2	Bangkunsai, Pechaburi	63.5135	63.5135	0.2699
3	Bangkuntien, Bangkok	94.7368	92.1053	0.3557
4	Kungkraben, Chantaburi	94.1176	91.1765	0.3813
5	Amphur Muang, Trat	90.5405	90.5405	0.3764
6	Klong Prao, Chang Island, Trat	41.8919	40.5405	0.1502
7	Salak Kok, Chang Island, Trat	76.7857	71.4286	0.3181
8	Klung, Chantaburi	89.1892	89.1892	0.3714
9	Thung Ka, Chumporn	85.1351	83.7838	0.3507
10	Sawee, Chumporn	47.2973	47.2973	0.2060
11	Amphur Muang, Satoon	47.2973	47.2973	0.1974
12	Amphur Muang, Ranong	48.6487	48.6478	0.1715
13	Donsak, Suratthani	71.6216	70.2703	0.2997
14	Kanom, Suratthani	43.2432	43.2432	0.1895
15	Songkhla	100.00	97.2973	0.4491
16	Phuket Island	91.8033	91.8033	0.4061
17	Kantang, Trang	90.5405	90.5405	0.4121
18	Amphur Muang, Suratthani	100.00	96.6667	0.4316
19	Tha Dang, Krabi	93.2432	91.8919	0.3903
20	Tah Pru, Krabi	93.7500	92.1875	0.4183
ค่าเฉลี่ย (Average)		76.3434	75.1467	0.31695

ที่มา: สุจิตรา, 2550

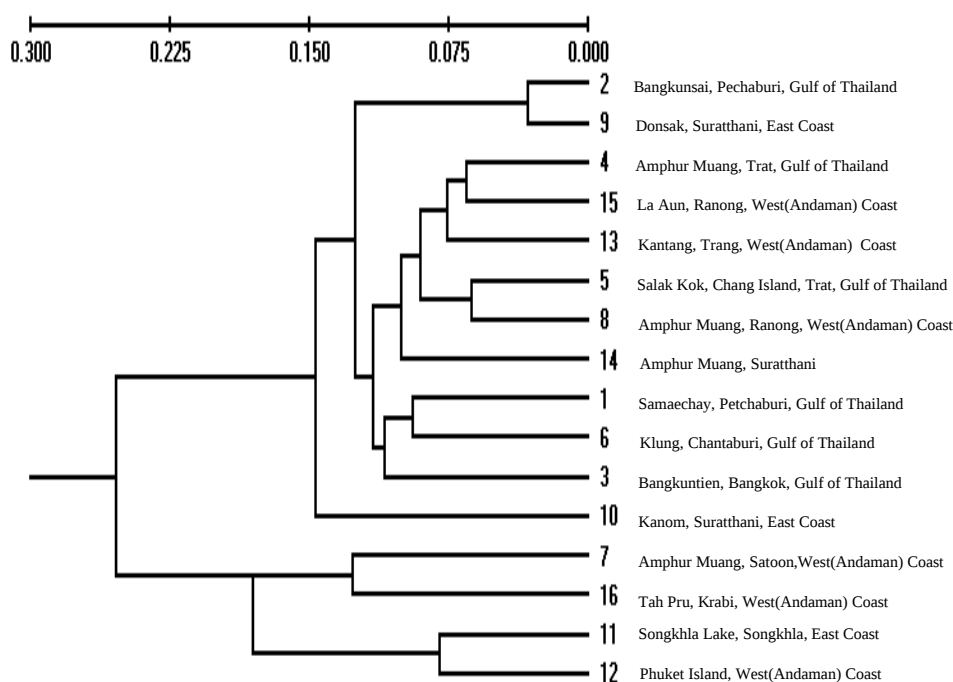
ตารางที่ 7.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) ในประเทศไทย

ลำดับ (Number)	ชื่อแหล่ง (ประชากร) Population Name	ตำแหน่งที่มีความผันแปรทางพันธุกรรม (Polymorphic loci in %)		ความหลากหลายทาง พันธุกรรม (Gene Diversity)
		99% criterion	95 % criterion	Unbiased (expected) heterozygosity
1	Samaechay, Petchaburi	57.1429	57.1429	0.2425
2	Bangkunsai, Petchaburi	98.2143	98.2143	0.4042
3	Bangkuntien, Bangkok	91.0714	89.2857	0.3722
4	Amphur Muang, Trat	96.4286	96.4286	0.4209
5	Salak Kok, Chang Island, Trat	86.5385	86.5385	0.3813
6	Klung, Chantaburi	91.0714	89.2857	0.3556
7	Amphur Muang, Satoon	100	100	0.3414
8	Amphur Muang, Ranong	94.6429	94.6429	0.4161
9	Donsak, Suratthani	79.5918	79.5918	0.3347
10	Kanom, Suratthani	84.0909	84.0909	0.3982
11	Songkla Lake, Songkhla	98.2143	96.4286	0.4315
12	Phuket Island	98.2143	98.2143	0.4202
13	Kantang, Trang	96.4286	96.4286	0.4482
14	Amphur Muang, Suratthani	92.8571	92.8571	0.4421
15	La Aun, Ranong	96.4286	96.4286	0.4117
16	Tah Pru, Krabi	85.7143	85.7143	0.3473
ค่าเฉลี่ย (Average)		90.411	90.075	0.3818

ที่มา: สุจิตรา, 2550



ภาพที่ 7.3 ความสัมพันธ์ของลักษณะการจัดกลุ่มแสดง Genetic distance และความสัมพันธ์ระหว่างประชากรของไม้โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) ในประเทศไทย (ที่มา: สุจิตรา, 2550)



ภาพที่ 7.4 ความสัมพันธ์ของลักษณะการจัดกลุ่มแสดง Genetic distance และความสัมพันธ์ระหว่างประชากรของไม้โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) ในประเทศไทย (ที่มา: สุจิตรา, 2550)

ตารางที่ 7.5 การประเมินอัตราการผสมข้ามในแต่ละประชากรของไม้โกงกางใบเล็ก
(*Rhizophora apiculata*) ในประเทศไทย

ชื่อประชากร (Population names)	จังหวัด (Provinces)	Multilocus t estimate
อ.กันตัง	ตรัง	0.978 ± 0.189
อ.خل่ง	จันทบุรี	1.00 ± 0.109
เขตบางขุนเทียน	กรุงเทพฯ	0.241 ± 0.091

ที่มา: สุจิตรา, 2550

ตารางที่ 7.6 การประเมิน อัตราการผสมข้าม ในแต่ละประชากรของไม้โกงกางใบเล็ก
(*Rhizophora apiculata*) ในประเทศไทย

หมายเลขของต้น (Family numbers)	อัตราการผสมข้าม (Outcrossing rate) Multilocus t estimate
02	0.75 ± 0.11
03	0.27 ± 0.09
04	1.00 ± 0.00
06	0.51 ± 0.14
12	0.26 ± 0.13
15	1.00 ± 0.00
16	1.00 ± 0.00

ที่มา: สุจิตรา, 2550



ภาพที่ 7.5 การผสมกันเองในหมู่เครือญาติ (ซึ่งรวมถึงการผสมตัวเองด้วย) ในไม้โก่งกางใบใหญ่ที่เรียกว่า การเกิด Inbreeding depression (ความเสื่อมถอยของการผสมกันในหมู่เครือญาติ) ทำให้กล้า ไม้มีลักษณะด้อยและความสามารถในการอยู่รอดลดลง อัตราการเจริญเติบโตลดลง โดย; ภาพ ก แสดงการเปรียบเทียบ ลักษณะฝักที่ปรกติ (ด้านบน) กับฝักที่เกิด Inbreeding depression (ด้านล่าง) ซึ่งมีสีขาวและสีเหลือง; ภาพ ข แสดงฝักที่เกิด Inbreeding depression ทำให้ไม่ เกิดการงอกขึ้น; ภาพ ค แสดงการเปรียบเทียบต้นกล้าที่ปรกติกับต้นที่เกิด Inbreeding depression ที่มีสีขาวยังมีการเจริญเติบโตต่ำกว่าปกติ เพราะว่ามีคลอโรฟิลล์สำหรับ สังเคราะห์แสง (ที่มา: สุจิตรา, 2550)

สรุป

ไม้โก่งกางใบเล็กและไม้โก่งกางใบใหญ่ได้มีการถูกสำรวจในบริเวณอ่าวไทยและตามชายฝั่งตะวันออกและฝั่งตะวันตกของประเทศไทย โดยมีการเก็บตัวอย่างไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากไม้โก่งกางใบเล็กและไม้โก่งกางใบใหญ่ 20 และ 16 แหล่ง พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในไม้โก่งกางใบเล็กและไม้โก่งกางใบใหญ่มีค่าแต่ละแหล่ง แตกต่างกันไป โดยมีค่าเฉลี่ย 0.31 และ 0.38 ตามลำดับ และความแตกต่างระหว่างแหล่งของไม้โก่งกางใบเล็กและไม้โก่งกางใบใหญ่มีค่า 0.25 และ 0.21 ตามลำดับ ส่วนการศึกษาระบบการสืบพันธุ์ในไม้โก่งกางใบเล็กใน 3 แหล่ง พบว่ามีอัตราผสมข้ามแตกต่างกันไปกล่าวคือที่เขตบางขุนเทียน จังหวัดกรุงเทพฯ มีอัตราผสมข้ามต่ำที่สุดคือมีค่า 0.24 (24 เปอร์เซ็นต์) ส่วนอัตราผสมข้ามของไม้โก่งกางใบเล็กจากอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรีและอำเภอกันตัง จังหวัดตรังมีค่าสูงถึง 1.00 (100 เปอร์เซ็นต์) และ 0.97 (97 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ

ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถนำไปเป็นแนวทางในการพิจารณาวางแผนอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมตลอดจนการปลูกและฟื้นฟูป่าของไม้โก่งกางทั้งสองชนิดให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (สุจิตรา, 2550)

ข้อเสนอแนะในการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมและฟื้นฟูไม้โก่งกางใบเล็กและไม้โก่งกางใบใหญ่

ไม้โก่งกางใบเล็ก

1. ควรจัดทำแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมในถิ่นกำเนิดในแหล่ง (ประชากร) ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง มีอัตราผสมข้ามสูงและเป็นตัวแทนของฝั่งอันดามันและฝั่งอ่าวไทย ดังนั้นในไม้โก่งกางใบเล็กควรอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมที่จังหวัดสงขลา อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี เกาะภูเก็ต หมู่บ้านสลักคอก เกาะช้าง และอ่าวคังกระเบน จังหวัดจันทบุรี
2. แหล่ง (ประชากร) ของไม้โก่งกางใบเล็กที่ควรฟื้นฟู คืออำเภอคลองพร้าว เกาะช้าง จังหวัดตราด อำเภอเมือง จังหวัดระนอง อำเภอเมือง จังหวัดสตูล หมู่บ้านแสมชัย จังหวัดเพชรบุรี และอำเภอสวี จังหวัดชุมพร เพราะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำกว่าค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเฉลี่ย
3. ควรมีการจัดทำฐานข้อมูลการเก็บฝักโก่งกางใบเล็กกว่าเก็บมาจากที่ใด เมื่อใด ปลูกเมื่อใดและมีป้ายปักอย่างชัดเจนที่ระบุรายละเอียดดังกล่าวข้างต้น
4. การเก็บฝักไม้โก่งกางใบเล็กเพื่อการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด หรือการปลูกฟื้นฟูป่า หรือปลูกป่า ควรมีการประเมินอัตราผสมข้ามของฝักไม้โก่งกางใบเล็กก่อนนำไปปลูก โดยควรเก็บแบบแยกต้นโดยให้เป็นตัวแทนของแหล่ง (ประชากร) นั้นๆ และนำมาเพาะกล้าแบบแยกต้น แยกแหล่งแล้วนำตัวอย่างใบมาทำการวิเคราะห์ประเมินอัตราผสมข้าม โดยใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ที่กล่าวมาข้างต้น ว่าต้นใด แหล่งใด มีอัตราการผสมข้ามเท่าไร และควรเลือกฝักที่มาจากต้นและแหล่งที่มีอัตราผสมข้ามสูงเพื่อเพิ่มโอกาสในการรอดตายและการเจริญเติบโตที่ดี เมื่อคัดเลือกแล้วจึงนำกล้าไม้ที่คัดเลือกจากแหล่ง (ประชากร) มาละกันแบบสุ่มให้ทั่วถึงโดยให้อัตราส่วนของแต่ละต้นเท่าๆ กันซึ่งควรเก็บ 30 ต้นต่อแหล่งและจำนวนกล้าไม้ขึ้นอยู่กับความต้องการที่จะปลูกในพื้นที่

5. การเก็บฝักเพื่อการปลูกพื้นฟูป่าโกงกางใบเล็กควรเก็บหลายๆ ต้น อย่างน้อย 30 ต้นต่อแหล่ง โดยให้จำนวนฝักจากแต่ละต้นมีจำนวนพอๆ กัน และควรเอาฝักที่ได้จากแหล่งเดียวกันมาปลูกในพื้นที่ป่าเดียวกันไม่ควรเอาฝักจากแหล่งอื่นมาปลูกปะปนกันโดยเฉพาะไม่ควรเก็บข้ามฝั่งทะเล (ฝั่งอันดามันและฝั่งอ่าวไทย) เพราะไม้โกงกางแต่ละพื้นที่จะมีการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมเฉพาะมาเป็นเวลานาน ไม่ว่าจะเป็นสภาพการขึ้นลงของน้ำทะเล ความเค็มของน้ำทะเล ความลึกของดินเลน เป็นต้น หากไม่สามารถประเมินอัตราการผสมข้ามได้ตามข้อ 4 ควรเก็บฝักโกงกางใบเล็กแยกต้นและเพาะกล้าไม้แยกกัน และสังเกตดูว่าฝักและต้นกล้าจากต้นใดมีลักษณะด้อย เช่น มีฝักสีขาวหรือสีเหลือง กล้าไม่มีสีขาวหรือสีเหลือง ถ้าพบไม่ควรเอากล้าไม้จากต้นนั้นไปปลูก เพราะมีลักษณะด้อย อันเกิดจากการผสมกันเองในหมู่เครือญาติและกล้าไม้กล้าอื่นแม้เป็นสีเขียวก็มีแนวโน้มที่จะมียืนด้อยสูงเพราะมาจากต้นแม่ต้นเดียวกัน

6. เนื่องจากผลการศึกษาพบว่าการทำให้ป่าโกงกางใบเล็กเสื่อมโทรมโดยการบุกรุกพื้นที่ป่า เช่น กรณีที่อำเภอคลองพร้าว เกาะช้าง จังหวัดตราดดังกล่าวข้างต้น มีผลทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง ดังนั้นควรเร่งปลูกจิตสำนึกให้ประชาชนเห็นประโยชน์ของการอนุรักษ์และบริหารจัดการไม่ให้มีการปลูกสร้างโรงแรม รีสอร์ท และการทำนาเกลือในบริเวณพื้นที่ป่าชายเลน (สุจิตรา, 2550)

ไม้โกงกางใบใหญ่

1. ควรอนุรักษ์พันธุกรรมในถิ่นกำเนิดของไม้โกงกางใบใหญ่โดยใช้ข้อพิจารณาเช่นเดียวกับไม้โกงกางใบเล็ก จากพื้นฐานข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้โกงกางใบใหญ่จากแหล่ง (ประชากร) ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง และเหมาะสมต่อการอนุรักษ์ คือ อำเภอเมือง จังหวัดตราด อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง จังหวัดภูเก็ต หมู่บ้านสลักคอก เกาะช้าง จังหวัดตราด อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง

2. พื้นที่ป่าที่ควรฟื้นฟู คือ พื้นที่หมู่บ้านแสมชัย จังหวัดเพชรบุรี เพราะเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำกว่าที่อื่น แนวทางการจัดการเก็บฝักเพื่อการฟื้นฟูป่าควรดำเนินการตามขั้นตอนที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อไม้โกงกางใบเล็ก

3. ส่วนแนวทางในการดำเนินการเก็บฝักไม้โกงกางใบใหญ่เพื่อการฟื้นฟูป่า ปลูกป่า ทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับไม้โกงกางใบเล็กที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น

4. ไม้โกงกางใบใหญ่ถูกคุกคามค่อนข้างสูงจึงทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างมาศึกษาได้ในบางแหล่ง เช่น บริเวณอำเภอคลองพร้าว เกาะช้าง จังหวัดตราด ซึ่งแสดงให้เห็นภัยคุกคามฐานพันธุกรรมของไม้โกงกางใบใหญ่ในบางพื้นที่ ดังนั้นการสร้างจิตสำนึกและความตระหนักถึงการอนุรักษ์ไม้โกงกางใบใหญ่ให้แก่ประชาชนเข้าใจและมีส่วนร่วมจึงเป็นสิ่งสำคัญ (สุจิตรา, 2550)

บทที่ 8

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่บางชนิดในประเทศไทยโดยใช้ เครื่องหมายเอเอฟแอลพีและไมโครแซทเทลไลท์

คำนำ

ไผ่เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Gramineae พบกระจายอยู่เกือบทั่วโลก มีการค้นพบและรายงานไว้ประมาณ 77 สกุล 1,030 ชนิด (Dransfield and Widjaja, 1995) สำหรับในประเทศไทยนั้นมียานงานไว้ประมาณ 15 สกุล 82 ชนิด มีบางชนิดที่หลงเหลือจากการสำรวจอยู่บ้าง เนื่องจากอยู่ในป่าลึกและชาวผู้เชี่ยวชาญในการจัดจำแนกพันธุ์ (รุ่งนภา และคณะ, 2544) ไผ่เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและการดำรงชีวิตของชาวเอเชีย แอฟริกา และอเมริกา (McClure, 1966; Farrelly, 1984) โดยเฉพาะคนไทยมีการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรไม้ไผ่เพื่อตอบสนองความต้องการขั้นพื้นฐานอย่างกว้างขวางทั้งทางตรงและทางอ้อม แทบทุกส่วนของไผ่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งสิ้น ซึ่งในปัจจุบันมีอุตสาหกรรมรองรับ และนับวันก็ยิ่งจะมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากขึ้น โดยสามารถนำไผ่มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสินค้างานต่างๆ มากมาย อาทิ งานด้านศิลปหัตถกรรม เครื่องจักสานเฟอร์นิเจอร์เครื่องเรือน อุตสาหกรรมกระดาษ ไหมเทียม กระดาษแก้ว แผ่นไม้อัด ที่มีความนิยมสูงในการใช้ตกแต่ง หรือทำไม้แบบในงานก่อสร้าง ซึ่งใช้ได้มากกว่าไม้แบบที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน (ธนาคารกสิกรไทย, 2528) ส่วนหน่อใช้ในการบริโภคมีคุณค่าทางอาหาร นอกจากนี้ยังมีการนำมาปรุงในตำรับยาสมุนไพร (Guo, 1989) และอุตสาหกรรมการผลิตหน่อไม้กระป๋อง หน่อไม้แห้ง (สุทัศน์, 2544) ซึ่งผลิตภัณฑ์จากไผ่ในรูปหน่อไม้กระป๋องเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ในประเทศไทยอย่างหนึ่ง ในปี พ.ศ. 2548 มีมูลค่าการส่งออก 482.3 ล้านบาท (กระทรวงพาณิชย์, 2549) รากยังช่วยยึดหน้าดินและสร้างความอุดมสมบูรณ์ให้แก่หน้าดิน เนื่องจากเป็นไม้โตเร็ว โรคแมลงน้อยจึงใช้ในการปรับปรุงสภาพป่าเสื่อมโทรม เหมาะสมกับสภาพภูมิประเทศของไทย (รุ่งนภา และคณะ, 2544) แม้ประโยชน์ของไผ่มีอยู่มากมายดังกล่าวข้างต้น แต่ก็ยังมีปัญหาในการจำแนกพันธุ์ของไผ่อยู่ นอกจากนี้ยังไม่มีข้อมูลสถานภาพแหล่งพันธุกรรมของไผ่ป่ามาก่อน (รังสัน และ สุจิตรา, 2548)

ดังนั้นรังสัน และ สุจิตรา (2548) จึงได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่บางชนิดโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP; Amplified Fragment Length Polymorphism) และไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) ในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่ชนิดต่างๆ และประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ป่า (*Bambusa bambos*) เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมในด้านความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Genetic variation) โดยข้อมูลความแปรปรวนทางพันธุกรรมทำให้ทราบถึงโครงสร้างทางพันธุกรรม (Genetic structure) และพื้นฐานทางพันธุกรรมของไผ่ที่ศึกษาได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้น ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์ และปรับปรุงพันธุ์ไผ่ ตลอดจนใช้เป็นแนวทางในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของไผ่ที่กำลังมีปัญหาไม่สามารถจำแนกได้อย่างชัดเจน และเพื่อจัดการการใช้ประโยชน์ทรัพยากรไผ่อย่างยั่งยืนต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษาวิจัย

การศึกษาได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่ชนิดต่าง ๆ

รังสัน และ สุจิตรา (2548) ได้เก็บใบอ่อนของไผ่ จำนวน 26 ชนิดๆ ละ 1 ตัวอย่าง จากสถานีทดลองปลูกพรรณไม้หิณลับ อำเภอบ่อพลอย จังหวัดกาญจนบุรี ดังแสดงในตารางที่ 8.1

ตารางที่ 8.1 ไผ่ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษา

ชนิดไผ่	ชื่อวิทยาศาสตร์
1. ไผ่บงดำ	<i>Bambusa tulda</i>
2. ไผ่รวกดำ	<i>Thyrsostachys oliveri</i>
3. ไผ่ข้าวหลาม	<i>Cephalostachyum pergracile</i>
4. ไผ่ป่า	<i>Bambusa bambos</i>
5. ไผ่รวก	<i>Thyrsostachys siamensis</i>
6. ไผ่ตงพันธุ์ศรีปราชญ์	<i>Dendrocalamus asper</i>
7. ไผ่สีทอง	<i>Schizostachyum brachycladum</i>
8. ไผ่เหลือง	<i>Bambusa vulgaris</i> Shrader ex. H. Wendland
9. ไผ่หวาน	<i>Bambusa</i> sp.
10. ไผ่บงใหญ่	<i>Dendrocalamus brandisii</i>
11. ไผ่ชางนวล	<i>Dendrocalamus membranaceus</i>
12. ไผ่กำยาน	<i>Bambusa vulgaris</i> (Green variety)
13. ไผ่ตง	<i>Dendrocalamus asper</i>
14. ไผ่ปล้องยาว	ยังไม่ได้รับการกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์
15. ไผ่เลี้ยง	<i>Bambusa multiplex</i>
16. ไผ่เพ็ก	<i>Vietnamosasa pusilla</i>
17. ไผ่หลอด	<i>Neohouzeaua mekongensis</i>
18. ไผ่หก	<i>Dendrocalamus hamiltonii</i>
19. ไผ่มันหมู	ยังไม่ได้รับการกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์
20. ไผ่สีสุก	<i>Bambusa blumeana</i>
21. ไผ่เลี้ยงมัน	ยังไม่ได้รับการกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์
22. ไผ่ไร่	<i>Gigantochloa albociliata</i>
23. ไผ่น้ำเต้า	<i>Bambusa vulgaris</i> Shrader cv. Wamin (Brandis)
24. ไผ่ผาก	<i>Gigantochloa densa</i>
25. ไผ่ล้ามะลอก	<i>Bambusa longispiculata</i>
26. ไผ่กระแสน	ยังไม่ได้รับการกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์

ที่มา: รังสัน และ สุจิตรา, 2548

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรไผ่ป่า

ใบอ่อนของไผ่ป่า (*Bambusa bambos*) ที่เก็บจากป่าธรรมชาติทั่วทุกภาคของประเทศไทยจำนวน 9 แหล่ง แหล่งละ 30 ต้น (ตัวอย่าง) (ตารางที่ 8. 2) ซึ่งห่างกันอย่างน้อย 100 เมตร

ตารางที่ 8. 2 แหล่งเก็บตัวอย่างไผ่ป่า (*Bambusa bambos*) จากแหล่งธรรมชาติของประเทศไทย

สัญลักษณ์	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนต้น (ตัวอย่าง) ต่อแหล่ง	พิกัดทางภูมิศาสตร์	
			°N	°E
Bb 1	อ. บ่อพลอย จ. กาญจนบุรี (1)	30	14°15'36.66"	99°42'41.88"
Bb 2	อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี (2)	30	14°41'56.59"	98°39'50.41"
Bb 3	อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี (3)	30	14°09'46.59"	99°05'20.41"
Bb 4	อ. จาว จ. ลำปาง	30	18°41'56.10"	99°42'25.49"
Bb 5	อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่	30	19°16'09.55"	98°54'57.44"
Bb 6	อ. โขงเจียม จ. อุบลราชธานี	30	15°18'29.90"	105°30'23.51"
Bb 7	อ. ภูกระดึง จ. เลย	30	16°51'57.94"	101°46'07.21"
Bb 8	อ. เมือง จ. สระแก้ว	30	13°59'50.06"	102°16'38.79"
Bb 9	อ. เมือง จ. สุราษฎร์ธานี	30	8°57'41.73"	99°05'51.86"

หมายเหตุ: °N คือ ตำแหน่ง Latitude

°E คือ ตำแหน่ง Longitude

ที่มา: รังสัน และ สุจิตรา, 2548

การสกัด วัฏคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอ

การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP; Amplified Fragment Length Polymorphism) และไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) ต้องได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งต่างๆ เพื่อป้องกันการตัดดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์และการวิเคราะห์ผลที่ผิดพลาด โดยการทดลองนี้ได้นำตัวอย่างใบอ่อนของไผ่แต่ละชนิดมาล้างเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่บริเวณผิวใบ ตามวิธีของ Zhang *et al.* (1997) แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีการสกัดของ Doyle and Doyle (1990) และ Changtragoon *et al.* (1996b) แล้วนำมาละลายใน 1X TE buffer (10 mM Tris -HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 50-100 ไมโครลิตร เก็บสารละลาย ดีเอ็นเอไว้ที่ ตู้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วัฏคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb แล้วบันทึกภาพ

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี

รังสัน และ สุจิตรา (2548) ได้นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์โดยเทคนิคเอเอฟแอลพีตามวิธีของ Vos *et al.* (1995) และแยกชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องแยกขนาดแบบ Non-denaturing polyacrylamide ด้วย เครื่อง Gel-scan 3000 (Corbett research, Australia) ที่ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ 6 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.6X TBE Buffer ที่ผสมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ผ่านกระแสไฟฟ้า 800 โวลต์ นาน 60 นาที เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 bp แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยแปลผลข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอ ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของแต่ละชนิด เปรียบเทียบจากความเหมือนและความแตกต่างของรูปแบบ ของดีเอ็นเอ ที่เกิดขึ้นและคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธี Simple matching (Sneath and Sokal, 1973) นำมาเข้าสู่ตาราง Matrix โดยใช้ Nei and Li (1979) Similarity index เพื่อใช้ในการจัดกลุ่ม ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Unweighed Pair Group Method of Arithmetic Average (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.01e (Rohlf, 1993) และแสดงผล ในรูปแบบของ Phylogenetic tree

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์

รังสัน และ สุจิตรา (2548) ได้นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อ ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ Forward และ Reverse ดังตารางที่ 8. 3 โดยใช้ Taq DNA polymerase kit (Qiagen, Germany) นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ โปรแกรมดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 50 หรือ 55 หรือ 60 องศาเซลเซียส ตามอุณหภูมิของ Annealing ของไพรเมอร์ 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 วินาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ตัวกลางชนิด Non-denaturing polyacrylamide gel ภายใต้เครื่อง Gel-scan 3000 ที่ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ 6 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.6X TBE Buffer ที่ผสมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ผ่านกระแสไฟฟ้า 1,000 โวลต์ นาน 45 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน หลังจากนั้นวิเคราะห์จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (Number of allele per locus, N) จำนวนอัลลีลต่อ ตำแหน่งที่แท้จริง (Effective number of allele, ne) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) การทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) และการจัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) และ TFGPA version 1.3 (Miller, 1997)

ตารางที่ 8.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับเบสแกน อุณหภูมิในการจับเกาะ (Annealing temperature, T_A) ขนาดผลผลิตของพีซีอาร์ และความเข้มข้นของเคมีเชื่อมคลอไรด์ (MgCl₂) ของคูเพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

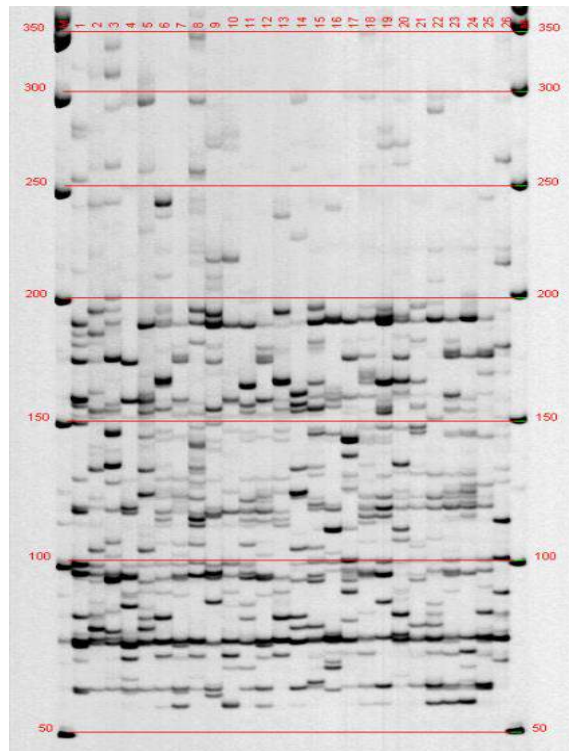
ลำดับ ที่	สัญลักษณ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ลำดับเบสแกน	T _A (C°)	ความเข้มข้นเคมีเชื่อม คลอไรด์ (mM)	ขนาดของผลผลิตพีซี อาร์ (bp)	Gene Bank Accession number
1	DTLBb1	F: GTGCGCTGATGTTGTTGTG R: CGGCCAATATCCATATTTCCATC	(GTT) ₂ TGT(GTT) ₂	55	2.5	200	-
2	DTLBb8	F: AGTTGACCAATTGGGAAAAG R: TTTGTGTATGTTGTAGGAAGTCG	(CT) ₃	50	2.5	160	-
3	DTLBb15	F: GCC TAA AA T TTC GGG TGA TCC R: CAG CCG TCA CAG CTC ACA AC	(CAA) ₁₉	55	2.5	280	-
4	DTLBb20	F: CTG CCA TGG TGA CAC TAG AAC G R: CCT CAA ACA CAG GAA TTT CAA GC	(GT) ₃ A(TA) ₃ (GA) ₁₀	60	1.5	290	-
5	DTLBb29	F: TTACAACCAAGAGCGCGATAC R: GCAGACACTTTACCGACTTCAGC	(GA) ₃ GG(CA) ₈	60	1.5	160	-
6	DTLBb47	F: GATCAGACTTCAACACAAAACGTAC R: TGTGTCAACTGTCAAAGTCCTCTTC	(CT) ₆ AT(CT) ₇	60	1.5	140	-
7	DTLBb50	R: GATAAATAACTGCATCGTTGGT R: CAGAAAGTTACTGTCAGAGAGACG	(CT) ₁₆	60	1.5	150	-
8	AJ507491	F: TTC GTT GCT CCT GCA AGG R: CTG TGG TTC TAC TAT GCG C	(CA) ₇	50	2.5	150	AJ507491
9	AJ507492	F: CTA GCA AAC GCA CAG TG R: CAG TGT GAT ACA CGT CC	(AO) ₃ C(AC) ₂ GC(AO) ₄	50	2.5	206	AJ507492

ที่มา: รังสัน และ สุจิตรา, 2548

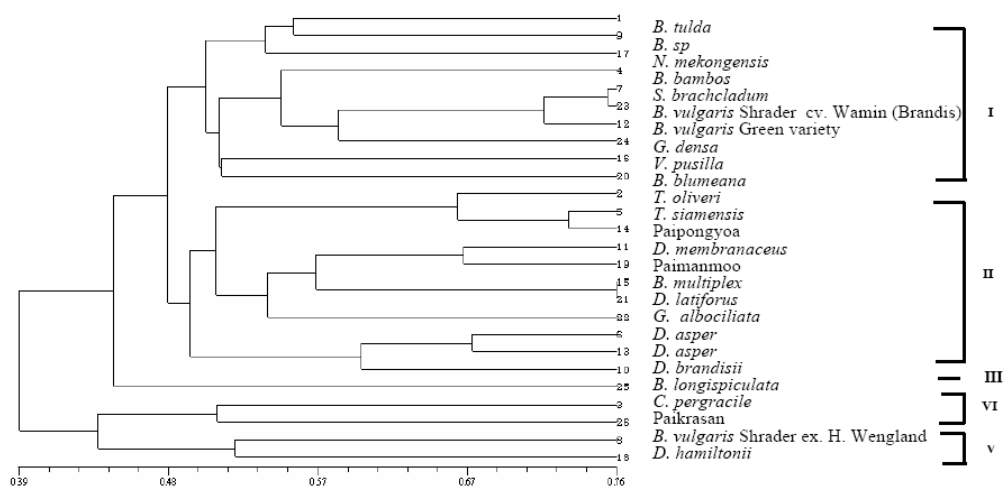
ผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่ชนิดต่าง ๆ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเครื่องหมายเอเอฟแอลพีพ ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 14 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 642 แถบ จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ ไพรเมอร์ มีค่าเท่ากับ 45.86 แถบ เมื่อคิดเป็นสัดส่วนค่าโพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นมีค่าสูงถึง 93.13 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ากลุ่มไผ่ที่ทำการศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก ไพรเมอร์ 14 คู่ มีรูปแบบที่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์หาจำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะที่ปรากฏในแต่ละคู่ ไพรเมอร์ของไผ่แต่ละชนิดจากทั้งหมด 26 ชนิด โดยพบว่าคู่ไพรเมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะมากที่สุด ได้แก่คู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CAA, E-ACC/M-CTT และ E-AGC/M-CTC ดังแสดงในภาพที่ 8.1 ซึ่งให้จำนวน แถบดีเอ็นเอจำเพาะจำนวน 4 แถบ และไผ่ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะมีจำนวน 18 ชนิด และไม่ปรากฏ 8 ชนิด โดยชนิดไผ่ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำเพาะมากที่สุด คือไผ่ไร่ (*Gigantochloa albociliata*) พบจำนวน 4 แถบ ข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาช่วยสนับสนุนการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ไผ่ได้ในอนาคต การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA แสดงผลในรูปแบบของ Phylogenetic tree พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มของไผ่ ออกเป็น 5 กลุ่ม ตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ปรากฏดังแสดงในภาพที่ 8.2 อย่างไรก็ตามในการศึกษา แถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อชนิดพันธุ์สำหรับไผ่แต่ละชนิดนั้นจะต้องมีการศึกษาและทดลอง โดยใช้ตัวอย่างต่อ ชนิดพันธุ์ไผ่ในจำนวนที่มากขึ้น ซึ่งตัวอย่างที่นำมาศึกษาจะต้องมาจากแหล่งกระจายพันธุ์หลายๆ แหล่ง แล้ว นำแถบดีเอ็นเอจำเพาะนั้นมาหาลำดับเบสเพื่อพัฒนาแถบดีเอ็นเอ ที่จำเพาะที่สัมพันธ์กับชนิดพันธุ์ไผ่แต่ละ ชนิดและมีประสิทธิภาพต่อการใช้ประโยชน์อย่างแท้จริง และในการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่มี ประสิทธิภาพนั้นควรมีการศึกษาทางด้านพฤกษศาสตร์ควบคู่กันไป (รังสัน และ สุจิตรา, 2548)



ภาพที่ 8.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ E-AGG/M-CTC ของไผ่ 26 ชนิด (ที่มา: รังสัน และ สุจิตรา, 2548)



ภาพที่ 8.2 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่ 26 ชนิด ในลักษณะ Phylogenetic tree (ที่มา: รังสัน และ สุจิตรา, 2548)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรไผ่ป่า

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรไผ่ป่า 9 ประชากร โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 9 ตำแหน่ง รังสัน และ สุจิตรา (2548) พบว่ามีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 55 รูปแบบ ดังแสดงในตัวอย่างบางส่วนในภาพที่ 8.3 จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งเท่ากับ 6.11 โดยประชากรไผ่ป่าจังหวัดสระแก้ว กาญจนบุรี 1 (อ.บ่อพลอย) และ สุราษฎร์ธานี มีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตมากที่สุด (0.333 , 0.332 และ 0.318 ตามลำดับ) และ ประชากรจังหวัดกาญจนบุรี 3 (อ. ทองผาภูมิ) มีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตต่ำที่สุด (0.263) ค่าเฉลี่ยทุกประชากรมีค่าเท่ากับ 0.294 ส่วนค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวัง ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่าประชากรไผ่ป่าจังหวัดสระแก้วมีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวังมากที่สุด (0.440) และประชากรไผ่ป่าจังหวัดกาญจนบุรี 3 (อ.ทองผาภูมิ) มีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวังต่ำที่สุด (0.314) ค่าเฉลี่ยทุกประชากรมีค่าเท่ากับ 0.369 โดยประชากรส่วนใหญ่มีแนวโน้มที่มีความถี่จีโนไทป์อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และทุกประชากรมีค่าเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิกสูง (66.67 - 88.89 เปอร์เซ็นต์) โดยเฉลี่ยทุกประชากรเท่ากับ 76.54 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8.4) แสดงให้เห็นว่าประชากรไผ่ป่าที่ศึกษา มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรค่อนข้างสูง จากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไผ่ป่า 9 ประชากร เมื่อนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA (ภาพที่ 8.4) พบว่าประชากรของไผ่ป่าที่นำมาศึกษาสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งผลการจัดกลุ่มที่ได้มีบางประชากรที่ไม่สอดคล้องกับถิ่นกำเนิดและสภาพภูมิศาสตร์ ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร (F_E) ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรทั้งหมด (F_T) และค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (F_{ST}) ของไผ่ป่าเฉลี่ยทุกตำแหน่งมีค่าเท่ากับ 0.2060 0.4007 และ 0.2432 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (F_{ST}) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.2432 แสดงให้เห็นว่าประชากรแต่ละแหล่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง

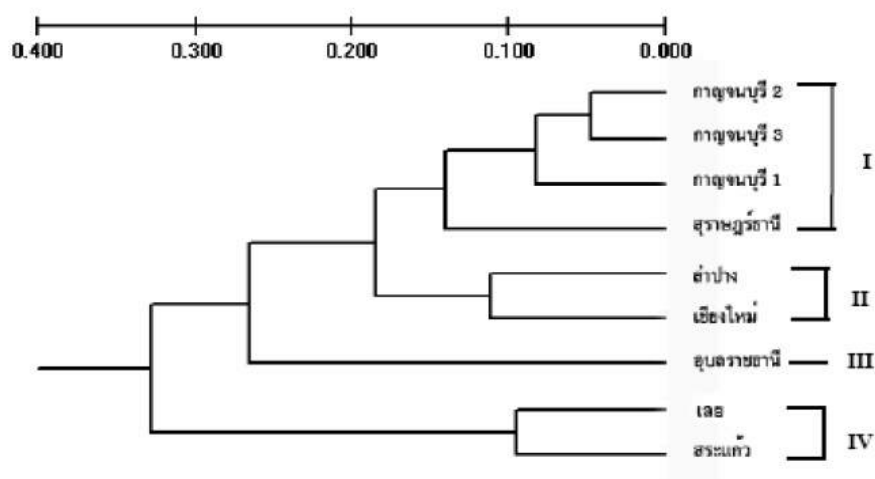


ภาพที่ 8.3 รูปแบบอัลลีลของประชากรไผ่ป่า (*Bambusa bambos*) จังหวัดเชียงใหม่จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง DTLBb 47 (ที่มา: รังสัน และ สุจิตรา, 2548)

ตารางที่ 8.4 จำนวนตัวอย่างเฉลี่ย ค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่ง ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) และค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหมาย (H_e) ในประชากรไผ่ป่า (*Bambusa bambos*)

ประชากร	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง										ค่าเฉลี่ย อัลลีลต่อ ประชากร	ค่าเฉลี่ย		Polymorphic loci (%)
		DTLBb	DTLB	DTLBb	DTLBb	DTLBb	DTLBb	DTLBb	DTLBb	AJS0749	AJS0749		H _o	H _e	
เฉลี่ย		1	b8	15	20	29	47	50	1	2					
กาญจนบุรี 1	28.67	2	1	1	3	3	12	8	4	3	4.11	0.332	0.374	66.67	
กาญจนบุรี 2	28.89	1	1	2	8	3	12	6	2	4	4.33	0.305	0.376	77.78	
กาญจนบุรี 3	29.44	1	1	1	7	2	10	7	2	3	3.77	0.263	0.314	66.67	
ลำปาง	28.77	1	2	2	4	3	8	8	3	3	3.77	0.278	0.415	88.89	
เชียงใหม่	28.55	1	2	2	2	4	9	3	2	3	3.11	0.284	0.340	77.78	
อุบลราชธานี	26.22	2	2	1	5	2	10	6	2	2	3.55	0.265	0.334	55.55	
เลย	29.00	3	1	2	4	1	10	5	3	4	3.66	0.272	0.398	77.78	
สระแก้ว	29.55	2	1	2	5	2	5	7	3	4	3.44	0.333	0.440	88.89	
สุราษฎร์ธานี	30.00	2	2	2	2	2	8	6	2	3	3.22	0.318	0.334	88.89	
ค่าเฉลี่ย	28.78	1.66	1.44	1.66	4.44	2.44	9.33	6.22	2.55	3.22	3.66	0.294	0.369	76.54	

ที่มา: รังสัน และ สุจิตรา, 2548



ภาพที่ 8.4 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไผ่ป่า (*Bambusa bambos*) 9 ประชากรจากการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA (ที่มา: รังสัน และ สุจิตรา, 2548)

สรุปผลการศึกษาวิจัย

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่แต่ละชนิดได้แนวทางที่จะต้องศึกษาพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล (Markers) ที่จำเพาะต่อการวินิจฉัยชนิดของไผ่ที่มีปัญหาในการจำแนกพันธุ์ และมีลักษณะภายนอกที่ไม่คงที่ซึ่งผันแปรตามสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ป่า (*B. bambos*) แสดงให้เห็นว่าไผ่ป่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ซึ่งมีความแตกต่างระหว่างแหล่งประมาณ 24 เปอร์เซ็นต์ จากการสุ่มตัวอย่างในการศึกษาในแต่ละภาค โดยใช้ Microsatellite markers ในการประเมินลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในแต่ละแหล่ง และแต่ละภาคจะเห็นว่าไผ่ป่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงควรดำเนินการจัดการแหล่งอนุรักษ์ทางพันธุกรรมของไผ่ป่าที่ขึ้นอยู่ในพื้นที่คุ้มครองอยู่แล้วเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมในถิ่นกำเนิด ส่วนไผ่ป่าที่พบอยู่นอกพื้นที่อนุรักษ์ เช่น แหล่งที่ได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ในการศึกษาครั้งนี้ควรเผยแพร่ข้อมูลให้เจ้าหน้าที่ในท้องถิ่นดำเนินการขยายพันธุ์และจัดทำเป็นแหล่งพันธุกรรมนอกถิ่นกำเนิดทั้งนี้เพราะว่า แหล่งพันธุกรรมที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี อยู่ปะปนกับชุมชนและหมู่บ้านซึ่งมีโอกาที่จะถูกทำลายแหล่งพันธุ์ได้ง่ายกว่าแหล่งอื่น นอกจากนี้จากการที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ป่าในแต่ละแหล่งค่อนข้างสูงจึงควรดำเนินการคัดเลือกแหล่งพันธุ์และต้นพันธุ์เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์ไผ่ป่าให้ได้ผลผลิตสูงเพื่อประโยชน์ต่อการพัฒนาเศรษฐกิจชุมชนและระดับประเทศในการใช้ประโยชน์จากไผ่ให้ยั่งยืนต่อไป (รังสัน และ สุจิตรา 2548)

ข้อเสนอแนะในการอนุรักษ์พันธุกรรมไผ่ป่า

1. ควรจัดตั้งแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมไผ่ป่าในถิ่นกำเนิดทุกภาคของประเทศไทยโดยเฉพาะแหล่ง (ประชากร) ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงในพื้นที่ที่มีอยู่ในพื้นที่อนุรักษ์ เช่น จังหวัดสระแก้ว จังหวัดลำปาง และจังหวัดกาญจนบุรี
2. ควรจัดตั้งแหล่งพันธุกรรมไผ่ป่านอกถิ่นกำเนิดในแหล่ง (ประชากร) ที่มีอยู่ใกล้ชุมชนและที่ล่อแหลมต่อการบุกรุกทำลาย เช่น ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี
3. ควรจัดตั้งแปลงปลูกไผ่ป่าเพื่อเป็นธนาคารอาหารชุมชน (Food bank) เพื่อลดความกดดันในการเข้าไปตัดเอาหน่อและกล้าไผ่ป่าอย่างเกินกำลังไผ่ป่าตามธรรมชาติ (รังสัน และ สุจิตรา, 2548)

บทที่ 9

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul*) โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP markers)

คำนำ

กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul*) มีกระจายพันธุ์อยู่ตามภูเขาหินปูนและหมู่เกาะทางภาคใต้ของประเทศไทย (อบฉันท, 2543) เป็นกล้วยไม้ที่ได้รับความนิยมในการปลูกเลี้ยงเพื่อการค้ากันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ (ระพี, 2535) กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่มีจำนวนประชากรในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็ว จัดเป็นพืชที่มีสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ของโลก (อุไร, 2545) ในขณะที่ข้อมูลทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดนี้ยังมีอยู่น้อยและไม่มีความชัดเจน เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นอีกเครื่องมือหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาความหลากหลายและความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์, 2545) ซึ่งจักรพันธ์และสุจิตรา (2548) ได้ใช้เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Vos *et al.*, 1995) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่เพื่อประเมินสถานภาพแหล่งพันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดดังกล่าวสำหรับเป็นแนวทางในการอนุรักษ์ในอนาคต ซึ่งรายละเอียดในการศึกษามีดังนี้

วัสดุและวิธีการศึกษาวิจัย

การเก็บรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเพื่อใช้ในการศึกษา

จักรพันธ์ และสุจิตรา (2548) ได้มีการเก็บตัวอย่างใบของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่จากแหล่งต่างๆ 6 แหล่ง ในภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวได้มีการเก็บรวบรวมไว้จากที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้รองเท้านารี ในพระราชดำริ ศูนย์วิจัยข้าวกระบี่ ตำบลเหนือคลอง อำเภอเหนือคลอง จังหวัดกระบี่ ดังตารางที่ 9.1

ตารางที่ 9.1 ตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul*) แหล่งต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับ	แหล่งที่มาของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	แหล่งที่มา
1	อ.เขาพนม จ.กระบี่	7	โครงการอนุรักษ์พันธุกรรม
2	อ.ปะเหลียน จ.ตรัง	10	กล้วยไม้รองเท้านารี
3	อ.ปลายพระยา จ.กระบี่	20	ในพระราชดำริ ศูนย์วิจัยข้าวกระบี่
4	เกาะนกง อ.เมือง จ.กระบี่	4	ต.เหนือคลอง อ.เหนือคลอง
5	เกาะน้อย อ.อ่าวลึก จ.กระบี่	8	จ.กระบี่
6	บ.คลองเตย อ.ทับปุด จ.พังงา	21	

ที่มา: จักรพันธ์ และสุจิตรา, 2548

การสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารี

จักรพันธ์ และสุจิตรา (2548) ได้นำส่วนใบของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่จากตารางที่ 9.1 นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี CTAB คัดเลือกใบกล้วยไม้รองเท้านารีที่เป็นใบอ่อน นำมาบดในไนโตรเจนเหลว ในโกร่งบดยาให้ละเอียด แล้วนำมาบดซ้ำอีกครั้งร่วมกับสารละลาย 2X CTAB จากนั้นทำตามการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ซึ่งได้มีการประยุกต์จาก Changtragoon *et al.* (1996b) หลังจากนั้นนำตะกอนดีเอ็นเอมาละลายใน TE Buffer 50-100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ทำการวัดคุณภาพและปริมาณของสารละลาย ดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (จักรพันธ์และสุจิตรา, 2548)

การวิเคราะห์เอเอฟแอลพีแสดงการคำนวณทางสถิติ

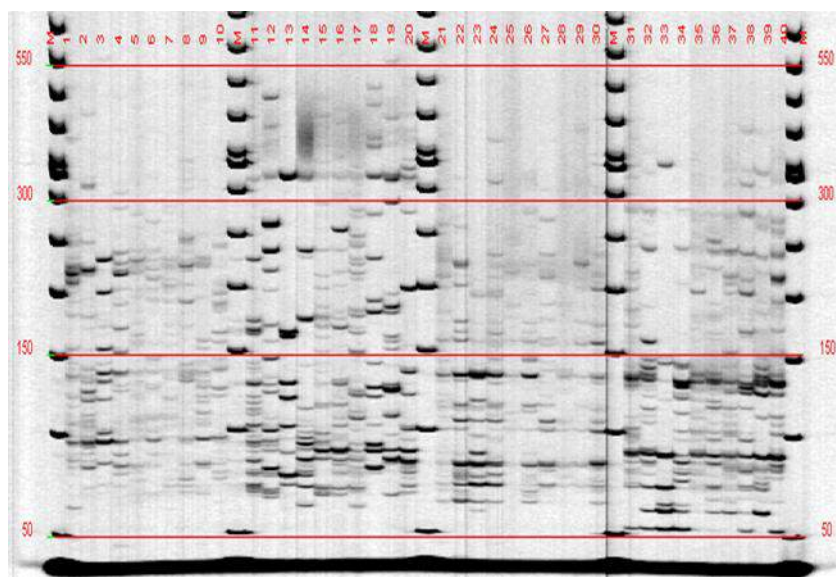
จากการตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด (Digestion) นำดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดมาเชื่อมต่อกับ Adapter (Ligation) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR, Polymerase Chain Reaction) โดย Adapter ที่ต่อเข้าไปปลายของชิ้นดีเอ็นเอจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งจับเกาะของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ ซึ่งจะใช้ *EcoRI* Adapter และ *MseI* Adapter ที่สามารถต่อเข้ากันได้กับดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* มาแล้ว เมื่อนำผลที่ได้มาทำพีซีอาร์เพื่อคัดเลือกว่าไพรเมอร์ที่เหมาะสมจะได้เอเอฟแอลพีโปรไฟล์ (AFLP Profile) ซึ่งเป็นรูปแบบ AFLP Fingerprint ของแต่ละตัวอย่างและแต่ละแหล่ง (สุรินทร์, 2545) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณทางสถิติ เพื่อให้ทราบข้อมูลโครงสร้างทางพันธุกรรม ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละแหล่งด้วย TFGA (Tool for Population Genetic Analysis) Computer software, Version 1.3 (Miller, 1997)

ผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์

ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของรองเท้านารีเหลืองกระบี่โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

ผลการศึกษาคัดเลือกว่าไพรเมอร์ที่เหมาะสม จากการคัดเลือกว่าไพรเมอร์คอมบินชันทั้งสิ้น 64 คู่ โดยสุ่มตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่จากทั้ง 6 แหล่งดังที่กล่าวมาแล้วจำนวน 10 ตัวอย่าง (ภาพที่ 9.1) โดยพบว่ามีความเหมาะสมต่อกับกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้งสิ้นจำนวน 13 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 9.2) โดยสามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน (Polymorphism) ในสัดส่วนที่สูง และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัด (ภาพที่ 9.2)

จากไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมดนี้ เมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างที่ใช้ศึกษาทั้งหมดแล้ว พบว่าสามารถคัดเลือกว่าตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (Polymorphism) ได้ทั้งสิ้น 126 ตำแหน่ง (Loci) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.63 ตำแหน่งต่อหนึ่งคู่ไพรเมอร์



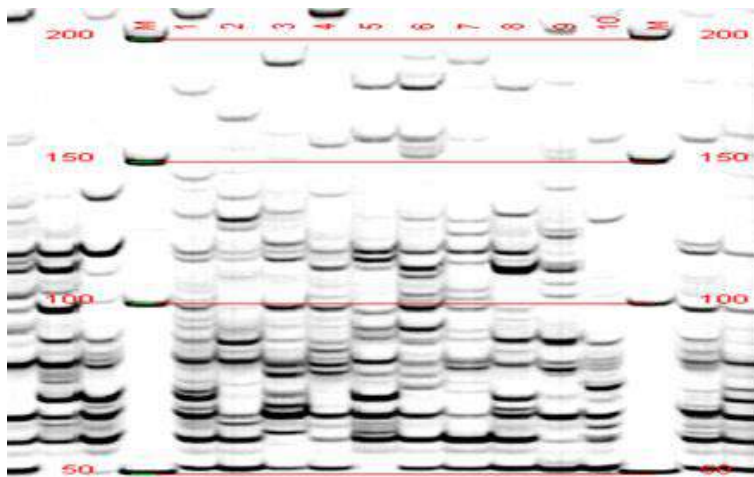
ภาพที่ 9.1 ตัวอย่างการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 4 คู่ จากทั้งหมด 64 คู่ โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (M คือ ดีเอ็นเอ มาตรฐานเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งต่างๆ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ได้จากการสุ่มมาจำนวน 10 ตัวอย่าง ในภาพแสดงการทดสอบคู่ไพรเมอร์ 4 คู่ คือ ตั้งแต่หมายเลข 1 ถึง 10 หมายเลข 11 ถึง 20 หมายเลข 21 ถึง 30 และหมายเลข 31 ถึง 40 ตามลำดับ) (ที่มา: จักรพันธ์และสุจิตรา, 2548)

ตารางที่ 9.2 คู่ไพรเมอร์จำนวน 13 คู่ ที่คัดเลือกได้จากจำนวนคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่คอมบินเนชัน

คู่ไพรเมอร์	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E/M								
E-AAC						*		
E-AAG			*					
E-ACA	*		*			*		*
E-ACC		*						
E-ACG								*
E-ACT						*		
E-AGC	*		*	*		*		
E-AGG								

หมายเหตุ เครื่องหมาย (*) หมายถึงคู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้

ที่มา: จักรพันธ์ และสุจิตรา, 2548



ภาพที่ 9.2 ภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ที่ได้จากการทำ electrophoresis โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 2000 ในภาพเป็นตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี จากการใช้คู่มือพรเมอร์ที่ E-AGC / M-CTC จากแหล่ง อำเภอบะเหลียน จังหวัดตรัง (ที่มา: จักรพันธ์และสุจิตรา, 2548)

ผลการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) และค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic differentiation) ของประชากรกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ เมื่อนำคู่มือพรเมอร์ทั้ง 13 คู่มาวินิจฉัยเอเอฟแอลพีกับตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง ทำให้ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวนมากสามารถคัดเลือกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (Polymorphism) ได้ทั้งสิ้น 126 ตำแหน่ง (Loci) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TFGA พบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง มีค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphism อยู่ในช่วง 62.70 ถึง 91.27 ที่ค่าเฉลี่ย 80.03 แหล่งของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphism สูงที่สุดคือแหล่งอำเภอบลายพระยา จังหวัดกระบี่ มีค่าสูงถึง 91.27 แหล่งที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphism สูงเป็นอันดับต่อมาคือแหล่งเกาะน้อย อำเภอลำลูกเกด จังหวัดกระบี่ มีค่าเท่ากับ 88.33 ลำดับต่อมาคือแหล่งบ้านคลองเตย อำเภอบ้านนาเมือง จังหวัดพังงา และแหล่งอำเภอบะเหลียน จังหวัดตรัง มีค่าเท่ากันคือ 82.54 ลำดับต่อมาคือแหล่งอำเภอบางขัน จังหวัดกระบี่ มีค่า 77.78 และแหล่งที่มีค่าต่ำเปอร์เซ็นต์ Polymorphism ต่ำสุดคือแหล่งเกาะนก อำเภอมือฉ่อง จังหวัดกระบี่ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 62.69 ดังแสดงในตารางที่ 9.3 ส่วนตารางที่ 9.4 แสดงให้เห็นถึงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.263 ถึง 0.334 โดยมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมรวมทุกแหล่งเท่ากับ 0.338 ที่ค่าเฉลี่ย 0.301 แหล่งของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ที่มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดคือแหล่งเกาะน้อย อำเภอลำลูกเกด จังหวัดกระบี่ มีค่าเท่ากับ 0.338 และแหล่งอื่นๆ มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงตามลำดับ ส่วนแหล่งเกาะนก อำเภอลำลูกเกด จังหวัดกระบี่ มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยที่สุดคือมีค่าเท่ากับ 0.263 นอกจากนี้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ระหว่างแหล่ง (F_{ST}) ที่ทำการศึกษามีค่าเท่ากับ 0.082

ตารางที่ 9.3 ค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphic Loci ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง

ลำดับ	ชื่อแหล่ง	จำนวนตัวอย่าง	Polymorphic Loci (%)
			95% Criterion
1	อ.เขาพนม จ.กระบี่	7	77.7778
2	อ.ปะเหลียน จ.ตรัง	10	82.5397
3	อ.ปลายพระยา จ.กระบี่	20	91.2698
4	เกาะนัง อ.เมือง จ.กระบี่	4	62.6984
5	เกาะน้อย อ.อ่าวลึก จ.กระบี่	8	83.3333
6	บ.คลองเตย อ.ทับปุด จ.พังงา	21	82.5397
Average			80.0265

ที่มา: จักรพันธ์และสุจิตรา, 2548

ตารางที่ 9.4 ค่า Genetic diversity ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง

ลำดับ	ชื่อแหล่ง	จำนวนตัวอย่าง	Expected Heterozygosity	F _{st}
1	อ.เขาพนม จ.กระบี่	7	0.2949	
2	อ.ปะเหลียน จ.ตรัง	10	0.2873	
3	อ.ปลายพระยา จ.กระบี่	20	0.3155	
4	เกาะนัง อ.เมือง จ.กระบี่	4	0.2634	
5	เกาะน้อย อ.อ่าวลึก จ.กระบี่	8	0.3341	
6	บ.คลองเตย อ.ทับปุด จ.พังงา	21	0.3128	
Average		11.67	0.3013	
Total		70	0.3384	0.0821

ที่มา: จักรพันธ์และสุจิตรา, 2548

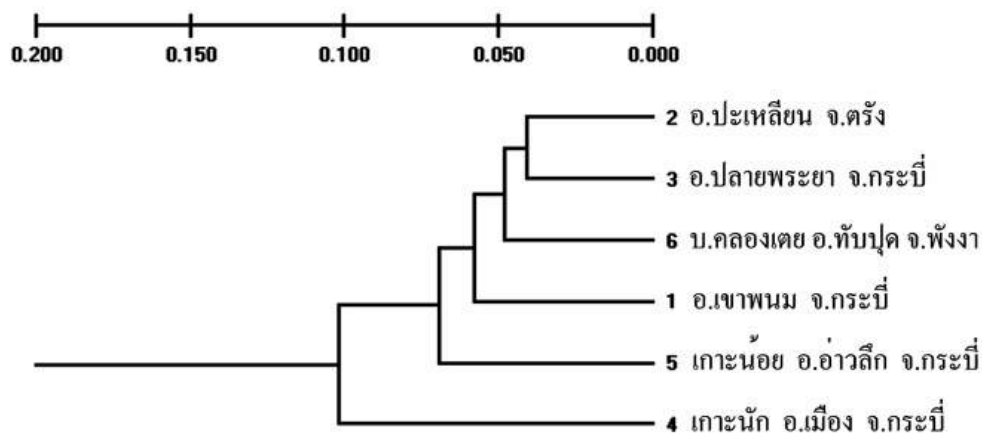
ผลการวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ จากการวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวทางพันธุกรรม (ตารางที่ 9.5) ด้วยเทคนิค Unweigthed Pair Group Method of Arithmetic Average (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม TFGA พบว่าดัชนีความเหมือนอยู่ในช่วงระหว่าง 0.0406 ถึง 0.1015 และสามารถจัดกลุ่มของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่งตามลำดับความสัมพันธ์กันซึ่งแสดงไว้ในภาพที่ 3 กล่าวคือแหล่ง อำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง มีความสัมพันธ์กับ อำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่มากที่สุด โดยมีค่า Genetic Distance รวมเท่ากับ 0.0406 ลำดับถัดมาคือแหล่งบ้านคลองเตย อำเภอบ้านทับปุด จังหวัดพังงา ซึ่งมีความสัมพันธ์ห่างออกมาโดยมี

ค่า Genetic distance รวมกับ 2 แหล่งแรกเท่ากับ 0.0482 ลำดับต่อมาคือแหล่งอำเภอเขาพนม จังหวัดกระบี่ มีค่า Genetic distance รวมกับทั้ง 3 แหล่งแรกเท่ากับ 0.0579 ลำดับต่อมาคือแหล่งเกาะน้อย อำเภอลำลูกเกด จังหวัดกระบี่ มีค่า Genetic distance รวมกับทั้ง 4 แหล่งที่ผ่านมาเท่ากับ 0.0689 และลำดับสุดท้ายซึ่งเป็นแหล่งที่มีความสัมพันธ์กับแหล่งอื่นๆ น้อยที่สุดคือแหล่งเกาะนก อำเภอเมือง จังหวัดกระบี่ มีค่า Genetic distance รวมทั้งหมดเท่ากับ 0.1015 (จักรพันธ์ และ สุจิตรา, 2548)

ตารางที่ 9.5 ค่า Genetic distances และ Identities distance (Nei's, 1973; 1978) ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง

I \ D	1	2	3	4	5	6
1	–	0.0373	0.0259	0.0736	0.0549	0.0452
2	0.9634	–	0.0249	0.0760	0.0428	0.0346
3	0.9744	0.9754	–	0.0786	0.0371	0.0353
4	0.9291	0.9268	0.9244	–	0.0529	0.0660
5	0.9466	0.9581	0.9635	0.9484	–	0.0434
6	0.9558	0.9660	0.9653	0.9361	0.9575	–

ที่มา: จักรพันธ์ และสุจิตรา, 2548



ภาพที่ 9.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง (ที่มา: จักรพันธ์ และสุจิตรา, 2548)

สรุปผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์

จากการศึกษากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง โดยวิเคราะห์ลายพิมพ์เอเอฟแอลพี สามารถคัดเลือกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (Polymorphism) ได้ทั้งสิ้น 126 ตำแหน่ง (Loci) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TFPGA ทำให้ทราบถึงสถานภาพทางพันธุกรรมโดยพบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphism เฉลี่ยเท่ากับ 80.03 โดยพบว่าแหล่งอำเภอลพบุรี จ.พิจิตร มีค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphism สูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 91.27 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยของทุกแหล่งมีค่าเท่ากับ 0.301 ซึ่งแหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงสุดคือแหล่งเกาะน้อย อำเภอลพบุรี จ.พิจิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.334 ในขณะที่แหล่งที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphism ต่ำที่สุดคือแหล่งเกาะนก อำเภอมะนัง จ.พิจิตร มีค่าเท่ากับ 62.70 ซึ่งสอดคล้องกับค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำที่สุดด้วย คือมีค่าเท่ากับ 0.263 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาแล้วพบว่าตัวเลขที่ได้จากการวิเคราะห์นี้ ได้มาจากการประเมินตัวอย่างจากแหล่งเกาะนก อำเภอมะนัง จ.พิจิตร ซึ่งมีจำนวนเพียง 4 ตัวอย่าง เป็นผลมาจากการที่กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่พบเจอในธรรมชาติได้ยากโดยจะพบเจอได้ในบางพื้นที่เท่านั้น การเก็บรวบรวมตัวอย่างในเบื้องต้นจึงเก็บรวบรวมจากศูนย์รวบรวมพันธุ์กล้วยไม้ดังกล่าวและจำนวนตัวอย่างที่น้อยนี้เองอาจส่งผลต่อโอกาสในการตรวจพบความแตกต่างของซินติเอ็นเอหรือโอกาสที่จะพบการเกิดหรือไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง เนื่องจากข้อมูลแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างที่ได้มาจากเทคนิคเอเอฟแอลพีนั้น เกิดขึ้นจากผลของการตัดซินติเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โพลีเมอร์พีเอ็มที่เกิดขึ้นจึงเป็นผลมาจากการเกิดการกลายพันธุ์ของลำดับเบสแล้วเกิดการหายไปของตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะหรืออาจเกิดจากการขาดหายไปหรือเพิ่มเข้ามาของซินส่วนดีเอ็นเอทำให้ซินติเอ็นเอที่ตัดโดยเอนไซม์ตรงตำแหน่งเดียวกันมีขนาดที่ต่างกันได้ และปริมาณความผันแปรของตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ดังกล่าวมีอยู่มากมายแม้ว่าจะจะเป็นสิ่งมีชีวิตที่คล้ายคลึงกันหรือเป็นชนิดเดียวกันก็ตาม ดังนั้นหากทำการศึกษาเกี่ยวกับจำนวนตัวอย่างที่ยังมากขึ้นเท่าใดก็จะยิ่งเพิ่มโอกาสในการพบความผันแปรของตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์มากขึ้นเท่านั้น ทำให้แหล่งที่มีตัวอย่างจำนวนน้อยอาจตรวจพบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ตำแหน่งต่างๆ ได้น้อยกว่าความเป็นจริง (จักรพันธ์ และสุจิตรา, 2548)

การศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับสถานภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีแหล่งต่างๆ โดยแหล่งอำเภอลพบุรี จ.พิจิตร และแหล่งเกาะน้อยอำเภอลพบุรี จ.พิจิตร ซึ่งเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จึงควรใช้พื้นที่ดังกล่าวเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ในถิ่นกำเนิด และควรให้มีการฟื้นฟูความหลากหลายทางพันธุกรรมในพื้นที่อื่นๆ ที่มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ เช่น แหล่งเกาะนก อำเภอมะนัง จ.พิจิตร ได้ อย่างไรก็ตามการพิจารณาการอนุรักษ์พันธุกรรมนอกถิ่นกำเนิด ควรมีการดำเนินการขึ้นด้วย หากแหล่งกระจายพันธุ์ทางธรรมชาติล่อแหลมต่อการบุกรุกและลักลอบใช้ประโยชน์ในทางมิชอบ นอกจากนั้นค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งต่างๆ ($F_{st} = 0.082$) แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่งอยู่ประมาณ 8

เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในระดับที่ไม่สูงนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่มีการกระจายพันธุ์แบบเฉพาะถิ่นอยู่ทางภาคใต้บริเวณจังหวัดตรัง กระบี่ พังงา และบริเวณอื่นๆ ที่มีความใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามความแตกต่างระหว่างประชากรทั้ง 6 แหล่งของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่นี้ พบว่ามีค่าสูงกว่าค่าความแตกต่างที่ได้จากการศึกษาของ Sharma *et al.* (2003) โดยได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดิน *Pterostylis aff. picta* ซึ่งเป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นใกล้สูญพันธุ์ของประเทศออสเตรเลีย จากการศึกษา Allozyme polymorphism พบว่าค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (G_{st}) ของกล้วยไม้ดิน *Pterostylis aff. picta* ทั้ง 9 ประชากร มีค่าเพียง 0.05 ทั้งนี้อาจเพราะว่า Allozyme มีจำนวนตำแหน่งและ Allele ที่จำกัด และอาจเป็นเพราะพื้นฐานทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดนี้เองด้วย เนื่องจากเป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นที่ใกล้สูญพันธุ์ (จักรพันธ์และสุจิตรา, 2548)

ข้อเสนอแนะในการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่

การศึกษาดังกล่าวข้างต้นทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับสถานภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีแหล่งต่างๆ โดยแหล่งอำเภอบลายพระยา จังหวัดกระบี่ และแหล่งเกาะน้อย อำเภอลำทับ จังหวัดกระบี่ ซึ่งเป็นแหล่งที่มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จึงควรใช้พื้นที่ดังกล่าวเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ในถิ่นกำเนิด และควรให้มีการฟื้นฟูความหลากหลายทางพันธุกรรมในพื้นที่อื่นๆ ที่มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ เช่น แหล่งเกาะนักษิ อำเภอมะนิ จังหวัดกระบี่ได้ อย่างไรก็ตามการพิจารณาการอนุรักษ์พันธุกรรมนอกถิ่นกำเนิด ควรมีการดำเนินการขึ้นด้วย หากแหล่งกระจายพันธุ์ทางธรรมชาติเสื่อมต่อการบุกรุกและลักลอบใช้ประโยชน์ในทางมิชอบ นอกจากนั้นค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งต่างๆ ($F_{st} = 0.082$) แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่งอยู่ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในระดับที่ไม่สูงนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่มีการกระจายพันธุ์แบบเฉพาะถิ่นอยู่ทางภาคใต้บริเวณจังหวัดตรัง กระบี่ พังงา และบริเวณอื่นๆ ที่มีความใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามความแตกต่างระหว่างประชากรทั้ง 6 แหล่งของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่นี้ พบว่ามีค่าสูงกว่าค่าความแตกต่างที่ได้จากการศึกษาของ Sharma *et al.* (2003) โดยได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดิน *Pterostylis aff. picta* ซึ่งเป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นใกล้สูญพันธุ์ของประเทศออสเตรเลีย จากการศึกษา Allozyme polymorphism พบว่าค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (G_{st}) ของกล้วยไม้ดิน *Pterostylis aff. picta* ทั้ง 9 ประชากร มีค่าเพียง 0.05 ทั้งนี้อาจเพราะว่า Allozyme มีจำนวนตำแหน่งและ Allele ที่จำกัด และอาจเป็นเพราะพื้นฐานทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดนี้เองด้วย เนื่องจากเป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นที่ใกล้สูญพันธุ์ (จักรพันธ์ และ สุจิตรา, 2548)

บทที่ 10

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์

คำนำ

ไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) เป็นไม้มีค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์ของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) อย่างแพร่หลาย ทั้งในรูปของการใช้ประโยชน์จากเนื้อไม้ที่มีสีสันทนและลวดลายสวยงามจนถือได้ว่าเป็นไม้ที่มีราคาแพงที่สุดชนิดหนึ่งในตลาดโลก ทำให้ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ในประเทศไทยกำลังเผชิญกับสถานะที่ล่อแหลมต่อการสูญพันธุ์และมีผลกระทบต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม ในปัจจุบันมีการลักลอบตัดไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และป่าสงวน มากขึ้น (น้ำชาติ, 2551) ซึ่ง IUCN (2006) ได้จัดไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) อยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (Vulnerable) และได้บรรจุบัญชีแนบท้ายของอนุสัญญาการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ Annex II (CITES) COP 16 ปี 2556 ดังนั้นการอนุรักษ์พันธุกรรมของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จึงเป็นกิจกรรมที่สำคัญและเร่งด่วน อย่างไรก็ตามในการอนุรักษ์พันธุกรรมของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) อย่างมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องทราบสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ซึ่งทั้งนี้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ หรือที่เรียกว่า simple sequence repeat (SSR) เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมอย่างหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยมใช้มีลำดับเบสซ้ำเรียงตัวกันประมาณ 1-6 นิวคลีโอไทด์ โดยมีการซ้ำติดต่อกันไปเรื่อยๆ เป็นช่วงยาวตั้งแต่ 2 ซ้ำขึ้นไป มีการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (Litt and Luty, 1989; Handcock, 1999) ปัจจุบันไมโครแซทเทลไลท์เป็นดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ ที่นิยมใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม เพราะให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงและแสดงให้เห็นสภาพข่มร่วมกัน จึงมีประโยชน์ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม ระบบการสืบพันธุ์ การเคลื่อนย้ายและการถ่ายเทของยีนระหว่างประชากร

ในการศึกษาไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ครั้งนี้ สุจิตรา และคณะ (2561) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ในประเทศไทยและเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากแหล่งต่างๆในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาการอนุรักษ์พันธุกรรมของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ในประเทศไทย ตลอดจนเป็นฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) เพื่อใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยต้นพันธุ์และแหล่งที่มาเพื่อป้องกันการลักลอบตัดไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) และเพิ่มประสิทธิภาพในการอนุรักษ์ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ในอนาคต

วิธีการศึกษาวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างใบของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ในแหล่งต่างๆ

สุจิตรา และคณะ (2561) ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างใบของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากป่าธรรมชาติและป่าปลูก 12 แหล่ง ดังแสดงในตารางที่ 10.1

ตารางที่ 10.1 ตัวอย่างไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) จากแหล่งต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

แหล่งที่มา	จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง
อุทยานแห่งชาติผาแต้ม	อุบลราชธานี	29
อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย	อุบลราชธานี	23
อุทยานแห่งชาติภูผาเหล็ก	สกลนคร	28
อุทยานแห่งชาติภูพาน	สกลนคร	28
อุทยานแห่งชาติภูผายล	สกลนคร	29
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว	บึงกาฬ	32
อุทยานแห่งชาติภูเก้า-ภูพานคำ	หนองบัวลำภู	29
อุทยานแห่งชาติภูเวียง	ขอนแก่น	30
อุทยานแห่งชาติตาดโตน	ชัยภูมิ	32
พื้นที่ป่าปลูกไม้พะยูน	ตรัง	31
หน่วยป้องกันรักษาป่าที่ สบ. 1 (ท่ามะปราง)	สระบุรี	32
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่	บุรีรัมย์	30

ที่มา: สุจิตราและคณะ, 2561

2. การสกัด วัตถุคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

สุจิตรา และคณะ (2561) ได้นำตัวอย่างใบอ่อนของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ตามตารางที่ 10.1 มาล้างเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่บริเวณผิวใบแล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีการสกัดของ (Doyle and Doyle, 1990) และ (Changtragoon *et al.*, 1996a) แล้วนำมาละลายใน 1X TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 50-100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส วัตถุคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8% และนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb แล้วบันทึกภาพ

3. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

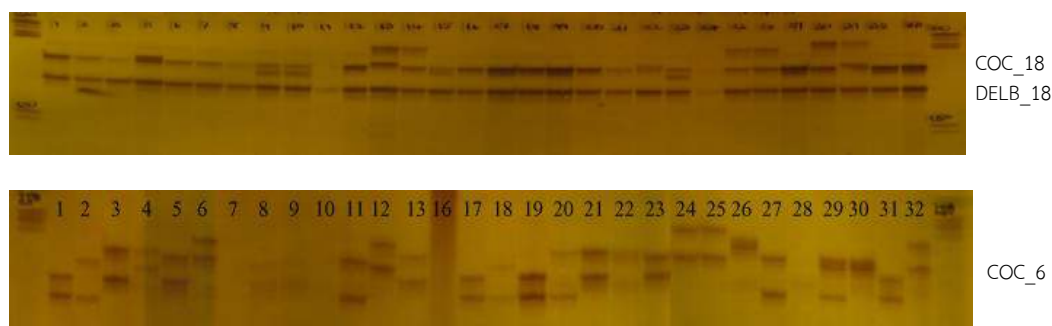
สุจิตรา และคณะ (2561) ได้นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรมาวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด (สุจิตราและคณะ, 2552; Hartvig *et al.*, 2017) คือ forward และ reverse โดยใช้ Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany) นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรมดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ที่อุณหภูมิ

50 หรือ 55 หรือ 60 องศาเซลเซียส ตามอุณหภูมิของ annealing ของไพรเมอร์ 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 วินาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ตัวกลางชนิด non-denaturing polyacrylamide gel ภายใต้เครื่อง Gel-scan 3000 ที่ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ 6 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.6X TBE buffer ที่ผสมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ผ่านกระแสไฟฟ้า 1,000 โวลต์ นาน 45 นาที เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

หลังจากนั้นวิเคราะห์จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (number of allele per locus, N) จำนวน อัลลีลต่อตำแหน่งที่แท้จริง (effective number of allele, n_e) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) การทดสอบสมดุลฮาร์ดี – ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) และการจัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) และ TFGPA version 1.3 (Miller, 1997)

ผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์

จากที่ สุจิตราและคณะ (2561) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) โดยใช้เครื่องหมาย DNA ชนิด microsatellite จำนวน 11 ตำแหน่ง ซึ่งตัวอย่างของความแตกต่างลักษณะทางพันธุกรรมในตัวอย่างที่ศึกษาได้แสดงใน ภาพที่ 10.1 พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากหน่วยป้องกันรักษาป่าที่ สบ.1 (ท่ามะปราง) จ.สระบุรี มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด กล่าวคือ มีค่า $H_e = 0.63$ ในขณะที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากอุทยานแห่งชาติภูพานจังหวัดสกลนคร มีค่าต่ำกว่าแหล่งอื่นโดยมีค่า $H_e = 0.29$ โดยที่ค่าเฉลี่ยของความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ทั้ง 12 แหล่งมีค่า $H_e = 0.39$ รายละเอียดดังแสดงใน ตารางที่ 10.3 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร (F_{is}) ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรทั้งหมด (F_{it}) และค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (F_{st}) ของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) เฉลี่ยทุกตำแหน่งมีค่าเท่ากับ 0.17, 0.31 และ 0.18 ตามลำดับ รายละเอียดแสดงใน ตารางที่ 10.4



ภาพที่ 10.1 รูปแบบความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมตัวอย่างประชากรไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่ตำแหน่ง DELB_18, COC_6 และ COC_18 (ที่มา: สุจิตรา และ คณะ, 2561)

ตารางที่ 10.2 แสดงจำนวนค่าเฉลี่ยอัตราผลตอบแทนในประชากรไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*)

ประชากร	จำนวนอัตราผลตอบแทน											ค่าเฉลี่ย อัตราต่อ ประชากร
	COC_05	COC_06	COC_07	COC_08	COC_11	COC_13	COC_18	DL4	DELB_18	Delb_57	Delb_120	
อุทยานแห่งชาติผาแต้ม	3	10	2	7	4	7	8	2	1	1	2	4.3
อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย	4	10	2	6	4	5	6	3	2	1	2	4.1
อุทยานแห่งชาติภูผาเหล็ก	6	6	5	5	3	4	5	1	3	1	2	3.7
อุทยานแห่งชาติภูพาน	4	6	3	6	4	3	6	3	2	1	3	3.7
อุทยานแห่งชาติภูผายล	2	10	3	7	5	4	6	2	1	1	2	3.9
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว	3	3	3	4	4	5	6	2	1	1	3	3.2
อุทยานแห่งชาติภูเก้า-ภูพานคำ	3	4	3	5	2	2	7	2	2	1	1	2.9
อุทยานแห่งชาติภูเวียง	2	3	3	5	2	4	7	2	2	1	1	2.9
อุทยานแห่งชาติดาดโตน	2	6	4	6	3	6	4	2	2	1	4	3.6
พื้นที่ป่าลูกไม้พะยุง	2	4	2	7	5	4	4	1	1	1	3	3.1
หน่วยป้องกันรักษาป่าที่ สบ. 1 (ท่ามะปราง)	6	3	10	6	7	9	8	5	3	1	3	5.6
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่	7	3	8	9	4	8	9	3	3	1	1	5.1
เฉลี่ย	3.7	5.7	4	6.1	3.9	5.1	6.3	2.3	1.9	1	2.3	3.8

ที่มา: สุจิตราและคณะ, 2561

ตารางที่ 10.3 แสดงค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหวัง (H_e) ในประชากรไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*)

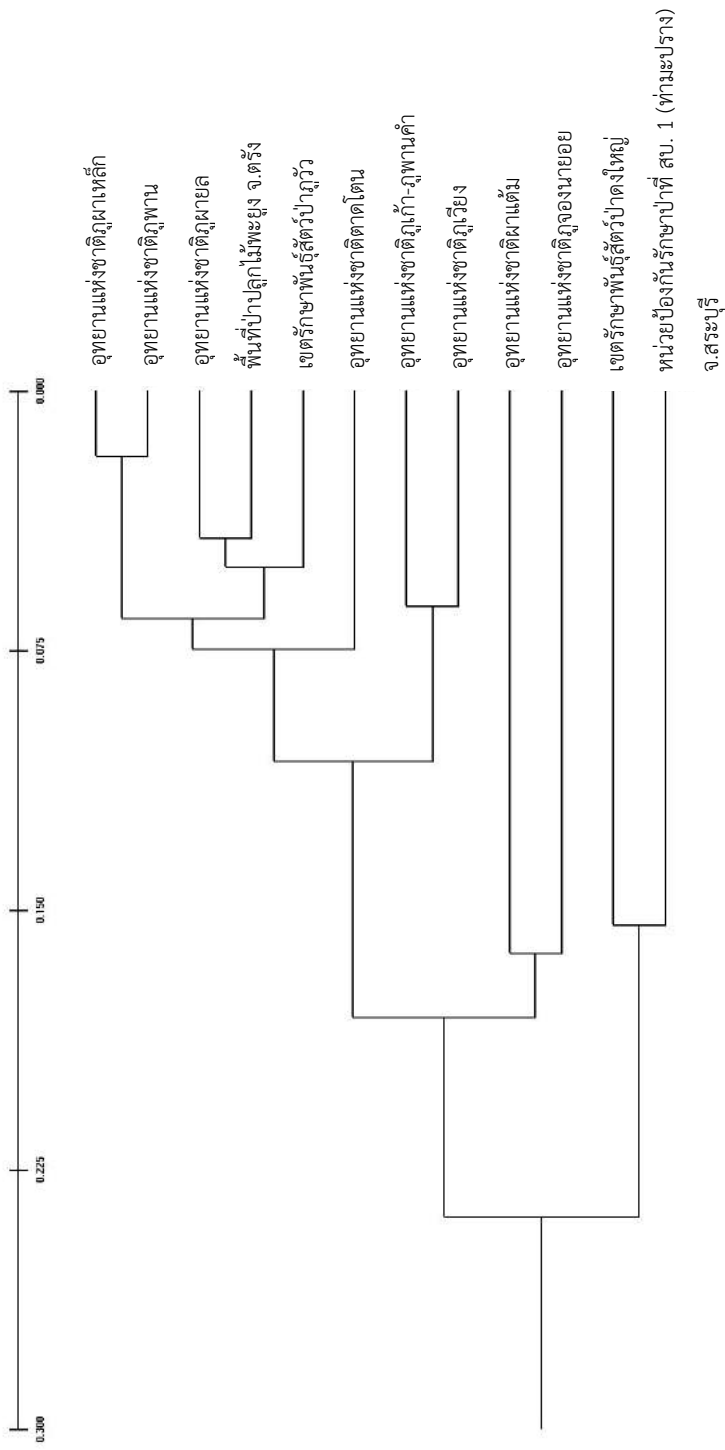
ประชากร	ค่าเฉลี่ย (Heterozygosity)		Polymorphic loci (%)
	H_o	H_e	
1. อุทยานแห่งชาติผาแต้ม จ.อุบลราชธานี	0.3574	0.3634	81.82
2. อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย จ.อุบลราชธานี	0.3515	0.4592	90.91
3. อุทยานแห่งชาติภูผาเหล็ก จ.สกลนคร	0.2715	0.3461	81.82
4. อุทยานแห่งชาติภูพาน จ.สกลนคร	0.2726	0.2944	90.91
5. อุทยานแห่งชาติภูผายล จ.สกลนคร	0.2888	0.3349	81.82
6. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จ.บึงกาฬ	0.2707	0.3019	81.82
7. อุทยานแห่งชาติภูเก้า-ภูพานคำ จ.หนองบัวลำภู	0.2703	0.3329	81.82
8. อุทยานแห่งชาติภูเวียง จ.ขอนแก่น	0.3939	0.3869	81.82
9. อุทยานแห่งชาติตาคลี จ.ชัยภูมิ	0.3701	0.4008	90.91
10. พื้นที่ป่าปลูกไม้พะยุง จ.ตรัง	0.2353	0.3158	72.73
11. หน่วยป้องกันรักษาป่าที่ สบ. 1 (ท่ามะปราง) จ.สระบุรี	0.3381	0.6251	90.91
12. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ จ.บุรีรัมย์	0.3712	0.4867	81.82
เฉลี่ย	0.3160	0.3873	77.27

ที่มา: สุจิตราและคณะ, 2561

ตารางที่ 10.4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) ในแต่ละตำแหน่งของไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*)

ตำแหน่ง	F_{it}	F_{st}	F_{is}
COC_05	0.1920	0.1035	0.0987
COC_06	0.1947	0.1604	0.0409
COC_07	0.3666	0.1985	0.2098
COC_08	0.2685	0.1632	0.1258
COC_11	0.1786	0.1413	0.0433
COC_13	0.2156	0.1115	0.1171
COC_18	0.1439	0.1131	0.0347
DL4	0.9729	0.3862	0.9559
DELB_18	0.4417	0.2442	0.2613
Delb_57	0.0000	0.0000	0.0000
Delb_120	0.3687	0.2011	0.2099
ค่าเฉลี่ย	0.3118	0.1750	0.1659

ที่มา: สุจิตราและคณะ, 2561



ภาพที่ 10.2 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*) 12 ประชากรในประเทศไทย จากการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA (ที่มา: สุจิตราและคณะ, 2561)

สรุปผลการศึกษาวิจัย

จากผลการศึกษาพบว่า ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากหน่วยป้องกันรักษาป่าที่ สบ.1 (ท่ามะปราง) จ.สระบุรี มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด กล่าวคือ มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ($H_e = 0.63$) ในขณะที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากอุทยานแห่งชาติภูพานจังหวัดสกลนคร มีค่าต่ำกว่าแหล่งอื่นโดยมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ($H_e = 0.29$) โดยที่ค่าเฉลี่ยของความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ทั้ง 12 แหล่งมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ($H_e = 0.39$) และความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง (F_{st}) ของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) พบว่ามีค่า $F_{st} = 0.18$ (สุจิตรา และคณะ, 2561)

ข้อเสนอแนะ

เมื่อพิจารณาจากประชากรของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ทั้ง 12 ประชากร พบว่าประชากรของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากหน่วยป้องกันรักษาป่าที่ สบ. 1 (ท่ามะปราง) จังหวัดสระบุรี (ภาคกลาง) มีความเหมาะสมในการเลือกเป็นตัวแทนสำหรับการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิด (*In situ* gene Conservation) เนื่องจากมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าค่าเฉลี่ยและสูงกว่าประชากรไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากแหล่งอื่นๆ ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากอุทยานแห่งชาติภูจองนายอย จังหวัดอุบลราชธานี (ภาคอีสานตอนบน) อุทยานแห่งชาติตาคลี จังหวัดชัยภูมิ (ภาคอีสานตอนบน) และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ จังหวัดบุรีรัมย์ (ภาคอีสานตอนล่าง) ควรได้รับการพิจารณาเป็นแหล่งอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิดเช่นกัน เนื่องจากมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าค่าเฉลี่ยของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่ศึกษา โดยมีค่า $H_e = 0.46, 0.40$ และ 0.49 ตามลำดับ ผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีข้อเสนอแนะให้จัดทำแหล่งอนุรักษ์ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ในถิ่นกำเนิดในพื้นที่ภาคกลาง 1 แหล่ง ภาคอีสานตอนบน 2 แหล่ง และภาคอีสานตอนล่าง 1 แหล่ง ตามแหล่งดังกล่าวข้างต้นตามลำดับ

นอกจากนี้ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าค่าเฉลี่ยคือ แหล่งไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากอุทยานแห่งชาติผาแต้มในจังหวัดอุบลราชธานี อุทยานแห่งชาติภูผาเหล็ก อุทยานแห่งชาติภูพาน อุทยานแห่งชาติภูผายล ในจังหวัดสกลนคร เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จังหวัดบึงกาฬ อุทยานแห่งชาติภูเก้า-ภูพานคำ จังหวัดหนองบัวลำภู อุทยานแห่งชาติภูเวียง จังหวัดขอนแก่น ควรมีการพิจารณาการจัดการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดและมีการฟื้นฟูป่าไม้ในอุทยานดังกล่าว อย่างไรก็ตามจะต้องมีการพิจารณาข้อมูลด้านอื่นร่วมด้วย เช่น ภัยคุกคามของการบุกรุกทำลายป่าแต่ละแหล่งอาจมีความล่อแหลมและความรุนแรงแตกต่างกัน ตลอดจนจำนวนต้นของไม้พะยูนที่เหลืออยู่ในป่าแต่ละแห่ง และการออกดอกออกผลของไม้พะยูนที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งจะต้องนำมาพิจารณาประกอบการดำเนินการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดและการฟื้นฟูป่า (สุจิตราและคณะ 2561)

บทที่ 11

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแหล่งที่มาของไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*) ในประเทศไทย

คำนำ

ไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*) เป็นไม้มีค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ปัจจุบันไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ในประเทศไทยกำลังเผชิญกับสถานะที่ล่อแหลมต่อการสูญพันธุ์ เพราะมีความต้องการสูงจึงทำให้การลักลอบตัดไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) มากขึ้น ดังนั้นการประเมินสภาพแหล่งพันธุกรรมของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) จึงมีความสำคัญต่อการวางแผนการอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุกรรมของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ข้อมูลความแตกต่างจากรูปแบบดีเอ็นเอในแต่ละพื้นที่ จากการศึกษาด้วยส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม สามารถใช้เป็นแนวทางในการระบุแหล่งที่มาของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ลักลอบได้ ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อผลการพิสูจน์ไม้ลักลอบเพื่อใช้เป็นหลักฐานในการดำเนินคดี ทั้งนี้เพื่อให้สอดคล้องกับมาตรการป้องกันรักษาทรัพยากรป่าไม้และสัตว์ป่าของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ในด้านการใช้เครื่องมือและเทคโนโลยีที่ทันสมัย ให้สามารถตรวจสอบหลักฐานและสถานการณ์ได้รวดเร็ว แม่นยำ เพื่อนำผลการพิสูจน์มาใช้เป็นหลักฐานการดำเนินคดีได้ ในการตรวจสอบชนิดพันธุ์ของพืชป่าด้วยข้อมูลด้านดีเอ็นเอ ในอดีต สุจิตรา (2552) มีประสบการณ์ในการจำแนกไม้มยหิน (*Chukrasia tabularis* และ *C. velutina*) ด้วยยีนฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรส (phosphoglucose isomerase) ซึ่งสามารถจำแนกแหล่งไม้มยหินในจังหวัดเชียงใหม่และลำปางออกจากแหล่งไม้มยหินที่มีการกระจายพันธุ์ในพื้นที่อื่นๆ เช่น จังหวัดขอนแก่น จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จังหวัดราชบุรี และจังหวัดอุตรดิตถ์

การจัดทำฐานข้อมูลพันธุกรรมของความแตกต่างจากรูปแบบดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จีโนมในแต่ละพื้นที่เพื่อใช้ในการระบุแหล่งที่มาของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) การหาความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอในพื้นที่ต่างๆ สามารถใช้เป็นข้อมูลด้านพันธุกรรมเบื้องต้นในการแสดงความเป็นเอกลักษณ์ของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ในแต่ละต้นและสามารถแสดงแหล่งกำเนิดของไม้ ซึ่งจะช่วยในการพิสูจน์หลักฐานเพื่อพิจารณาคดีต่อผู้กระทำผิดได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ (สุจิตรา และคณะ 2562)

วิธีการศึกษาวิจัย

สุจิตรา และคณะ (2562) ได้สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบและเปลือกตามตารางที่ 11.1 ด้วยวิธี Doyle and Doyle (1990) แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) ในส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non-coding region) จากไพรเมอร์ที่มีโพลิเมอร์ฟิซึม จำนวน 3 คู่ได้แก่ trnS-trnG (trnS: 5' GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC 3' trnG: 5' GAA

CGA ATC ACA CTT TTA CCA C 3') จาก Halmilton (1999), trnV-trnM (trnV: 5' TAC CTA CTA TTG GAT TTG AAC C 3' trnM: 5' GCT ATA CGG GCT CGA ACC 3') จาก Demesure *et al.* (1995) และ trnC-petN1R (trnC: 5' CCA GTT CAA ATC TGG GTG TC 3' petN1R: 5' CCC AAG CAA GAC TTA CTA TAT CC 3') จาก Kress *et al.* (2005) ของคลอโรพลาสต์จีโนม บริเวณของอินทรีและอินทรีจันทรเขาสเปเซอร์ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่เป็นสากล (universal primer) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นประมาณ 20-50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรสารละลายไพรเมอร์ทั้งฟอเวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) และ รีเวิร์ดไพรเมอร์ (reverse primer) ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 10 เท่า (10x reaction buffer : 100mM Tris-HCL pH8.3, 15mM MgCl₂, 500mM KCl) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่พี (dNTP mix: dATP dCTP dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Taq DNA polymerase 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร (RBC Taq DNA Polymerase) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์ และตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมเจลด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ เพื่อดูผ่านแสงอัลตราไวโอเลต โดยเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb DNA ladder) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณเรียบร้อยแล้วมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอ (haplotype) ในแต่ละพื้นที่ ประชากรของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่ใช้ศึกษา

ตารางที่ 11.1 ตัวอย่างใบและเปลือกไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) ที่ใช้ในการศึกษา

แหล่ง/ประชากร ที่ใช้ศึกษา	ภูมิภาค	ชื่อแหล่ง/ประชากร	ขนาดของตัวอย่างต่อ แหล่ง/ประชากร
1.อมวกเหล็ก, จ.สระบุรี	ภาคกลาง	MN/SB	10
2.อช.ตาพระยา จ.บุรีรัมย์	อีสานตอนล่าง	TP/BR	11
3.ป่าดงนาทาม, จ.อุบลราชธานี	อีสานตอนล่าง	DT/UB	10
4.อช.ภูผาเทิบ, จ.มุกดาหาร	ภาคอีสานตอนบน	PPT/MD	11
5.อช.ภูผาเหล็ก, จ.สกลนคร	ภาคอีสานตอนบน	PL/SK	11
6.ป่าโคกคาม อ.ชื่นชม จ.มหาสารคาม	ภาคอีสานตอนบน	PKK/MK	11
7.ป่าโคกตงเต็ง อ.นาตาล จ.มหาสารคาม	ภาคอีสานตอนบน	ND/MK	12
8.อช.ภูแลนคา จ.ชัยภูมิ	อีสานตอนล่าง	PLK/CP	12
9.สถานีวัฒนวิชัย, จ.กำแพงเพชร	ภาคกลาง	VK/KP	10
10.อช.ภูเก้าภูพานคำ จ.หนองบัวลำภู	ภาคอีสานตอนบน	PK/NP	10
11.บ้านหุโตน จ.ตรัง (ป่าปลูก)	ภาคใต้	BT/T	10
12.อช.ผาแต้ม จ.อุบลราชธานี	อีสานตอนล่าง	PT/UB	11
13.อช.ภูจองนายอย, จ.อุบลราชธานี	อีสานตอนล่าง	PJ/UB	10
14.อ.แก่งคอย, จ.สระบุรี	ภาคกลาง	KK/SB	10
15.อช.ภูเวียง จ.ขอนแก่น	ภาคอีสานตอนบน	PV/KK	9
16.อช.ภูผายล จ.สกลนคร	ภาคอีสานตอนบน	PY/SK	10
17.อช.ภูพาน จ.สกลนคร	ภาคอีสานตอนบน	PP/SK	7
18.ขสป. ภูว้ จ.บึงกาฬ	ภาคอีสานตอนบน	PW/BK	7
19.ขสป. ดงใหญ่ จ.บุรีรัมย์	อีสานตอนล่าง	BD/BR	9
20.อช.ตาตไน จ.ชัยภูมิ	อีสานตอนล่าง	TT/CP	7
รวม			198

ที่มา: สุจิตรา และ คณะ, 2562

ผลการศึกษาวิจัย

จากการศึกษารั้วนี้ สุจิตรา และคณะ (2562) ได้พบว่ารูปแบบดีเอ็นเอที่พบมีทั้งหมด 13 รูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 11.2 และภาพที่ 11.1 โดยรูปแบบดีเอ็นเอในไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ในแหล่งธรรมชาติของภูมิภาคกลางมีรูปแบบ ดีเอ็นเอที่แตกต่างจากรูปแบบดีเอ็นเอของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ในภาคอีสานอย่างสิ้นเชิง และพบว่ารูปแบบดีเอ็นเอในไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่เป็นป่าปลูกในเขตภาคกลางคือที่จังหวัดกำแพงเพชรและในภาคใต้ที่จังหวัดตรังมีรูปแบบดีเอ็นเอสอดคล้องประชากรพะยูน (*D. cochinchinensis*) ในจังหวัดทางภาคอีสาน

ในการศึกษารั้วนี้สามารถสรุปผลเบื้องต้นได้ว่า พบรูปแบบดีเอ็นเอรูปแบบที่1 (H1) ในพื้นที่ภาคอีสานทุกจังหวัดที่ทำการศึกษา รูปแบบดีเอ็นเอที่2 (H2) พบในจังหวัดมหาสารคามและมุกดาหาร รูปแบบดีเอ็นเอที่3 (H3) พบเฉพาะในจังหวัดสระบุรี รูปแบบดีเอ็นเอที่4 (H4) พบในจังหวัดทางภาคอีสานตอนบน (ขอนแก่น บึงกาฬ และมุกดาหาร) รูปแบบดีเอ็นเอที่5 (H5) พบเฉพาะในจังหวัดสระบุรี รูปแบบดีเอ็นเอที่

6 (H6) พบในจังหวัดบุรีรัมย์และมหาสารคาม รูปแบบดีเอ็นเอที่ 7 (H7) พบในจังหวัดบุรีรัมย์ รูปแบบดีเอ็นเอที่ 8 (H8) พบในจังหวัดมหาสารคาม รูปแบบดีเอ็นเอที่ 9 (H9) พบในจังหวัดอุบลราชธานี รูปแบบดีเอ็นเอที่ 10 (H10) พบในจังหวัดมหาสารคาม รูปแบบดีเอ็นเอที่ 11 (H11) พบในจังหวัดชัยภูมิ รูปแบบดีเอ็นเอที่ 12 (H12) พบในจังหวัดบุรีรัมย์ และรูปแบบดีเอ็นเอที่ 13 (H13) พบในจังหวัดอุบลราชธานี จากข้อมูลเบื้องต้นทำให้ทราบได้ว่ารูปแบบดีเอ็นเอในไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีรูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะกับจังหวัดและไม่พบในจังหวัดอื่นดังนี้

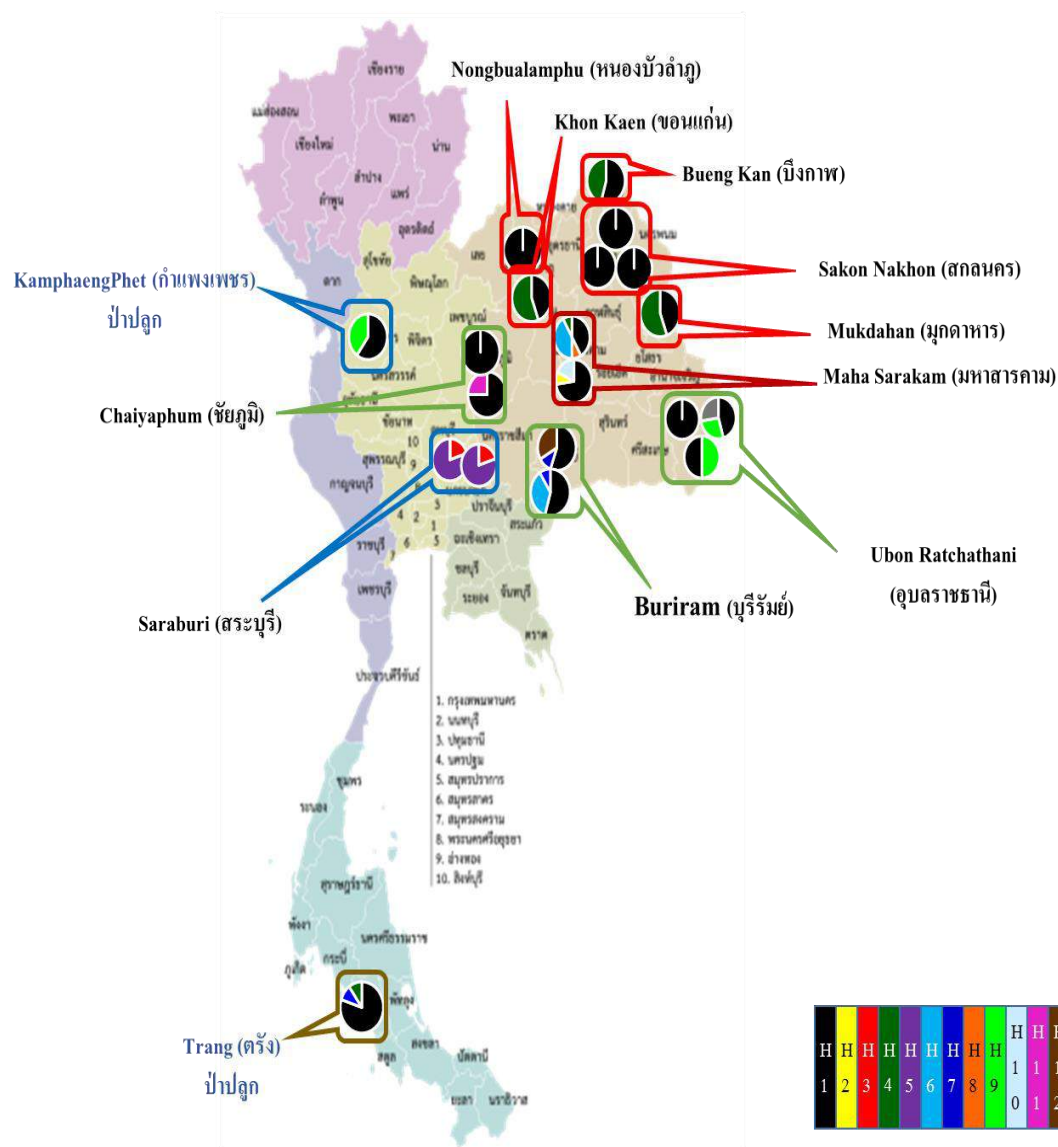
1. ในจังหวัดสระบุรีคือ มีรูปแบบดีเอ็นเอที่ 3 (H3) และ รูปแบบดีเอ็นเอที่ 5 (H5)
2. ในจังหวัดมหาสารคาม มีรูปแบบดีเอ็นเอที่ 8 (H8) และ รูปแบบดีเอ็นเอที่ 10 (H10)
3. ในจังหวัดชัยภูมิ มีรูปแบบดีเอ็นเอที่ 11 (H11)
4. ในจังหวัดบุรีรัมย์ มีรูปแบบดีเอ็นเอที่ 12 (H12) และรูปแบบดีเอ็นเอที่ 7 (H7)
5. ในจังหวัดอุบลราชธานี มีรูปแบบดีเอ็นเอที่ 9 (H9) และ รูปแบบดีเอ็นเอที่ 13 (H13)

นอกจากนี้ยังพบว่ามีรูปแบบดีเอ็นเอที่ 4 (H4) พบในภาคอีสานตอนบน ที่จังหวัดกำแพงเพชรและจังหวัดตรังไม่ได้มาจากพะยูน (*D. cochinchinensis*) ในจังหวัดสระบุรีนั้น ไม้ป่าปลูกที่ปลูกในจังหวัดกำแพงเพชรมีรูปแบบของดีเอ็นเอ H9 ซึ่งเหมือนกับรูปแบบดีเอ็นเอของจังหวัดอุบลราชธานี ส่วนป่าปลูกในจังหวัดตรังนั้นมีรูปแบบดีเอ็นเอเหมือนกับจังหวัดบุรีรัมย์ มหาสารคาม ขอนแก่นและบึงกาฬ แสดงดังตารางที่ 11.2 และ ภาพที่ 11.1 ทั้งนี้ยังต้องมีการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอของประชากรเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่แม่นยำมากขึ้น (สุจิตรา และ คณะ 2562)

ตารางที่ 11.2 แฮปไทป์โดยการวิเคราะห์รวมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากส่วน trnS-trnG, trnV-trnM และ trnC-petN1R เข้าด้วยกันในไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*)

haplotype	Central			Lower North Eastern							Upper North Eastern									Sout h
	MN/ SB	KK/ SB	VK/ KP	TP/ BR	BD/ BR	DT/ UB	PT/ UB	PJ/ UB	PIK/ CP	TT/ CP	PL/ SK	PY/ SK	PP/ SK	PKK/ MK	ND/ MK	PK/ NP	PV/ KK	PW/ BK	PPT/ MD	
H1	-	-	6	6	5	5	5	10	9	7	11	10	7	8	5	9	4	6	6	8
H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	5	-
H3	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	5	1	-	1
H5	8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-
H7	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
H9	-	-	4	-	-	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
H11	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H12	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	112	-	-	-	-	-	-	-	-
H13	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	10	10	10	11	9	10	11	10	12	8	11	10	8	11	12	9	9	7	11	10

ที่มา: สุจิตรา และ คณะ, 2562



ภาพที่ 11.1 รูปแบบดีเอ็นเอของไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*) ที่พบในพื้นที่ต่างๆที่ใช้ในการศึกษา (ที่มา: สุจิตรา และ คณะ, 2562)

สรุปผลการศึกษาวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. จากผลการศึกษาสรุปได้ว่ารูปแบบดีเอ็นเอที่พบในไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ในแหล่งธรรมชาติของมีภาคกลางมีรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากรูปแบบดีเอ็นเอของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ในภาคอีสานอย่างสิ้นเชิง และพบว่ามีรูปแบบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะถิ่นคือ รูปแบบดีเอ็นเอที่ 4 พบเฉพาะจังหวัดในภาคอีสานตอนบน รูปแบบดีเอ็นเอที่ 9 พบเฉพาะที่จังหวัดอุบลราชธานี รูปแบบดีเอ็นเอที่ 7 และ 12 พบเฉพาะที่จังหวัดบุรีรัมย์ รูปแบบดีเอ็นเอที่ 11 พบเฉพาะที่จังหวัดชัยภูมิ รูปแบบดีเอ็นเอที่ 3 พบเฉพาะจังหวัดสระบุรี และรูปแบบดีเอ็นเอที่ 2 10 และ 8 พบเฉพาะที่จังหวัดมหาสารคาม ผลของรูปแบบดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถใช้แยกแหล่งที่มาของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ได้

2. รูปแบบของดีเอ็นเอของป่าปลูกในจังหวัดกำแพงเพชรเหมือนกับรูปแบบดีเอ็นเอในจังหวัดอุบลราชธานีและรูปแบบดีเอ็นเอของป่าปลูกในจังหวัดตรังมีรูปแบบดีเอ็นเอเหมือนกับป่าในจังหวัด บุรีรัมย์ มหาสารคาม ขอนแก่นและบึงกาฬ ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้รองรับการพิสูจน์แหล่งที่มาของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่ถูกลักลอบตัดที่ผิดกฎหมายได้ในอนาคต

3. ควรมีการขยายผลรูปแบบดีเอ็นเอ (Haplotype) เพื่อจัดทำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ระบุแหล่งที่มาของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ในประเทศเพื่อนบ้าน เช่น สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว กัมพูชา และเวียดนาม เพื่อการวินิจฉัยแหล่งที่มาของไม้ที่ผิดกฎหมายที่อาจถูกตัดจากประเทศไทย (สุจิตรา และคณะ, 2562)

บทที่ 12

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*)

ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์

คำนำ

ปัจจุบันป่าไม้ในประเทศไทยถูกทำลายเป็นจำนวนมาก หนึ่งในต้นเหตุสำคัญมาจากการลักลอบตัดไม้ของนายทุน เห็นได้จากสถิติคดีของไม้พะยุงที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากไม้พะยุงเป็นไม้มีค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทำให้เป็นที่ต้องการของนายทุนเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้ไม้พะยุงในธรรมชาติลดจำนวนลงและเหลือน้อยนายทุนจึงเริ่มเบนความสนใจไปไม้ชิงชัน สาเหตุที่เป็นไม้ชิงชันเพราะไม้ชิงชันมีลักษณะและสีของไม้คล้ายกับไม้พะยุง และอยู่ในระดับราคาที่สามารถทำให้ตลาดเติบโตและทำกำไรได้มาก ทำให้ในอนาคตไม้ชิงชันในธรรมชาติอาจมีแนวโน้มที่จะลดจำนวนลงและเหลือน้อยเช่นเดียวกับไม้พะยุง อย่างไรก็ตามในการอนุรักษ์พันธุกรรมของไม้ชิงชันอย่างมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องทราบสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ชิงชัน ทั้งนี้ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ หรือที่เรียกว่า simple sequence repeat (SSR) เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมอย่างหนึ่ง ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเรียงตัวกันประมาณ 1-6 นิวคลีโอไทด์ โดยมีการซ้ำติดต่อกันไปเรื่อยๆ เป็นช่วงยาวตั้งแต่ 2 ซ้ำขึ้นไป มีกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (Litt and Luty, 1989; Handcock, 1999) ปัจจุบันไมโครแซทเทลไลต์เป็นดีเอ็นเอ มาร์กเกอร์ ที่นิยมในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม เพราะให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง

Hartvig *et al.* (2017) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรไม้พะยุงและไม้ชิงชัน มีข้อมูลว่าไม้ชิงชันถูกพบในหลายจังหวัดของราชอาณาจักรกัมพูชา และในพื้นที่อนุรักษ์ทางใต้ของสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม (CTSP, 2004) นอกจากนี้มีรายงานว่าพบในบางจังหวัดของประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวและเมียนมาร์ (Van Sam *et al.*, 2004; USNH, 2003) ดังนั้นเพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมในการวางแผนการอนุรักษ์พันธุกรรมและการฟื้นฟูไม้ชิงชันซึ่งพบว่าการกระจายพันธุ์ของไม้ชิงชันโดยทั่วไปในป่าเบญจพรรณในแถบทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออกของประเทศไทย สุจิตรา และคณะ (2564) จึงได้มีศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อใช้ประเมินสภาพแหล่งพันธุกรรมของไม้ชิงชัน ช่วยเป็นแนวทางในการคัดเลือกแหล่งพันธุกรรม เพื่อการอนุรักษ์และฟื้นฟูไม้ชิงชันได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

วัสดุและวิธีการศึกษาวิจัย

สุจิตรา และคณะ (2564) ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างใบและเนื้อไม้ของไม้ชิงชันจากป่าธรรมชาติ ดังแสดงใน ตารางที่ 12.1 นำตัวอย่างใบและเนื้อไม้ของไม้ชิงชันมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ประยุกต์ของ (Doyle and Doyle, 1990) และ (Changtragoon *et al.*, 1996a) วัดคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) และนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb

สุจิตรา และคณะ (2564) ได้นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด ไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ OLI5, OLI6, OLI14, OLI15, OLI16, OLI17, OLI19, COC6, COC7 (Hartvig *et al.*, 2017) และ DL4 (สุจิตราและคณะ, 2552) แสดงใน ตารางที่12.2 โดยใช้ Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany) นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรม ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที, 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, ที่อุณหภูมิระหว่าง 55 ถึง 58 องศาเซลเซียส ตามอุณหภูมิของ annealing ของไพรเมอร์ 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ, 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ซิลเวอร์ไนโตรทเพื่อดูแถบดีเอ็นเอ นอกจากนี้ได้นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วยสี ฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งเป็นสารเรืองแสงมาวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied) Biosystem, USA หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*,1999) และ TFPGA version 1.3 (Miller, 1997)

ตารางที่ 12.1 ตัวอย่างไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) จากแหล่งต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

แหล่งที่มา		ภูมิภาค	จำนวน ตัวอย่าง
1.อุทยานแห่งชาติรามคำแหง จ. สุโขทัย	RKH	ภาคกลาง	29
2.อุทยานแห่งชาติถ้ำผาไท จ.ลำปาง	TPT	ภาคเหนือ	27
3.อุทยานแห่งชาติศรีลานนา อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	LND		27
4.อุทยานแห่งชาติศรีลานนา อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่	LNМ		28
5.อุทยานแห่งชาติแม่วาว จ.เชียงใหม่	MAV		26
6.เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยศาลา จ.ศรีสะเกษ	HSL	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	23
7.อุทยานแห่งชาติภูหินจอมธาตุ - ภูพระบาท (เตรียมการ) จ.อุดรธานี	PUD		30
8.อุทยานแห่งชาตินาคู - น้ำโสม (เตรียมการ) จ.อุดรธานี	NYN		27
9.อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย จ.อุบลราชธานี	PJ		30
10.อุทยานแห่งชาติภูแล่นคา จ.ชัยภูมิ	PLC		30
11.อุทยานแห่งชาติภูสระดอกบัว จ.มุกดาหาร	PSD		30
12.อุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองแก้ว จ.ตราด	KTR	ภาคตะวันออก	25
Total			332

ที่มา: สุจิตรา และคณะ, 2564

ตารางที่ 12.2 ตารางแสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาความหลากหลายในไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*)

Marker name	Primer sequences (5'-3')	Remark
OLI_05	F: GGATCAATTGGAGCCATACG R: TTTGCGACTCTCGTGTAGTGA	microsatellite markers for <i>D. oliveri</i> (Hatvig <i>et al.</i> , 2017)
OLI_06	F: ACTGGTAGGCCGACTTAACG R: AAAATAGGCCATCATTAGTTTGC	
OLI_14	F: TGAAATAAACCTAGCATCGACA R: TGTTAGCATGAAGACAGGGTT	
OLI_15	F: TTCATCAATGGTGGAGTTGG R: CTGGCCAACCAGAATGATCT	
OLI_16	F: TAGAGGAGGGAAAGGAAGGG R: AGCTGCCCTTCAGTTACAGTAT	
OLI_17	F: ATCATTCCATGTGGCTTCCA R: TTTGATACTGATCTAACCAGTGTCTT	
OLI_19	F: TTGATCATTACCCTTATTAGCCTT R: CAGGAAGAAATTACAACCCCA	
COC_06	F: CCTACGATGTTCTACGGGGA R: ACCGATGACTGATGAGGTGA	
COC_07	F: AATAATCTCCATTCTTCTTTGC R: TGAAGGACCAAGAGACACGG	
DL4	F: AAATCAAGAGCATTGGGTCAA R: TTCACAGGTTTCGTCGTTCC	(สุจิตรา และคณะ, 2552)

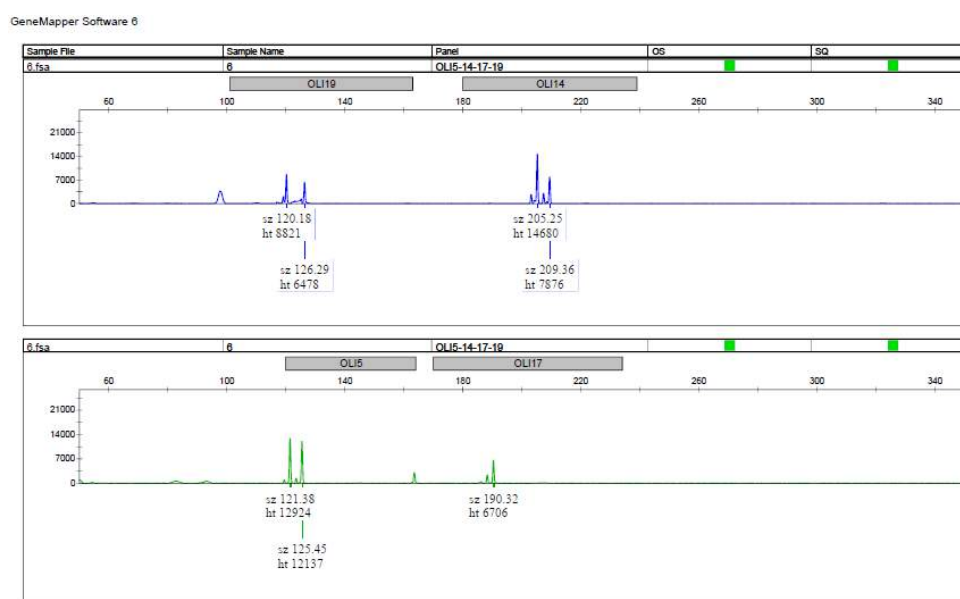
ที่มา: สุจิตรา และคณะ, 2564

ผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรไม้ชิงชัน โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 10 ตำแหน่ง ซึ่งตัวอย่างของความแตกต่างลักษณะทางพันธุกรรมในตัวอย่างที่ศึกษาแสดงใน ภาพที่ 12.1 และ 2 จำนวนอัลลีลในแต่ละตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์สำหรับทุกประชากรที่ศึกษามีค่าอยู่ระหว่าง 1-18 อัลลีล ดังแสดงใน ตารางที่ 12.3



ภาพที่ 12.1 ภาพแบบความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมตัวอย่างประชากรไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) จากเครื่องหมายไมโครแซเทลไลท์ ที่ตำแหน่ง OLI5



ภาพที่ 12.2 แสดง Electropherogram ที่ผ่านการดีดสียฟลูออเรสเซนและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Genetic Analyzer 3500 ในไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) (ที่มา: สุจิตรา และคณะ, 2564)

ตารางที่ 12.3 แสดงจำนวนค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่ง ในประชากรไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*)

ประชากร	จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง										ค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อประชากร
	OLI_5	OLI_6	OLI_1_4	OLI_1_5	OLI_1_6	OLI_1_7	OLI_1_8	COC_06	COC_07	DL4	
1.อุทยานแห่งชาติรามคำแหง จ. สุโขทัย	8	11	10	7	14	11	8	9	13	2	9.3
2.อุทยานแห่งชาติถ้ำผาไท จ.ลำปาง	9	14	10	12	9	11	7	6	11	1	9.0
3.อุทยานแห่งชาติศรีลานนา อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	8	12	12	8	12	13	9	8	11	1	9.4
4.อุทยานแห่งชาติศรีลานนา อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่	8	14	13	11	10	13	10	7	10	1	9.7
5.อุทยานแห่งชาติแม่วง จ.เชียงใหม่	8	13	9	12	9	10	9	8	10	1	8.9
6.เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยศาลา จ.ศรีสะเกษ	6	10	11	11	7	8	8	6	10	1	7.8
7.อุทยานแห่งชาติภูหินจอมธาตุ - ภูพระบาท (เตรียมการ) จ.อุดรธานี	12	12	15	11	13	14	11	8	13	2	11.1
8.อุทยานแห่งชาตินันทาย - น้ำโสม (เตรียมการ) จ.อุดรธานี	10	14	11	11	14	11	10	7	15	2	10.5
9.อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย จ.อุบลราชธานี	11	16	13	12	12	13	10	9	14	1	11.1
10.อุทยานแห่งชาติภูแลนคา จ.ชัยภูมิ	14	13	15	13	9	15	11	10	15	2	11.7
11.อุทยานแห่งชาติภูสระดอกบัว จ.มุกดาหาร	8	18	14	10	9	12	11	10	14	1	10.7
12.อุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองแก้ว จ.ตราด	7	13	14	10	12	14	9	8	14	1	10.2
Average	9.1	13.3	12.3	10.7	10.8	12.1	9.4	8	12.5	1.3	9.95

ที่มา: สุจิตรา และคณะ, 2564

จากการศึกษาครั้งนี้ สุจิตรา และคณะ (2564) ได้พบว่าไม้ชิงชันจากทั้ง 12 ประชากรมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยมีค่าเฉลี่ย $H_e = 0.77$ โดยไม้ชิงชันจากพื้นที่อุทยานแห่งชาติภูแล่นคา จังหวัดชัยภูมิ มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด กล่าวคือ มีค่า $H_e = 0.84$ ในขณะที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ชิงชันจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยศาลา จังหวัดศรีสะเกษ มีค่าต่ำกว่าแหล่งอื่นโดยมีค่า $H_e = 0.71$ รายละเอียดดังแสดงใน ตารางที่ 12.4 ถึงแม้จะมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าแหล่งอื่น แต่ถือว่ามีความใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรไม้ชิงชัน ($H_e = 0.77$) และมีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูน ($H_e = 0.63$) (สุจิตรา และคณะ, 2561)

ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร (F_{is}) ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรทั้งหมด (F_{IT}) และค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (F_{st}) ของไม้ชิงชันเฉลี่ยทุกตำแหน่งมีค่าเท่ากับ 0.10 0.23 และ 0.13 ตามลำดับ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 12.5

เมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ชิงชัน และไม้พะยูนในประเทศไทยที่ศึกษาพบว่าไม้ชิงชันมีพื้นที่ในการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในภูมิภาคต่างๆมากกว่าไม้พะยูน กล่าวคือ ไม้ชิงชันมีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในพื้นที่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก ส่วนในไม้พะยูนนั้นส่วนใหญ่มีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และบางจังหวัดในภาคกลาง เปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่าไม้พะยูนที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยกว่า (สุจิตรา และคณะ, 2561) โดยจากการศึกษาความหลากหลายของไม้พะยูนในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ พบว่ามีค่าเฉลี่ย $H_e = 0.63$ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับ Hartvig *et al.*, 2017 ซึ่งศึกษาตัวอย่างไม้ชิงชันจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ราชอาณาจักรกัมพูชา และสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนามพบว่ามีค่า $H_e = 0.73$ ซึ่งใกล้เคียงกับไม้ชิงชันในประเทศไทยที่ศึกษา (สุจิตรา และคณะ, 2564)

ตารางที่ 12.4 แสดงค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหมาย (H_e) ในประชากรไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*)

Populations	H_o	H_e	Polymorphic loci (%)
1.อุทยานแห่งชาติรามคำแหง จ. สุโขทัย	0.6814	0.7637	100
2.อุทยานแห่งชาติถ้ำผาไท จ.ลำปาง	0.7068	0.7425	90
3.อุทยานแห่งชาติศรีลานนา อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	0.6694	0.7478	90
4.อุทยานแห่งชาติศรีลานนา อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่	0.7339	0.7410	90
5.อุทยานแห่งชาติแม่ว้าง จ.เชียงใหม่	0.6339	0.7281	90
6.เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยศาลา จ.ศรีสะเกษ	0.6329	0.7072	90
7.อุทยานแห่งชาติภูหินจอมธาตุ - ภูพระบาท (เตรียมการ) จ.อุดรธานี	0.7315	0.8266	100
8.อุทยานแห่งชาตินาคู - น้ำโสม (เตรียมการ) จ.อุดรธานี	0.6865	0.8150	100
9.อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย จ.อุบลราชธานี	0.6800	0.7614	90
10.อุทยานแห่งชาติภูแลนคา จ.ชัยภูมิ	0.6966	0.8409	100
11.อุทยานแห่งชาติภูสระดอกบัว จ.มุกดาหาร	0.6808	0.7452	90
12.อุทยานเขาน้ำตกคลองแก้ว จ.ตราด	0.7796	0.7916	90
เฉลี่ย	0.6928	0.7676	93.33

ที่มา: สุจิตรา และคณะ, 2564

ตารางที่ 12.5 แสดงค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) ในแต่ละตำแหน่งของไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*)

Primer name	F_{it}	F_{st}	F_{is}
OLI 5	0.2172	0.1256	0.1047
OLI 6	0.2268	0.1349	0.1062
OLI 14	0.2205	0.1375	0.0963
OLI 15	0.2266	0.1331	0.1079
OLI 16	0.2257	0.1328	0.1072
OLI 17	0.2236	0.1355	0.1020
OLI 19	0.2237	0.1344	0.1032
COC 6	0.2134	0.1313	0.0945
COC 7	0.2265	0.1354	0.1054
DL4	0.1353	0.0594	0.0807
Average	0.2129	0.1251	0.0989

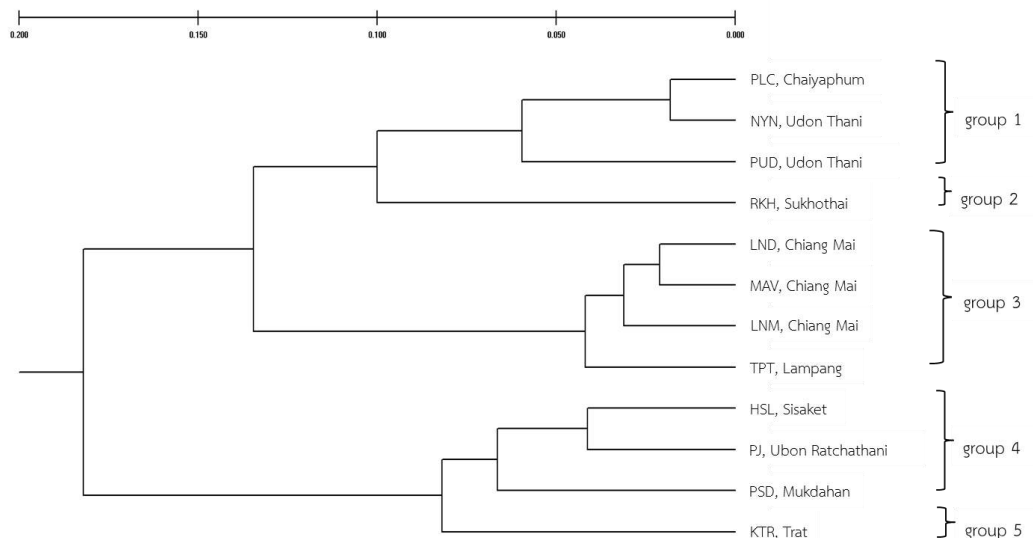
ที่มา: สุจิตรา และคณะ, 2564

ทั้งนี้ ตารางที่ 12.6 และ ภาพที่ 12.3 ได้แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไม้ชิงชัน 12 ประชากร เมื่อนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถจัดกลุ่มไม้ชิงชันที่ศึกษาได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 จากพื้นที่อุทยานแห่งชาติภูแลนคา จ. ชัยภูมิ อุทยานแห่งชาตินาญ-น้ำโสม จ.อุดรธานี และเตรียมการอุทยานแห่งชาติภูหินจอมธาตุ - ภูพระบาท จ. อุดรธานี, กลุ่มที่ 2 จากพื้นที่อุทยานแห่งชาติ รามคำแหง จ. สุโขทัย, กลุ่มที่ 3 จากพื้นที่อุทยานแห่งชาติศรีลานนา จ. เชียงใหม่ อุทยานแห่งชาติแม่วง จ. เชียงใหม่ และอุทยานแห่งชาติถ้ำผาไท จ. ลำปาง, กลุ่มที่ 4 จากพื้นที่อุทยานแห่งชาติภูสระดอกบัว จ. มุกดาหาร อุทยานแห่งชาติ ภูจอง-นายอย จ. อุบลราชธานี และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยศาลา จ. ศรีสะเกษ และกลุ่มที่ 5 จากพื้นที่อุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองแก้ว จ. ตราด

ตารางที่ 12.6 แสดงค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) ของไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*)

	RKH	TPT	LND	LNМ	HSL	PUD	PJ	KTR	PLC	PSD	MAV	NYN
RKH	*											
TPT	0.1607	*										
LND	0.1372	0.0421	*									
LNМ	0.1515	0.0415	0.0242	*								
HSL	0.2272	0.2331	0.2310	0.2445	*							
PUD	0.0836	0.1342	0.1424	0.1425	0.1784	*						
PJ	0.1822	0.1859	0.1888	0.2017	0.0412	0.1452	*					
KTR	0.1666	0.1800	0.1718	0.1885	0.0875	0.1369	0.0701	*				
PLC	0.1097	0.1284	0.1269	0.1323	0.1665	0.0566	0.1415	0.1226	*			
PSD	0.1753	0.2037	0.1948	0.2083	0.0881	0.1470	0.0447	0.0880	0.1501	*		
MAV	0.1418	0.0419	0.0210	0.0379	0.2540	0.1416	0.1957	0.1917	0.1298	0.2037	*	
NYN	0.1065	0.1212	0.1220	0.1276	0.1766	0.0626	0.1414	0.1346	0.0181	0.1540	0.1134	*

ที่มา: สุจิตรา และคณะ, 2564



ภาพที่ 12.3 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) 12 ประชากรในประเทศไทยจากการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA (ที่มา: สุจิตรา และคณะ, 2564)

สรุปผลการศึกษาวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาพบว่า ไม้ชิงชันจากพื้นที่อุทยานแห่งชาติภูแลนคา จังหวัดชัยภูมิ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด กล่าวคือมีค่า $H_e = 0.84$ โดยที่ค่าเฉลี่ยของความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ชิงชันทั้ง 12 ประชากรมีค่า $H_e = 0.77$ ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งของไม้ชิงชัน พบว่ามีค่า $F_{st} = 0.13$

เมื่อพิจารณาจากประชากรของไม้ชิงชันทั้ง 12 ประชากร พบว่าประชากรของไม้ชิงชันจากอุทยานแห่งชาติภูแลนคา จังหวัดชัยภูมิ มีความเหมาะสมในการเลือกเป็นตัวแทนสำหรับการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิด (*in situ* gene conservation) เนื่องจากมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าค่าเฉลี่ยและสูงกว่าประชากรไม้ชิงชันจากแหล่งอื่นๆ อย่างไรก็ตามจะต้องมีการพิจารณาข้อมูลด้านอื่นร่วมด้วย (สุจิตรา และคณะ, 2564)

อย่างไรก็ตามนอกจากนี้ได้มีการศึกษาการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแหล่งพันธุกรรมของไม้ชิงชันในประเทศไทย พบรูปแบบดีเอ็นเอ (Haplotype) รวม 32 รูปแบบ สามารถแยกจังหวัดและกลุ่มประชากรใน ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคอีสานได้ ยกเว้นประชากรในภาคเหนือยังไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ (สุจิตรา และกิตติยา, 2564) รายละเอียดสามารถศึกษาได้จาก Changtragoon and Singthong (unpublished data) ที่กำลังเตรียมจัดพิมพ์เป็นบทหนึ่งของเอกสารตำราต่างประเทศอยู่ คาดว่าจะตีพิมพ์ได้ปลายปีหรือต้นปีหน้า

บทที่ 13

ความสำคัญของข้อมูลทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่า

ต่อการพิจารณาวางแผนการปลูกป่า

คำนำ

เนื่องจากผลของการบุกรุกทำลายป่าในอัตราที่สูงทั้งในอดีตและในปัจจุบันได้ส่งผลให้พื้นที่ป่าลดลงจากอดีตเป็นอย่างมาก ซึ่งทำให้พันธุ์ไม้บางชนิดสูญพันธุ์และใกล้จะสูญพันธุ์ อย่างไรก็ตามขณะนี้ได้มีการตื่นตัวทั้งภาครัฐและเอกชนได้เห็นความสำคัญของป่าไม้และได้ร่วมมือกันช่วยในการปลูกป่าเพื่อฟื้นฟูพื้นที่ป่าให้อยู่ในสภาพเดิมเพื่อรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าและสภาวะสิ่งแวดล้อม

ในการที่จะวางแผนการปลูกป่าซึ่งต้องอาศัยกำลังทั้งงบประมาณ แรงงานและเวลาอย่างมากจึงต้องมีการวางแผนอย่างรอบคอบเพื่อให้ได้ผลที่คุ้มค่าและเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้

ในที่นี้ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่า ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการช่วยประกอบการพิจารณาที่จะวางแผนการปลูกป่าให้บรรลุจุดประสงค์ไม่ว่าจะเป็นเพื่อการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรม รักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่า เพื่อพัฒนาสิ่งแวดล้อมหรือเพื่อหวังผลในเชิงการค้า ซึ่งการที่จะเตรียมเมล็ดและกล้าไม้ และพื้นที่ที่จะปลูกจะต้องคำนึงถึงด้วยว่าเมล็ดและกล้าไม้ที่จะนำมาปลูกมาจากแหล่งไหน มีคุณภาพดีพอหรือไม่ และจะสามารถมีชีวิตอยู่รอดภายใต้สภาพแวดล้อมที่ผันแปรตลอดเวลาได้หรือไม่ ตลอดจนจะให้ผลผลิตสูงตามคาดหวังไว้หรือไม่

เนื่องจากไม้ป่าเป็นพืชที่มีอายุยาวนานกว่าพืชเกษตรทั่วไป ดังนั้นไม้ป่าจะต้องมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เพื่อเป็นการประกันความมีชีวิตอยู่รอดภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีความผันแปรตลอดเวลา (Changtragoon and Szmidt, 1993) ไม่ว่าจะเป็นเกิดจากวงจรธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตคือ การระบาดของโรคและแมลง หรือเกิดจากอิทธิพลของการพัฒนาเทคโนโลยีของมนุษย์ เช่น การสร้างโรงงานอุตสาหกรรม ทำให้อากาศและน้ำเสีย ตลอดจนสภาวะเรือนกระจก (Green house effect) และฝนกรด (Acid rain) สาเหตุดังกล่าวมีผลต่อความอยู่รอดของไม้ป่า ในทางกลับกันหากไม้ป่าสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ยาวนานก็ย่อมสนับสนุนทำให้สภาวะแวดล้อมดีขึ้น ไม่ว่าจะเป็นอุณหภูมิ น้ำ และอากาศของโลกตลอดจนทำให้ฝนตกถูกต้องตามฤดูกาลและสม่ำเสมอ

ดังนั้นหากพื้นฐานทางพันธุกรรมของไม้ป่าที่เรานำมาปลูก ไม่ว่าจะด้วยวัตถุประสงค์ใดก็ตามดังกล่าวยังต้นไม่ดีพอ คือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ก็อาจจะทำให้ไม่สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ผันแปรตลอดเวลาซึ่งยากต่อการควบคุมและคาดการณ์ล่วงหน้าได้ (สุจิตรา, 2535; สุจิตรา, 2536ก; สุจิตรา, 2536ข; สุจิตรา, 2536ค; Changtragoon, 2005)

สิ่งที่ต้องคำนึงอีกก็คือเมล็ดไม้ที่ได้จากหมู่ไม้ที่มีการผสมตัวเอง (Selfing) หรือผสมระหว่างต้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (Inbreeding) จะมีเปอร์เซ็นต์การออกต่ำ กล้าไม้จะ Sensitive ต่อการถูกทำลายจากโรคและแมลงและเมื่อย้ายลงปลูกจะทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดตายต่ำ นอกจากนี้ต้นที่รอดตายจะมีการเจริญเติบโตไม่ดีเท่าที่ควร ส่งผลให้ผลผลิตและปริมาณเนื้อไม้ต่ำกว่าปกติ ดังตัวอย่างที่พบ Inbreeding

Depression ในไม้ *Picea abies* (Langlet, 1940 ; Eriksson *et al.*, 1973; Hattemer and Bergmann, 1987; Changtragoon, 2005)

นอกจากนี้การปลูกป่าโดยอาศัยการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Vegetative propagation) ไม่ว่าจะใช้วิธีการติดตา ต่อกิ่ง หรือ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture) จะต้องมีการวางแผนและคัดเลือกกว่าควรใช้ที่ Clone และ แต่ละ Clone ควรมีที่ Ramet เพื่อไม่ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมและฐานพันธุกรรม (Genetic base) ต่ำเกินไป (Lindgren, 1993) เพราะถ้าต่ำเกินไปจะมีผลต่อท่อนพันธุ์ที่นำมาปลูกเอง และต่อเมล็ดไม้ที่จะผลิตได้จากแปลงดังกล่าวในรุ่นต่อไปได้เพราะจะมีความอ่อนไหวต่อการถูกทำลายจากโรคและแมลง ซึ่งจะเจริญเติบโตไม่ดีเท่าที่ควร ดังมีตัวอย่างมาแล้วในการปลูก *Paulownia taiwaniana* ในประเทศไต้หวัน (Finkeldey, 1992)

นำเสนอข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าเป็นกรณีศึกษาเพื่อมาประกอบการพิจารณาวางแผนการปลูกป่า โดยสุจิตรา (2537) ได้นำเอาความรู้ทางชีวเคมีและพันธุศาสตร์ป่าไม้ระดับโมเลกุล (Biochemical and molecular genetics of forest trees) โดยประยุกต์ใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ยีน (Isoenzyme gene marker) มาช่วยวินิจฉัยพื้นฐานทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าโดยในที่นี้ได้ศึกษาระบบการสืบพันธุ์ (Mating system) โดยหาอัตราการผสมตัวเอง (Selfing rate) ในไม้สนสองใบ (*Pinus merkusii*) และความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ระหว่างหมู่ไม้ของไม้สะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) และไม้เสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) เพื่อนำเอาข้อมูลทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้แต่ละชนิดมาช่วยประกอบการพิจารณาและตัดสินใจว่าควรเลือกแหล่งของเมล็ดไม้ที่ใดในการผลิตกล้าไม้เพื่อปลูกป่าตามวัตถุประสงค์ต่างๆดังที่กล่าวมาข้างต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งวิธีการนำเสนอข้อมูลดังกล่าวสุจิตรา (2537) ได้อธิบายการดำเนินงานเพื่อให้ได้ข้อมูลดังกล่าวพอสังเขปดังนี้

วัสดุและวิธีการศึกษาวิจัย

วัสดุ:

ไม้สนสองใบ

สำรวจและเก็บ Cones ไม้สนสองใบ จากป่าธรรมชาติ 11 แหล่ง (ประชากร) จากภาคเหนือ (จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน และ จังหวัดพิจิตรโลก) และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดศรีสะเกษและ จังหวัดสุรินทร์) โดยจะคัดเลือกต้นที่มี Cones สน ประชากรละ 8 - 30 ต้น ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของประชากร ดังรายละเอียดใน ตารางที่ 13.1 Cones สน ต้นละอย่างน้อย 5 Cones ได้ถูกนำมาแยกเอาเมล็ดออกจาก Cones สน แบบแยกต้น โดยที่เมล็ดจากแต่ละต้นจะไม่ปะปนกัน

ไม้สะเดาไทย

สำรวจและเก็บใบอ่อนไม้สะเดาไทยจากป่าธรรมชาติ 4 ประชากร โดยเก็บใบอ่อนของไม้สะเดาไทย ต้นละประมาณ 20 กรัม จำนวน 27 - 40 ต้น ต่อหนึ่งประชากร จากป่าธรรมชาติภาคกลาง (จังหวัดกาญจนบุรี) และภาคใต้ (จังหวัดสุราษฎร์ธานี และ จังหวัดชุมพร) ดังรายละเอียดใน ตารางที่ 13.1

ตารางที่13.1 รายชื่อแหล่ง (ประชากร) ของพันธุ์ไม้ที่ศึกษา

ชนิดพันธุ์	ชื่อประชากร	สถานที่	จำนวนตัวอย่างแต่ละแหล่ง
ไม้สนสองใบ (<i>Pinus merkusii</i>)	บ้านวัดจันทร์ 1	เชียงใหม่	23
	บ้านวัดจันทร์ 2	เชียงใหม่	18
	อ.อมก๋อย	เชียงใหม่	23
	อ.ขุนยวม	แม่ฮ่องสอน	21
	พิษณุโลก 1	พิษณุโลก	30
	พิษณุโลก 2	พิษณุโลก	26
	บ้านหนองคู	สุรินทร์	25
	บ้านภูมินิคม	สุรินทร์	8
	ห้วยทา	ศรีสะเกษ	23
	อ.โขงเจียม	อุบลราชธานี	18
	อ.บุณฑริก	อุบลราชธานี	30
ไม้สะเดาไทย (<i>Azadirachta indica</i> var. <i>siamensis</i>)	กาญจนบุรี	กาญจนบุรี	27
	สุราษฎร์ธานี1	สุราษฎร์ธานี	40
	สุราษฎร์ธานี2	สุราษฎร์ธานี	40
	ชุมพร	ชุมพร	40
ไม้เสม็ดขาว (<i>Melaleuca cajuputi</i>)	ป่าพรุโต๊ะแดง	นราธิวาส	23
	บ้านกุจำ เขากำป็น	นราธิวาส	26

ที่มา: สุจิตรา, 2537

ไม้เสม็ดขาว

สำรวจและเก็บใบอ่อน ไม้เสม็ดขาวจากป่าธรรมชาติ 3 ประชากรๆ ละ 23 - 26 ต้น ในภาคใต้บริเวณ ป่าพรุ จังหวัดนราธิวาส ดังรายละเอียดใน ตารางที่ 13.1 วิธีการเก็บใบอ่อนจะเหมือนกับการเก็บในไม้สะเดา ไทย อื่นๆ ใบอ่อนที่เก็บได้จากไม้ทั้งสองชนิดจะแช่ไว้ในกล่องรักษาความเย็นเพื่อรักษาสภาพเซลล์และเอนไซม์ ของใบที่เก็บให้สดและไม่ถูกทำลายจากอุณหภูมิที่สูงเกินไปก่อนนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ DNA และ Isoenzyme

วิธีการศึกษาวิจัย

การศึกษาระบบการสืบพันธุ์ (Mating system)

นำเอาเมล็ดสนสองใบจาก 11 ประชากรๆ ละ 8 - 30 ต้น มาแช่น้ำค้างคืนแบบแยกต้นและคัดแยก เมล็ดที่ลอยน้ำซึ่งเป็นเมล็ดลีบ (Empty seed) ออก เอาแต่เมล็ดดี (Full seed) มาต้นละ 6 เมล็ด กรณีที่ ประชากรนั้นมี 8 ต้น จะใช้เมล็ดดี 15 เมล็ด นำเมล็ดแต่ละเมล็ดมาแยก Embryo และ Endosperm แยก สกัด Crude extraction ใน Buffer (0.08 M Tris-HCl pH 7.2) ในภาชนะที่เตรียมไว้ นำ Crude extraction ที่ได้ไป Apply บน Starch gel electrophoresis โดยศึกษาใน Enzymes 11 ระบบ (Systems) ตารางที่ 13.2 เพื่อหา Isoenzyme phenotype และ Genotype ของ Isoenzyme gene แต่ละตำแหน่ง (รายละเอียดในการศึกษา ศึกษาได้จาก สุจิตรา (2535), สุจิตรา (2536ก) และ Changtragoon and Finkeldey (1995b) นำเอาข้อมูลโครงสร้างทางพันธุกรรม (Genotypic structure) ของ Isoenzyme gene แต่ละตำแหน่งมาหาอัตราการผสมตัวเอง (Selfing rate) โดยใช้ Computer program ของ Ritland and Jain (1981)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity)

นำเอาใบอ่อนแต่ละต้นจากแต่ละประชากรของไม้สะเดาไทยและไม้เสม็ดขาวมาสกัด Crude Extraction ใน Buffer (0.132M Tris, 0.003M Triplex II, 5เปอร์เซ็นต์ PVP, 0.003 M DTT และ 1 เปอร์เซ็นต์ Mercaptoethanol, pH 7.3) แล้วนำไปศึกษา Isoenzyme starch gel eletrophoresis โดยใช้ Enzymes 11 ระบบ (Systems) ดังแสดงใน ตารางที่ 13.2 แล้วนำเอาข้อมูล Isoenzyme phenotype มา วิเคราะห์ความถี่ของยีน (Gene frequency) แต่ละตำแหน่ง ของไม้แต่ละชนิด รายละเอียดศึกษาได้จาก สุจิตรา (2536ก), สุจิตรา (2536ข) และ สุจิตรา (2536ค) นำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์หาความหลากหลาย ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในไม้สะเดาไทยและไม้เสม็ดขาว โดยวัดค่า Genetic distance ในรูปของ Cluster analysis โดยใช้ Computer program ของ Swofford and Selander (1981)

ตารางที่ 13.2 ไอโซเอนไซม์ 11 ระบบที่ใช้ศึกษาในไม้ป่า

ระบบของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme system)	อักษรย่อ (Abbreviation)	รหัสของเอนไซม์ (Enzyme Code)
1. Leucine aminopeptidase	LAP	3.4.11.1
2. Glutamate-oxaloacetate transaminase	GOT	2.6.1.1
3. Glutamate dehydrogenase	GDH	1.4.1.3
4. Isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.42
5. 6-Phosphogluconate dehydrogenase	6-PGDH	1.1.1.44
6. Phosphoglucomutase	PGM	2.7.5.1
7. Malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37
8. Glucose 6-phosphate dehydrogenase	G-6PDH	1.1.1.49
9. Diaphorase	DIA	1.1.4.3
10. Formate dehydrogenase	FDH	1.6.99.3
11. Shikimate dehydrogenase	SKDH	1.1.1.25
12. NDH-dehydrogenase	NDH	1.6.99.1
13. Phosphoglucose-isomerase	PGI	5.3.1.9

ที่มา: สุจิตรา, 2537

ผลการศึกษาวิจัย

ระบบการสืบพันธุ์ (Mating system)

จากการศึกษาอัตราการผสมตัวเอง (Selfing rate) ในไม้สนสองใบ 11 ประชากร (Populations) ดังแสดงใน ตารางที่ 13.3 สุจิตรา (2537) พบว่าอัตราการผสมตัวเองของหมู่ไม้แต่ละประชากรมีความแตกต่างกัน ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 47.10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลจากการทดลองครั้งนี้พบว่าเมล็ดไม้ที่เก็บจากป่าธรรมชาติ อำเภอยางชุมน้อย จังหวัดศรีสะเกษ มีค่าของอัตราการผสมตัวเองสูงที่สุด คือ 98.60 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เมล็ดไม้ที่เก็บจากป่าธรรมชาติบริเวณ อำเภอยางชุมน้อย จังหวัดศรีสะเกษ คือมีค่า 61.50 เปอร์เซ็นต์ ในทางตรงกันข้าม เมล็ดไม้ที่เก็บจากป่าธรรมชาติ จากบริเวณ อำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี มีอัตราการผสมตัวเองน้อยที่สุด คือมีค่าเฉลี่ย 13.70 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 13.3 การประเมินอัตราผสมตัวเอง (Selfing rate) ของไม้สนสองใบ (*Pinus merkusii*)

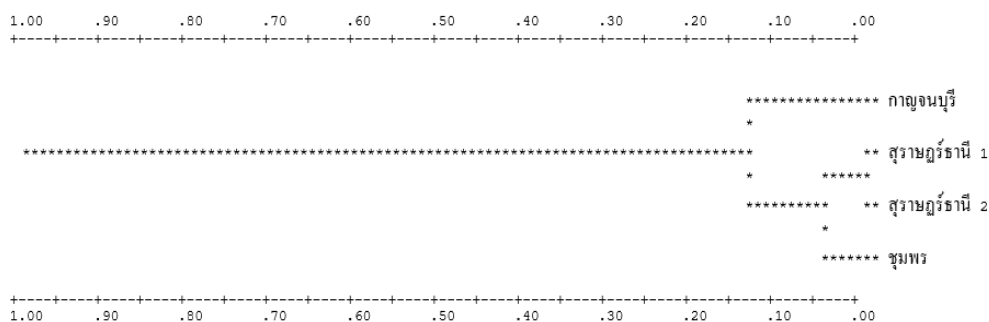
ชื่อประชากร	สถานที่	อัตราผสมตัวเอง (%)
1. หมู่บ้านวัดจันทร์1 (Ban Wat Chan) จ.เชียงใหม่	เชียงใหม่	57.60±30.70
2. หมู่บ้านวัดจันทร์2 (Ban Wat Chan) จ.เชียงใหม่	เชียงใหม่	42.90±20.40
3. อ.ขุนยวม (Khun Yuam)จ.แม่ฮ่องสอน	เชียงใหม่	61.50±10.20
4. อ.อมก๋อย (Omkoï)จ.เชียงใหม่	แม่ฮ่องสอน	98.60± 1.10
5. จ.พิษณุโลก1 (Pitsanuloke1)	พิษณุโลก	40.00±13.40
6. จ.พิษณุโลก2 (Pitsanuloke2)	พิษณุโลก	62.80± 9.90
7. หมู่บ้านหนองคู(Nong Khu) อ.สังขะ จ.สุรินทร์	สุรินทร์	56.70±11.40
8. หมู่บ้านภูมินิยม(Poomniyom) อ.สังขะ จ.สุรินทร์	สุรินทร์	23.30±14.50
9. ห้วยทา (Huey Tha)จ.ศรีสะเกษ	ศรีสะเกษ	60.50± 6.80
10. อ.โขงเจียม (Kong Chiam) จ.อุบลราชธานี	อุบลราชธานี	13.70± 6.80
11. อ.บุนทริก (Buntarik)จ.อุบลราชธานี	อุบลราชธานี	60.40± 8.90
เฉลี่ย		47.10±27.30

ที่มา: สุจิตรา, 2537

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity)

ไม้สะเดาไทย

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในไม้สะเดาไทยพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรมีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัดตามแหล่งกำเนิดและที่ตั้ง ของป่า กล่าวคือ สามารถแยกออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังแสดงใน ภาพที่ 13.1 ได้อย่างเด่นชัด กล่าวคือ กลุ่มที่ 1 คือ ประชากร จาก จังหวัดกาญจนบุรี กลุ่มที่ 2 คือประชากร จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี และกลุ่มที่ 3 คือประชากร จากจังหวัดชุมพร ส่วนความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในจังหวัดสุราษฎร์ธานีมีไม่มากนัก หรือแทบจะไม่มีเลย ดังจะเห็นได้จาก ภาพที่ 13.1 ได้อย่างชัดเจน



ภาพที่13.1 การวิเคราะห์ Cluster Analysis โดยใช้ Unweighted Pair Group Method โดยใช้ Nie's (1978) Unbiased Genetic Distance ใน 4 แหล่ง (ประชากร) ของไม้สะเดา (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) (ที่มา: สุจิตรา, 2537)

ไม้เสม็ดขาว

ภาพที่ 13.2 แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างหมู่ไม้เสม็ดขาวจากจังหวัดนราธิวาส ซึ่งจะเห็นว่าความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างประชากรจากป่าพรุโต๊ะแดง และจากป่าบริเวณอำเภอกูจำ มีไม่มากเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างประชากรบริเวณเขากำป็น

สรุป วิจัยรณ์และข้อเสนอแนะ

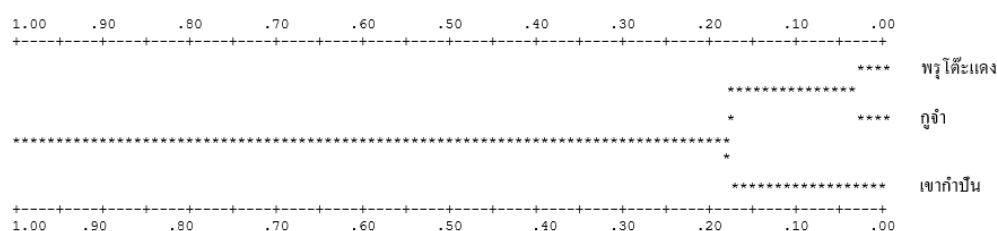
การที่ไม้สนสองใบมีอัตราการผสมตัวเองค่อนข้างสูงคือเฉลี่ย 47.10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับว่าเมล็ดโดยเฉลี่ยประมาณครึ่งหนึ่งเกิดจากการผสมตัวเอง ซึ่งนับว่าเป็นอัตราที่ค่อนข้างสูง สิ่งที่น่าเป็นห่วงคือเมล็ดจากบางประชากร กล่าวคือจาก อำเภอยะนวม จังหวัดแม่ฮ่องสอน มีอัตราการผสมตัวเองสูงถึง 98.60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับว่าเมล็ดไม่เกือบทั้งหมด เกิดจากการผสมตัวเอง แต่ในทางตรงกันข้ามเมล็ดไม้จากประชากร อำเภอยะเจียม จังหวัดอุบลราชธานี มีอัตราการผสมตัวเองแค่ 13.7 เปอร์เซ็นต์ ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมดังกล่าวเป็นภาพสะท้อนให้เห็นถึงความสำคัญของการคัดเลือกแหล่งของเมล็ดไม่ว่าเมล็ดไม้อาจมาจากแหล่งใดควรที่จะนำมาเพาะและเตรียมกล้าไม้เพื่อการปลูกสร้างสวนป่า หากมีการเลือกผิดก็จะส่งผลให้

ผลิตกล้าไม้ไม่ได้ตามเป้าหมาย เพราะเมล็ดกล้าไม้ที่มียีนด้อย (Recessive alleles) ซึ่งเป็นผลมาจากการผสมตัวเอง (Selfing) หรือผสมจากต้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (Inbreeding) จะเป็นเมล็ดลีบ (Empty seed) และกล้าไม้มีความอ่อนไหวต่อการถูกโรคและแมลงทำลาย ทำให้ตายก่อนนำไปย้ายลงปลูกในแปลง ดังพบปัญหาเสมอในการเพาะเมล็ดไม้สนสองใบ เพราะพบว่ามีการปนเปื้อนของเมล็ดลีบ (Empty seeds) และมีโรคระบาดระหว่างเตรียมกล้าไม้ในเรือนเพาะชำ (Changtragoon, 1984; Sa-ardavut *et al.*, 1988) นอกจากนี้ กล้าไม้ที่นำไปย้ายลงแปลงปลูกจะมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายต่ำ และผลผลิตก็จะต่ำตามไปด้วยซึ่งทำให้ไม่คุ้มกับเวลาตลอดจนแรงงาน และงบประมาณที่เสียไป (Hattemer and Bergmann, 1987)

แต่ถ้าสามารถคัดเลือกแหล่งของเมล็ดไม้ได้อย่างถูกต้อง คือเลือกแหล่งที่เมล็ดไม้ที่มีค่าอัตราการผสมตัวเองน้อย ก็จะสามารถผลิตกล้าไม้ที่มีคุณภาพได้เพียงพอต่อการปลูกสร้างสวนป่า และไม่ต้องมีการปลูกซ่อมบ่อยๆ เพราะสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ยืนยาวแม้สภาวะแวดล้อมจะผันแปรตลอดเวลาก็ตาม (ในที่นี้ไม่ได้รวมผลกระทบจากการบุกรุกทำลายป่าและลักลอบการตัดไม้จากมนุษย์)

นอกจากนี้ค่า Standard deviation ของอัตราการผสมตัวเองของไม้สนสองใบจากแต่ละประชากรมีค่าค่อนข้างสูง แสดงว่าอัตราการผสมตัวเองของไม้แต่ละต้นแม้ในประชากรเดียวกันก็มีค่าต่างกัน ดังนั้นเวลาเก็บเมล็ดไม้สนสองใบควรจะเก็บแยกต้นและแยกแหล่งไม่ควรเก็บปะปนกัน

ผลของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในไม้สะเดาไทยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าการที่จะคัดเลือกแหล่งเพื่อเก็บเมล็ดไม้สะเดาไทยเพื่อมาเตรียมกล้าไม้สำหรับการปลูกป่า ควรจะเก็บเมล็ดแยกแหล่งที่มา ไม่ควรให้เมล็ดปะปนกัน เพราะความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละประชากรของแต่ละจังหวัดแตกต่างกันอย่างเด่นชัด ดังนั้นในการเตรียมกล้าไม้ และการปลูกป่าไม้สะเดาไทยควรแยกปลูกตามแหล่งให้ได้อย่างถูกต้อง เพื่อประโยชน์ต่อการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมและรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ชนิดนี้ไว้



ภาพที่ 13.2 การวิเคราะห์ Cluster analysis โดยใช้ Unweighted pair group method โดยใช้ Nei's (1978) Unbiased genetic distance ใน 3 แหล่ง (ประชากร) ของไม้เสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) (ที่มา: สุจิตรา, 2537)

ส่วนความแตกต่างทางพันธุกรรมของไม้สะเดาไทยในจังหวัดเดียวกันในที่นี้คือจังหวัดสุราษฎร์ธานี มีค่าน้อยมาก ดังนั้นควรเลือกเก็บเมล็ดไม้ ที่ใดที่หนึ่งเพื่อเตรียมกล้าไม้ก็พอไม่จำเป็นต้องเก็บทั้งสอง ประชากร จากจังหวัดดังกล่าวหากมีงบประมาณจำกัด

ผลการทดลองในไม้เสม็ดขาวครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ไม้เสม็ดขาวแม้ขึ้นในท้องที่จังหวัดเดียวกันแต่ก็มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับพื้นฐานทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของป่าไม้ในแต่ละประชากร เนื่องจากไม้ป่าพรุ ยังอยู่ในระยะเริ่มต้นของโครงการการปรับปรุงพันธุ์ และอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรม หากต้องการเลือกแหล่งเมล็ดไม้ของไม้เสม็ดขาวในจังหวัดนราธิวาส สำหรับการปลูกป่าเพื่ออนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมและเป็น Genetic base สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต ก็ควรจะเลือกป่าบริเวณเขากำป็นเป็นอันดับแรก เพราะความหลากหลายทางพันธุกรรม สูงกว่า และมีความแตกต่างจากป่าบริเวณอื่นในจังหวัดเดียวกัน การศึกษาครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ยีน (Isoenzyme gene markers) มาช่วยวินิจฉัยพื้นฐานทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่า โดยในที่นี้ได้ศึกษาระบบสืบพันธุ์ (Mating system) โดยการศึกษาอัตราการผสมตัวเอง (Selfing rate) ในไม้สนสองใบ (*Pinus merkusii*) และความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ระหว่างประชากร (Populations) ของไม้สะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) และไม้เสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) เพื่อเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้แต่ละชนิดเป็นการศึกษาในการช่วยพิจารณาและตัดสินใจว่าควรเลือกแหล่งของเมล็ดไม้ที่ใดในการผลิต กล้าไม้ที่มีคุณภาพสูง โดยควรคัดเลือกแหล่งของเมล็ดไม้ที่มีอัตราการผสมตัวเองต่ำ และเลือกแหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เพื่อมาเตรียมการปลูกป่าตามวัตถุประสงค์ต่างๆ ไม่ว่าเพื่ออนุรักษ์แหล่งพันธุกรรม รักษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ปรับปรุงพันธุ์ เพื่อพัฒนาสิ่งแวดล้อมหรือหวังผลเชิงการค้าได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของไม้ป่าแต่ละชนิด ซึ่งมีพื้นฐานทางพันธุกรรมแตกต่างกันไป ไม่ว่าไม้ต่างชนิดหรือแม้กระทั่งชนิดเดียวกัน ในแต่ละประชากรหรือท้องที่ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ต่างกันไป ทั้งนี้ย่อมขึ้นอยู่กับระบบการสืบพันธุ์ (Mating system) โครงสร้างทางพันธุกรรม (Genetic structure) และวิวัฒนาการ (Evolutional history) ของไม้แต่ละชนิดและแต่ละแหล่งนั่นเอง

การตระหนักถึงความสำคัญของข้อมูลทางพันธุกรรมของไม้ป่าแต่ละชนิดและนำข้อมูลดังกล่าวมาประกอบการพิจารณาในการวางแผนปลูกป่า ไม่ว่าวัตถุประสงค์ใดๆ ก็จะช่วยให้ได้เมล็ดและกล้าไม้ที่มีคุณภาพ ซึ่งก็จะทำให้การปลูกป่าในไม้แต่ละชนิดได้ผลและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (สุจิตรา, 2537)

บทที่ 14

การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เพื่อการคุ้มครองพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและ ไม้ป่าในบัญชี CITES ในประเทศไทย

คำนำ

ปัจจุบันป่าไม้ในประเทศไทยได้ถูกทำลายเป็นจำนวนมาก จนมีพื้นที่เหลือเพียงประมาณ 31.68% (สำนักแผนงานและสารสนเทศ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2563) โดยเฉพาะไม้ที่มีค่าซึ่งบางชนิดเป็นไม้หวงห้าม บางชนิดเป็นไม้ที่อยู่ในบัญชีอนุสัญญา CITES : Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora เพื่อเตรียมความพร้อมในการรองรับการบังคับใช้กฎหมายทางด้านนิติวิทยาศาสตร์จึงต้องมีการจัดทำฐานข้อมูลพันธุ์กรรมพืชที่จำเพาะแต่ละชนิดเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบวินิจฉัยชนิดพันธุ์ในการขยายผลการบังคับใช้กฎหมาย เนื่องจากประสบการณ์ในอดีต เช่น สำนักป้องกันและปราบปรามไฟป่า หัวหน้าอุทยานแห่งชาติ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช และกรมป่าไม้ รวมทั้งสถานีตำรวจในท้องที่ได้มีการร้องขอให้มีการตรวจพิสูจน์เนื้อไม้จากตัวอย่างของกลางเนื้อไม้และชิ้นเลื่อยเพื่อต้องการพิสูจน์ว่า วัตถุของกลางเป็นไม้ชนิดเดียวกันหรือไม่ และวัตถุของกลางเป็นไม้ชนิดใดเป็นไม้หวงห้ามหรือไม่ซึ่งของกลางดังกล่าวไม่สามารถพิสูจน์ลักษณะทางสัณฐานและกายภาพในรูปแบบที่แตกต่างกันไป เช่น ชิ้นเลื่อย ผลิตภัณฑ์รูปแบบต่างๆได้ นอกจากนี้การจำแนกชนิดทางด้านสัณฐานวิทยาทำได้ยากโดยเฉพาะไม้ป่าที่มีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องดำเนินการในการจัดทำฐานข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะ (ดีเอ็นเอบาร์โค้ด) ในไม้ที่มีความสำคัญ มีค่าทางเศรษฐกิจ และไม้หวงห้ามแต่ละชนิด เพื่อเป็นฐานข้อมูลทางด้านพันธุกรรมใช้ในการคุ้มครองและป้องกันตลอดจนในการจำแนกชนิดของตัวอย่างของกลางว่าเป็นไม้หวงห้ามและไม้ในบัญชี CITES หรือไม่ ซึ่งสามารถนำมาขยายผลไปบังคับใช้กฎหมายได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพในอนาคต (สุจิตรา, 2560) ไม้มีค่าที่เป็นไม้หวงห้ามและไม้ที่อยู่ในบัญชี CITES หลายชนิด ได้ถูกลักลอบตัดโดยผิดกฎหมายเป็นจำนวนมาก การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES เพื่อจัดทำเป็นฐานข้อมูลด้านพันธุกรรม และใช้ในการจำแนกชนิดพันธุ์และคุ้มครองพันธุ์ จากการศึกษาด้วยส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม สามารถใช้ในการจำแนกชนิดของไม้ของกลางที่ถูกลักลอบได้ว่าเป็นไม้ที่ผิดกฎหมายหรือไม่ เพื่อใช้เป็นหลักฐานในการดำเนินคดี ทั้งนี้เพื่อให้สอดคล้องกับมาตรการป้องกันรักษาทรัพยากรป่าไม้และสัตว์ป่าของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ในด้านการใช้เครื่องมือและเทคโนโลยีที่ทันสมัย ให้สามารถตรวจสอบหลักฐานและสถานการณ์ได้รวดเร็ว แม่นยำ เพื่อนำผลการพิสูจน์มาใช้เป็นหลักฐานการดำเนินคดีได้ ในการตรวจสอบชนิดพันธุ์ของพืชป่าด้วยข้อมูลด้านดีเอ็นเอ ดังนั้นการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อเป็นฐานข้อมูลด้านพันธุกรรมโดยการถอดรหัสพันธุกรรมที่ตำแหน่งของยีนและที่ไม่ใช่ส่วนของยีนที่จำเพาะของชนิดพันธุ์นั้น จะเป็นการช่วยคุ้มครองพันธุ์และบังคับใช้กฎหมายในการลักลอบตัดไม้ป่าของหวงห้ามและ ไม้ป่าในบัญชี CITES ในอนาคตได้ เนื่องจากพันธุ์ไม้ป่าต่าง ๆ นั้นมีคุณค่าทางเศรษฐกิจเป็นอันมาก ได้มีนำเนื้อไม้มาใช้ในการก่อสร้างอาคารบ้านเรือนและเครื่องใช้ต่างๆ นอกจากนั้นยังมีไม้บางชนิดให้ประโยชน์อย่างอื่นที่สูงกว่าเนื้อไม้

เช่น น้ำมัน ชัน หรือให้ผลที่เป็นสมุนไพรใช้แก้โรคติดต่อร้ายแรงบางโรคได้ ดังนั้นทางการจึงต้องป้องกันมิให้สูญพันธุ์โดยออกพระราชกฤษฎีกา กำหนดไม้หวงห้าม พ.ศ. 2530 กำหนดไม้บางชนิดให้เป็นไม้หวงห้าม ไม้หวงห้ามที่ทางการกำหนดไว้ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ไม้หวงห้ามประเภท ก. เป็นพันธุ์ไม้ที่ให้เนื้อไม้มีคุณภาพดี ซึ่งใช้ในการก่อสร้างอาคารบ้านเรือนได้นั้น ทางการจะยอมให้ตัดฟันและชักลากออกมาทำสินค้าได้ ทั้งนี้ต้องได้รับอนุญาตจากพนักงานเจ้าหน้าที่เสียก่อน ได้กำหนดให้อยู่ในประเภทนี้ มีจำนวนกว่า 250 ชนิด พร้อมทั้งกำหนดอัตราค่าหลวงไว้ด้วย ตัวอย่าง เช่น ไม้มะค่าโมง (*Azelia xylocarpa*) ประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus*) อินทนิล (*Lagerstroemia speciosa*) อื่นๆ เช่น ตะแบกเปลือกหนา ตะแบกเปลือกบาง เสลา ตะเคียน สนทะเล เต็งหรือแงะ รังหรือเปา ยางกราด ยางพลวง นอกจากนี้ ในพระราชบัญญัติกฎหมายว่าด้วยการป่าไม้ พ.ศ. 2484 ได้กำหนดว่า ไม้สักและไม้ตระกูลยางไม้ทั้งสองชนิดนี้ไม่ว่าจะขึ้นอยู่ที่ใดก็ตามให้ถือว่าเป็นไม้หวงห้ามทั้งสิ้น การตัดฟันใช้สอยจะต้องได้รับอนุญาตจากรัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เว้นแต่ในกรณีที่ได้มอบหมายให้เป็นอำนาจของอธิบดีกรม ป่าไม้หรือผู้ว่าราชการจังหวัด (พยงค์, 2550) ไม้หวงห้ามประเภท ข. ได้แก่ พันธุ์ไม้บางชนิดที่ทางการได้พิจารณาเห็นว่าเป็นไม้ชนิดที่มีค่าหายาก หรือ มีคุณค่าพิเศษอย่างอื่น เช่น เปลือกหรือเนื้อไม้มีกลิ่นหอม เป็นสมุนไพรที่หายาก หรือเนื้อไม้มีน้ำมัน หรือชัน ซึ่งใช้ประโยชน์ในการอุตสาหกรรมที่จะหาของอื่นมาใช้แทนไม่ได้ หรือ มีผลที่เป็นสมุนไพร ใช้แก้โรคติดต่อร้ายแรงบางโรคได้ ทางการจะห้ามมิให้ตัดฟันโค่นล้ม เว้นแต่จะได้รับอนุญาตเป็นกรณีพิเศษ พันธุ์ไม้ที่ใช้ขยำนามากล้นเป็นน้ำมันและชันก็คือ สนเขามืออยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ สนสองใบ (*Pinus merkusii*) สนสามใบ (*Pinus khasya*) ที่มีปริมาณน้อยและหายาก ได้แก่ พญาไม้ (มีอยู่ 3 ชนิด คือ พญามะขามป้อมดง (*Podocarpus imbricatus*) ขุนไม้ (*Podocarpus wallichii*) พญาไม้หรือ ขางจิง (*Podocarpus nerijfolia*)) แปกลม (*Colocedrus macrolepis*) มะขามป้อมดง (*Cephalotaxus griffithii*) สามพันปี (*Dacrydium elatum*) อื่นๆเช่น กฤษณาหรือกระลำพัก หอม หรือ สบ หรือ กะตุก กระเบาใหญ่ มะพอก หรือทะเลอก หรือ มะมือ รักใหญ่ (สารานุกรม, 2523)

DNA barcode เกี่ยวข้องกับผลผลิตของการเพิ่มจำนวน amplicons ในบริเวณที่ต้องการถอดลำดับนิวคลีโอไทด์และข้อมูลถอดรหัสพันธุกรรมดังกล่าวจะถูกใช้ในการจำแนกหรือวินิจฉัยว่าชนิดพันธุ์นั้นๆ มีความแตกต่างจากชนิดพันธุ์อื่น (Lebonah et al., 2014)

วุฒิพงศ์ (2554) กล่าวว่า DNA barcode เป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการระบุชนิดหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตภายในเวลาอันรวดเร็ววิธีการนี้อาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณที่เรียกว่า “ดีเอ็นเอมาตรฐาน” จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชื่อแล้วนำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาใช้เปรียบเทียบนี้อาจเป็นบริเวณเดียวหรือ 2-3 บริเวณ แต่ต้องมีความยาวไม่มากและ เป็นบริเวณเดียวกับชนิดอื่นๆ ที่ต้องการใช้เปรียบเทียบกัน วิธีการสร้างระบบ DNA barcode จะช่วยให้ระบุชื่อสิ่งมีชีวิตได้จากทุกระยะของการเจริญ รวมถึงในสภาพที่เป็นชิ้นส่วนขนาดเล็ก ทั้งที่เป็นตัวอย่างสดและตัวอย่างที่ถูกรักษาสภาพไว้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อนักอนุกรมวิธานและบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความชำนาญทางด้านอนุกรมวิธานและ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับศาสตร์สาขาอื่นได้ เช่น การศึกษาทางด้านนิเวศวิทยาและนิติวิทยาศาสตร์

มีหลายประเทศ เช่น ประเทศจีน ประเทศแคนาดา ประเทศมาเลเซีย และประเทศอินเดีย เป็นต้น ได้มีการจัดทำ DNA barcode ในพืชหลายชนิด เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดโดยใช้ส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนมที่เป็นทั้งยีน (coding genes) เช่น *rbcl* *matK* *rpoC1* *atpF/H* *rps4* และที่ไม่ใช่ส่วนของยีน (noncoding spacers) เช่น *trnH-psbA* *psbK/I* *ITS2* *ndhF-rpl32* *trnL* *trnV-trnM1* *trnV-trnM2* *trnC-petN* *trnS-trnG* *atpB-rbcl* *psbM-trnD* *trnD-trnE* *trnH-ITS* (CBOL Plant Working Group, 2000; Cowan *et al.*, 2006; Pennisi, 2007; Hollingworth *et al.*, 2011; Bhargava and Sharma, 2013; Kress, 2017; Jiao *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Jiao *et al.*, 2013; Hartvig *et al.*, 2015; Ng *et al.*, 2020 และ Fatima *et al.*, 2019) ดีเอ็นเอบาร์โค้ดยังมีประโยชน์ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของไม้จากเฟอร์นิเจอร์หรือเครื่องเรือนและของแต่งบ้านที่ทำจากไม้หรือไม้ท่อนซุง ไม้แปรรูป เพื่อการส่งออก เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นไม้ชนิดใด และเป็นไม้หวงห้ามและอยู่ในบัญชีแนบท้าย CITES หรือไม้ ซึ่ง ดีเอ็นเอบาร์โค้ดก็สามารถช่วยระบุชนิดได้จากการสกัดสารทางพันธุกรรมที่หลงเหลืออยู่ในเนื้อไม้ ทั้งนี้ Changtragoon (2011) ได้ริเริ่มจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดในไม้ป่าบางชนิดระดับเบื้องต้นซึ่งจะต้องมีการดำเนินการต่อไปโดยเฉพาะในไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1. เพื่อจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าที่อยู่ในบัญชี CITES และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลในการจำแนกชนิดไม้ จากตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกทางสัณฐานและกายภาพได้ 2. เพื่อใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นข้อมูลในการพิสูจน์เชิงนิติวิทยาศาสตร์และขยายผลในการบังคับใช้กฎหมายและการป้องกันการลักลอบตัดไม้ในอนาคต 3. เพื่อคุ้มครองพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าที่อยู่ในบัญชีแนบท้าย CITES

วัสดุและวิธีการศึกษาวิจัย

เก็บตัวอย่างใบหรือเปลือกไม้ของ ไม้สัก ไม้ตะกุดยาง และพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามตามพระราชกฤษฎีกา พ.ศ. 2530 (พยัค, 2550) ดังตารางที่ 14.1 และตารางที่ 14.2 พันธุ์ไม้ของไทยที่อยู่ในบัญชี CITES ได้แก่ ไม้พะยูน และ ไม้กฤษณา จากพื้นที่อนุรักษ์ในประเทศไทยนำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีการสกัดของ (Doyle and Doyle, 1990) และ (Changtragoon *et al.*, 1996a) แล้วนำมาละลายใน 1X TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 50-100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส วัดคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8% และนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb แล้วบันทึกภาพ แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ในตำแหน่งที่ศึกษา คือ *Maturase K* ในตัวอย่างที่ต้องการศึกษา จากหลักการของวิธี Chain termination method ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) โดยทำพีซีอาร์ซึ่งจะติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ ไป ทำให้บริสุทธิ์ และนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำไปจำแนกกลุ่มโดยการวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) วิธี Neighbour Joining method แบบ Bootstrap.

ตารางที่ 14.1 ไม้ประเภท ก. ไม้หวงห้ามธรรมดา ตามพระราชบัญญัติ พ.ศ. 2530

ลำดับ	ประเภท ก. ไม้หวงห้ามธรรมดา	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	กระเจา กระเขา	<i>Holoptelea integrifolia</i>
2	กระโดน ปุย	<i>Careya sphaerica</i>
3	กระถินพิมาน กระถินป่า แฉลบขาว แฉลบแดง ปีมาน สีเสียดแก่น สีเสียดเหลือง สีเสียดเหนือ สีเสียดซี่ช้าง	<i>Acacia</i> spp
4	กระท่อน สะท่อน ท่อน เตียน มะต๋อง มะดิน สะท่อนนก	<i>Sandoricum</i> spp.
5	กระท่อนรอก ท่อนรอก หมากมุ่น มะมุ่น มะมุ่นดง	<i>Elaeocarpus</i> spp.
6	กระทุ่มหนู กระทุ่มขี้หมู กระทุ่มนา ตุ่มกั่วว	<i>Mitragyna</i> spp.
7	กระบก หมากบก มะมื่น มะลื่น หลักกาย	<i>Irvingia malayana</i>
8	กระบาก บาก ตะบาก ปีก ช้าม่วง ปิงู	<i>Anisoptera</i> spp.
9	กระบากดำ มะรันตีสะตา	<i>Shorea</i> spp.
10	กระเบาสิง กระเบาหลัก กระเบียน กระเบาตง หัวสิง หัวค่าง ดูกช้างเบา	<i>Hydnocarpus</i> spp.
11	ก่อ มะก่อ กอ ค้อ	<i>Castanopsis</i> spp. <i>Lithocarpus</i> spp. & <i>Quercus</i> spp.)
12	กะเจียน ขะเจียน โมตดง สะบันงาป่า ยางอิง ยางโดน ยางโอน	<i>Polyalthia</i> spp.
13	กะทังหัน กระทิง กังหัน ตังหัน ตังหน พะอง ขวด สารภีทะเล สารภีแนน เนาวกาน ตางอ ตาหงอ	<i>Calophyllum</i> spp.
14	กัตลัน ขี้ฮ่าย มะเฟืองป่า แก้วสาร ลำไยป่า พญาไก่อเลื้อย	<i>Walsura</i> spp.
15	กันกรา ตำเสา มันปลา	<i>Fagraea fragrans</i> Roxb.
16	ก้านตอง ก้านทอง ขันทอง เปรียง	<i>Swintonia</i> spp.
17	ก้านเหลือง สะแกเหลือง ตุ่มคำ ขมิ้นทอง มินตอง	<i>Nauclea</i> spp.
18	กาลอ	<i>Shorea faguettiana</i>
19	กำลังเสือโคร่ง	<i>Betula alnoides</i>
20	กูก กอกกัน อ้อยช้าง	<i>Lannea coromandelica</i>
21	กุหลิม กระเทียมตัน	<i>Scorodocarpus borneensis</i>
22	เกต	<i>Manikara hexandra</i>
23	เกล็ดลัน คอแลน คอเหี้ย พรวน ตะกวดร้องไห้ แลน บาน แลนง้อ แลนวา แลนไห้	<i>Xerospermum</i> spp.
24	แก้ว ขว้าว กาว กว้าว ทองเหลือง ขมิ้นตัน	<i>Haldina cordifolia</i> , <i>Metadenia</i> spp.
25	แกแล เข เหลือง แกล	<i>Maclura cochinchinensis</i>
26	โก่งกาง พังกา ลาน โก่งกางใบเล็ก โก่งกางใบใหญ่	<i>Rhizophora</i> spp.

ที่มา: พระราชบัญญัติ กำหนดไม้หวงห้าม, 2530

ตารางที่ 14.1 (ต่อ)

ลำดับ	ประเภท ก. ไม้หวงห้ามธรรมดา	ชื่อวิทยาศาสตร์
27	ไกรทอง เจตมูล เห็ดหมูน เข็ดมูล แก่นแดง	<i>Erythroxylum cuneatum</i>
28	ขนาน จำปีแขก ลำป่าง ตากวาง หำม้า หำฮอก กะนวล ขะนวล สากกะเท้า สนานดง สร้อยฟ้า ข้าว ตาก จำหลอด หำรอก ตองม่อม หำอาว	<i>Pterospermum</i> spp.
29	ขนุนป่าน ขนุนป่า มะหาด หาด หาดหนูน ไสน หาดส้าน ตาปิง ตังเก โฉน กะเอาะ เอาะ ออก มะออก	<i>Artocarpus</i> spp.
30	ขมิ้นดำ ไข่เขียว ไข่ไก่เขียว ปาด เขียว โดแหลม ตะเคียน ขวย ส่วย เบ้เขียว ขานอ้อย พุ่มเขียว ปาดหลังเขียว	<i>Parashorea</i> spp.
31	ขะเจ๊า สาร คำแมบ คะแมด จัน คำขี้หมู ขี้หมู แซะ กาแซะ กะแซะ	<i>Millettia</i> spp.
32	ขะไต คู่ช้างย้อย กะไต หมาเหนียว ลูกสืบ	<i>Ulmus lancifolia</i>
33	ขี้เหล็กป่า แสมสาร ขี้เหล็กสาร ขี้เหล็กแพะ ขี้เหล็กโคก	<i>Cassia garrettiana</i>
34	เขลง หมากเค็ง หยี นางดำ กายี	<i>Dialium</i> spp.
35	ค่าหุด ดูกเน่า	<i>Engelhardtia</i> spp.
36	คาง คางแดง มะขามป่า มะขามผี พฤษ์ ปันแถ ถ่อน ทิ้งถ่อน มะขามโคก	<i>Albizia</i> spp.
37	ค้างคาว ตะพุน กะพุน สะพุน ลางสาตเขา	<i>Aglaia</i> spp.
38	คูน ลมแล้ง ขัยพฤษ์ ราชพฤษ์	<i>Cassia fistula</i>
39	เคี่ยม	<i>Cotylelobium melanoxydon</i>
40	เคี่ยมคนอง	<i>Shorea henryana</i>
41	แคหิน แคฝอย แคหวาย แคก้อง แคสี แคยอดดำ แคเขา แคทราย อังแอ้ง	<i>Stereospermum</i> spp.
42	เงาะป่า หมักแวว	<i>Nephelium</i> spp.
43	จันทรดง จันทน์ป่า	<i>Myristica</i> spp.
44	จันทร์ทอง	<i>Fraxinus floribunda</i>
45	จำปีป่า จำปาซ้อน จำปา จำปาป่า จำปากอ	<i>Manglietia</i> spp. <i>Michelia</i> spp. & <i>Aromadendron</i> spp.
46	จิกนม จิกเขา ยางมะฆาง ยางขนุนนก นาสี ศรีกระบี่	<i>Palaquium</i> spp. & <i>Aesandra</i> <i>krabiensis</i>
47	เฉียงพรว้านางแอ เชียงพรว้านางแอ คอแห้ง บงนัง บง มัน สี่พันนางแอ สันพรว้านางแอ	<i>Carallia brachiata</i>
48	ชะนูดตัน ชะนูด นูดตัน แดงซัง	<i>Prunus</i> spp.

ที่มา: พระราชกฤษฎีกา กำหนดไม้หวงห้าม, 2530

ตารางที่ 14.1 (ต่อ)

ลำดับ	ประเภท ก. ไม้หวงห้ามธรรมดา	ชื่อวิทยาศาสตร์
49	ชัน ชันตง เต็งตง เต็งตานี ฮาว ยางหมอก	<i>Shorea thorelii</i>
50	ชันพุ ตะเคียน เคียน แคน ตะเคียนทอง ตะเคียนใหญ่ ตะเคียนจง ตะเคียนไพร ตะเคียนขน ตะเคียนเขา หงอนไก่หลังขาว หลังขาว กระบกกรัง ตะเคียนหิน เหลาเตา อีแรด ตะเคียนราก	<i>Hopea</i> spp.
51	ชาเรียน ทูเรียนป่า ทูเรียนนก	<i>Durio</i> spp.
52	ข้างแตก ข้างแยะ ข้างไห้ ทูเรียนผี	<i>Neesia</i> spp.
53	ชิงชัน เก็ดแดง อีเม้ง พะยุงแกลบ กระพี แดงจีน ขะ ยุง ชิก กระชิก กระชิบ พะยุง หมากพลูตักแตน กระพีเขาควาย เก็ดดำ อีเฒ่า เก็ดเขาควาย	<i>Dalbergia</i> spp.
54	ชุมแพรก เสียดข้อ หงอนไก่ หงอนไก่ขาว หงอนไก่ทะเล ไข่ควาย ดุหนุ	<i>Heritiera</i> spp.
55	ชุมแสง	<i>Xanthophyllum</i> spp.
56	ข้อ ช้องแมว ร่มม้า สันปลาซ่อน	<i>Gmelina arborea</i>
57	ชาก คราก สาดร พันชาติ พันชาติ	<i>Erythrophleum</i> spp.
58	แดง สกรอม	<i>Xylia</i> spp.
59	แดงน้ำ	<i>Acrocarpus fraxinifolius</i>
60	แดงแสมแดง สะแหงแดง ดงแดง เหนียว	<i>Schoutenia</i> spp.
61	ตะคร้อ เคาะ โจ๊ก มะเคาะโจ๊ก	<i>Schleichera olcosa</i>
62	ตะคร้า ค้า หวิด	<i>Garuga pinnata</i>
63	ตะเคียนชันตาแมว ตะเคียนชัน	<i>Balanocarpus heimii</i>
64	ตะเคียนทราย ขย คันทอก ตะเคียนหอก ตะเคียนสามพอน	<i>Shorea gratissima</i>
65	ตะเคียนหนู เหว เบน ขี้หมากเปียก	<i>Anogeissus acuminata</i>
66	ตะบูน ตะบัน	<i>Xylocarpus</i> spp.
67	ตะแบก เปื่อย เกรียบ เสลา อินทนิล	<i>Lagerstroemia</i> spp.
68	ตะแบกกราย ตะแบกเลือด เปื่อยเลือด มะเกลือเลือด ปู้เจ้า หามกราย หนามกราย หอมกราย มะขามกราย แสนคำ รกฟ้า ออกฟ้า เชือก สมอพิเภก สมอไทย สมอ ดิงู สมอรัต สมอแหน มะนะ สมอชด อุ้ชด	<i>Terminalia</i> spp.
69	ตาเสือ มะอ้า มะห่างก่าน มะอ้าแดง มะอ้ายาง	<i>Amoora</i> spp.
70	ตานเลี่ยน นมฤๅษี โพสัย โพอาศัย	<i>Planchonella</i> spp.
71	ตั่ว ตั่ว ตั่วส้ม โง่งง	<i>Cratoxylum</i> spp.

ที่มา: พระราชกฤษฎีกา กำหนดไม้หวงห้าม, 2530

ตารางที่ 14.1 (ต่อ)

ลำดับ	ประเภท ก. ไม้หวงห้ามธรรมดา	ชื่อวิทยาศาสตร์
72	ตีนนก นน สมอนน สวอง ผ่าเสี้ยน กาสมปึก สะพุนทอง	<i>Vitex</i> spp.
73	ดินเบ็ด พญาสัตบรรณ สัตบรรณ เทียะ หุ้งฟ้า กระหุ้งฟ้า ดินเบ็ดพรุ	<i>Alstonia</i> spp.
74	ดุ่มเต้น ดุ่มกลาง อ้า คอเหนียง สะบันงาช้าง ปีกอ้า ลำพูป่า ลำแพนเขา	<i>Duabanga grandiflora</i>
75	เต็ง แะะ จิก รัง ฮัง เปา	<i>Shorea obtuse S.siamensis</i> <i>Pentacme suavis</i>
76	เตยนะ เตยหนาม หนาม	<i>Pentaspadon velutinus</i>
77	เตม ประดู่ส้ม	<i>Bischofia javanica</i>
78	เตียว สะเตียว	<i>Ganua</i> spp.
79	ทองบั้ง ทองบั้ง ยวน อีแปะ	<i>Koompassia</i> spp.
80	ทัง ทังเขา หมีเหม็น ตานหก ตันหก ทำม้ง กะทังใบ ใหญ่ ทังใบใหญ่	<i>Litsea</i> spp.
81	เทพทาโร จวง จวงหอม การบูรตัน ข่าตัน ตะไคร้ตัน พลูตัน สมุลแว้ง	<i>Cinnamomum porrectum</i> <i>C.parthenoxylon & C. ilicioides</i> <i>C. siamense</i>
82	นนทรี ทำเลง อะราง กระถินแดง	<i>Peltophorum</i> spp
83	น่อง ยางน่อง	<i>Antiaris toxicaria</i>
84	นางเลว หัวช้าง ทำช้าง กล้วย มะกล้วย สาแหรก	<i>Platymitra siamensis, Cyathocalyx martabanicus</i>
85	บง ยางบง หมี ไก่	<i>Persea</i> spp.
86	บุจนาค นากบุด	<i>Mesua</i> spp
87	ประดู่ ตู่	<i>Pterocarpus</i> spp
88	ประสัก ประสักขาว พังกาหัวสุม ประสักแดง ชล็ก ถั่วขาว รุ่ย รังกะได ถั่วดำ	<i>Bruguiera</i> spp
89	ปรู ปรู่	<i>Alangium salviifolium</i>
90	ปอเลียง ปอเลียงฝ้าย	<i>Kydia calycina</i>
91	โปง อีโปง	<i>Brownlowia helferiana</i>
92	โปรง โพรง	<i>Cerriops</i> spp
93	เฟิง เนา สะแกแสง กระดังงาไทย กระดังงาใบใหญ่	<i>Canaga</i> spp.
94	ฝาลม้อ ฝาละมี ตะพง เบื้องถั่วย เบื้องไท	<i>Endospermum diadenum</i>
95	ฝาด ตำเสาหนู เม่าทะเล	<i>Lumnitzera</i> spp.

ที่มา: พระราชกฤษฎีกา กำหนดไม้หวงห้าม, 2530

ตารางที่ 14.1 (ต่อ)

ลำดับ	ประเภท ก. ไม้หวงห้ามธรรมดา	ชื่อวิทยาศาสตร์
96	พญาไม้ ขุนไม้	<i>Podocarpus</i> spp.
97	พนอง เชื่อม	<i>Shorea hypochra</i>
98	พรมคต บงคต ขวัญข้าว เหมือดคน	<i>Helicia</i> spp.
99	พระเจ้าห้าพระองค์	<i>Dracontomelon mangiferum</i>
100	พลวง ตึง กุง เหียง กราด สะแบง ซาด	<i>Dipterocarpus</i> spp.
101	พลอง พลองกินลูก	<i>Memecylon ovatum</i>
102	พลับ มะพลับ ดำดง สังก้า เนียน ตะโก ดำ นางดำ ไหม้ นั้งจ้อย จัน ลำบิต กล้วยฤๅษี เอื้องกวาง ตาน ดำ กาะจะ มะเกลือ มะริด ถ่านไฟผี เม่าเหล็ก ตะโก พนม สาวดำ ริเภา ธิบู	<i>Diospyros</i> spp.
103	พะยอม ยอม ขะยอม พะยอมดง	<i>Shorea</i> spp.
104	พะวา ละวา วา ป้อง มะป่องตัน มังคุดป่า ขวาค ขวากเหลือง ขะมวง ส้มมวง โมง หมากรโมง มะดันป่า	<i>Garcinia</i> spp.
105	พันจำ สะเดาปัก สักน้ำ สักทะเล จันทน์กะพ้อ สี ดำต่าง	<i>Vatica</i> spp.
106	พันตัน พันตาล มังตาล ทั้งคาย ค่ายโซ่ ทะโล้	<i>Schima wallichii</i>
107	พิกุลป่า พิกุล พิกุลเขา กุน ขากุน ตรน	<i>Mimusops</i> spp. & <i>Payena</i> spp.
108	พุด พุดหนอง ข่อยหิน ข่อยดำน ไข่น้ำ รักนา คม ขวาน กระมอบ คำมอกหลวง	<i>Gardenia</i> spp.
109	ไฟ ลิไฟ มะกล่ำตัน มะกล่ำตาช้าง มะโหกแดง	<i>Adenanthera</i> spp.
110	มะเกี๋ย มะเหลียม มะกอกเหลียม มะจิม มะกอกเลือด มะกอกเกลื้อน มะเลื่อม มะกอกเลื่อม	<i>Canarium</i> spp.
111	มะค่าแต้ มะค่าลิง มะค่าหนาม กลิ้ง อ้ายกลิ้ง	<i>Sindora</i> spp.
112	มะค่าโมง มะค่าใหญ่ มะค่าดง เบง	<i>Afzelia xylocarpa</i>
113	มะค่าไก่ เทียนขโมย สองกระดอง	<i>Drypetes</i> spp.
114	มะขาง ขาง หนามขาง ละมุดสีดา	<i>Madhuca</i> spp.
115	มะแฟน หมากรแฟน แทน กะต๊ิบ	<i>Protium serratum</i>
116	มะม่วงป่าทุกชนิด	<i>Mangifera</i> spp.
117	มังคะ มังคาก	<i>Cynometra</i> spp.
118	เมี่ยงอาน สอม กะอาม กระทงลอย	<i>Crypteronia</i> spp.
119	โมกมัน โมกน้อย มุกน้อย	<i>Wrightia tomentosa</i>
120	โมกหลวง โมกใหญ่ มุกหลวง ยางพุด	<i>Holarrhena antidysenterica</i>
121	ยมหอม สุหรียญ	<i>Toona</i> spp. <i>Cedrela</i> spp.

ที่มา: พระราชกฤษฎีกา กำหนดไม้หวงห้าม, 2530

ตารางที่ 14.1 (ต่อ)

ลำดับ	ประเภท ก. ไม้หวงห้ามธรรมดา	ชื่อวิทยาศาสตร์
122	ยมหิน มะยมหิน สะเดาช้าง สะเดาหิน	<i>Chukrasia</i> spp.
123	ยุง อีโต้	<i>Dipterocarpus</i> spp.
124	รัก ฮัก รักใหญ่	<i>Melanorrhoea</i> spp.
125	รักเขา	<i>Semecarpus</i> spp.
126	รากเหลือง ฮากเหลือง	<i>Kokoona</i> spp.
127	ราชครูด้า	<i>Goniothalamus macrophyllus</i>
128	รายา สะระยา สยาแดง	<i>Shorea curtisii</i>
129	แร่ แทร แทรข้อ	<i>Dehaasia</i> spp.
130	เลียง เลียงมัน ไย ไยดำ	<i>Berrya</i> spp.
131	เลี่ยน แก่งแห้ง	<i>Melia</i> spp.
132	เลื้อดควาย เลือดม้า สีขวง	<i>Knema</i> spp.
133	สงแก สังกะ เขยหลาย	<i>Peronema canescens</i>
134	สนเขา สน เกียะ จ้วง ใต้ แปก	<i>Pinus</i> spp.
135	สนสามพันปี สนสร้อย สนพางกระรอก	<i>Dacrydium elatum</i>
136	สบ ปรก หอม	<i>Altingia</i> spp.
137	สมพง สมพุง กะปุง กะพง จุ่น	<i>Tetrameles nudiflora</i>
138	स्याขาว สยาเหลือง สยา มารันตี เมอรันตี	<i>Shorea leprosula</i> & <i>S. parvifolia</i>
139	สองสลิ้ง ยายบู๋ เสมัดทุ่ง	<i>Lophopetalum</i> spp.
140	สะเดา สะเลียม กะเดา เดา เทียม	<i>Azadirachta indica</i>
141	สะทิต ตาทิต สะทิบทอง คางคก สะทิบ สีไทรคางคก	<i>Phoebe</i> spp.
142	สักขี้ไก่ กะเปียด เปียด	<i>Premna tomentosa</i> . & <i>P. pyramidata</i>
143	ส้าน แส้น มะส้าน มะตาด	<i>Dillenia</i> spp.
144	สาย กาสาย แสนตาล้อม	<i>Pometia</i> spp.
145	สารภีป่า สารภี มะนาวก้าน	<i>Mammea</i> spp.
146	สีเสียดเปลือก ทองสุก หนานหิน เลือกนก	<i>Pentace</i> spp.
147	สีเสื่อ ผีเสื่อหลวง	<i>Casearia</i> spp.
148	หมักมือ ทะลอก มะพอก มะคลอก พอก ตะลอก เหลอะ	<i>Parinari anamense</i>
149	หลันตัน กะลันตัน ตะเคียนใบปด ยางดำ	<i>Shorea guiso</i>
150	หลุมพอ สลุมพอ กะลุมพอ หลุมพอทะเล หลุมพอเลือด	<i>Intsia</i> spp.
151	หว่า มะห้า ห้า แดงควน แดงเขา เมมา ชมพู	<i>Eugenia</i> spp.
152	หัวเต่า ขี้ผึ้ง	<i>Donella lanceolata</i> <i>Chrysophyllum roxburghii</i>

ที่มา: พระราชกฤษฎีกา กำหนดไม้หวงห้าม, 2530

ตารางที่ 14.1 (ต่อ)

ลำดับ	ประเภท ก. ไม้หวงห้ามธรรมดา	ชื่อวิทยาศาสตร์
153	หัวแมงวัน มะม่วงหัวแมงวัน มะม่วงแมงวัน	<i>Buchanania</i> spp.
154	เหรี๋ย เรียง กะเหรี๋ย สะตอ ลูกตึง	<i>Parkia</i> spp.
155	อบเชย ฮางแกง อังไ้ เคียด กะเคียด มหาปราบ	<i>Cinnamomum</i> spp.
156	เอียน เอียน	<i>Neolitsea zeylanica</i>
157	แอ็ก	<i>Shorea glauca</i>
158	โอบ ขานาง เปลือย เปื่อยนาง กะปิ ข้าวสาร ดีหมี่ หมากดุก ตะเคียนเผือก	<i>Homalium</i> spp.

ที่มา: พระราชกฤษฎีกา กำหนดไม้หวงห้าม, 2530

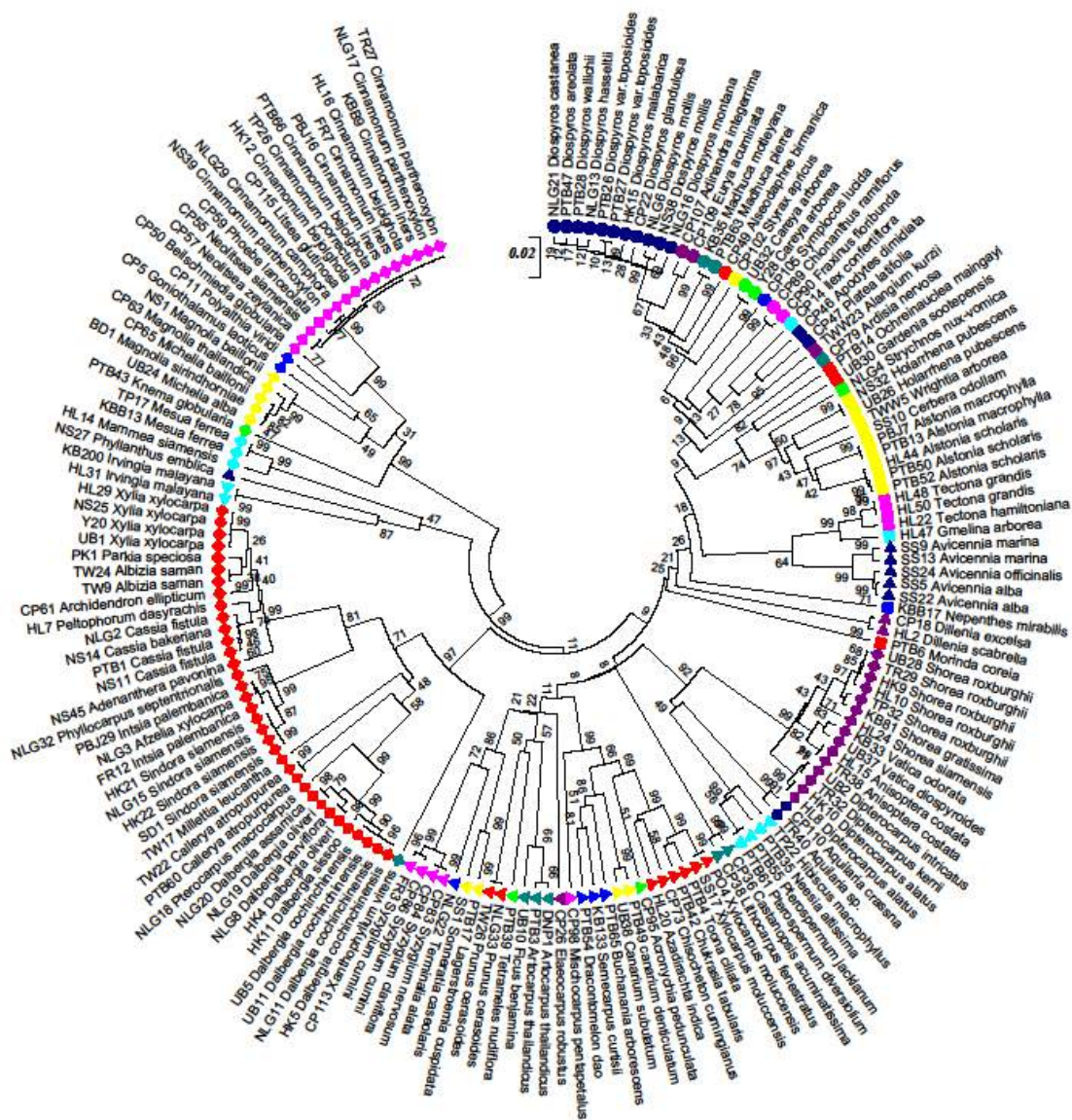
ตารางที่ 14.2 ไม้ประเภท ข. ไม้หวงห้ามพิเศษ

ลำดับ	ประเภท ข. ไม้หวงห้ามพิเศษ	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	กระเบา กระเบาไม้ กระเบาใหญ่	<i>Hydnocarpus anthelminthicus</i>
2	กำจัดัน มะเข่น แขว่น มะขวง ลูกกระมาศ	<i>Zanthoxylum</i> spp.
3	กำยาน	<i>Styrax</i> spp.
4	จันทน์ชะมด	<i>Aglaia pyramidata</i>
5	จันทน์หอม	<i>Mansonia gagei</i>
6	จันทนา จันทน์ขาว	<i>Tarenna hoaensis</i>
7	ดินเบ็ดแดง เยลูดง	<i>Dyera costulata</i>
8	ประ กระ	<i>Elateriospermum tapos</i>
9	รง รงทอง	<i>Garcinia acuminata</i> & <i>G.hanburyi</i>
10	สนแฝง สนใบต้อ แบกลม	<i>Calocedrus macrolepis</i>
11	สำโรง พงทะลาย ท้ายเถา	<i>Scaphium</i> spp.
12	แสลงใจ แสลงโหนด แสลงทม แสลงเปื้อ แสลงเปื้อ มะตึง ตึงตัน บึงกา ตุมกา ตึง ตุมกาขาว	<i>Strychnos</i> spp.
13	แหลง แสลง ยวนฝิ่ง ฝิ่ง ลุง	<i>Ficus albipila</i>

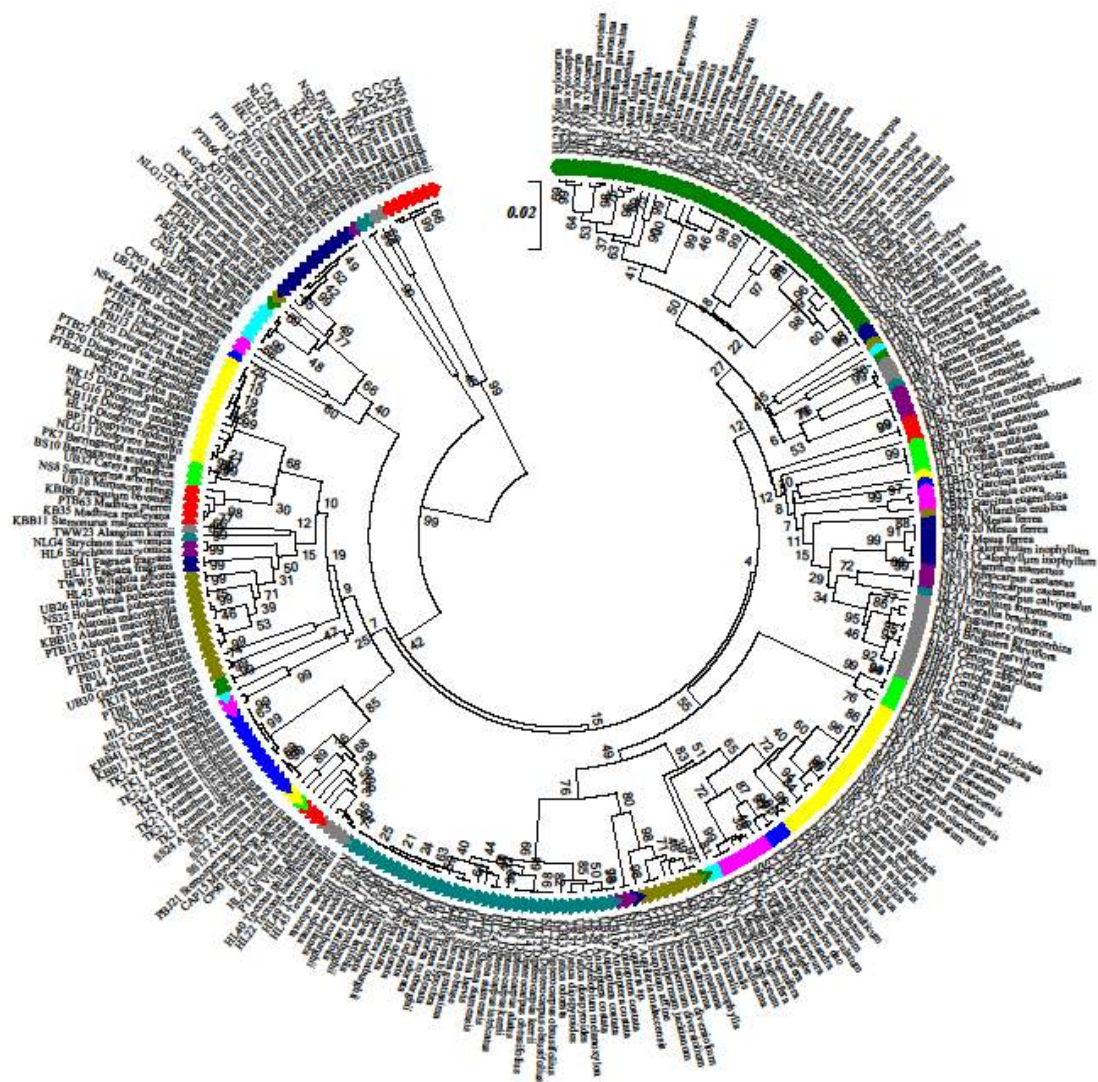
ที่มา: พระราชกฤษฎีกา กำหนดไม้หวงห้าม, 2530

ผลการศึกษาวิจัย

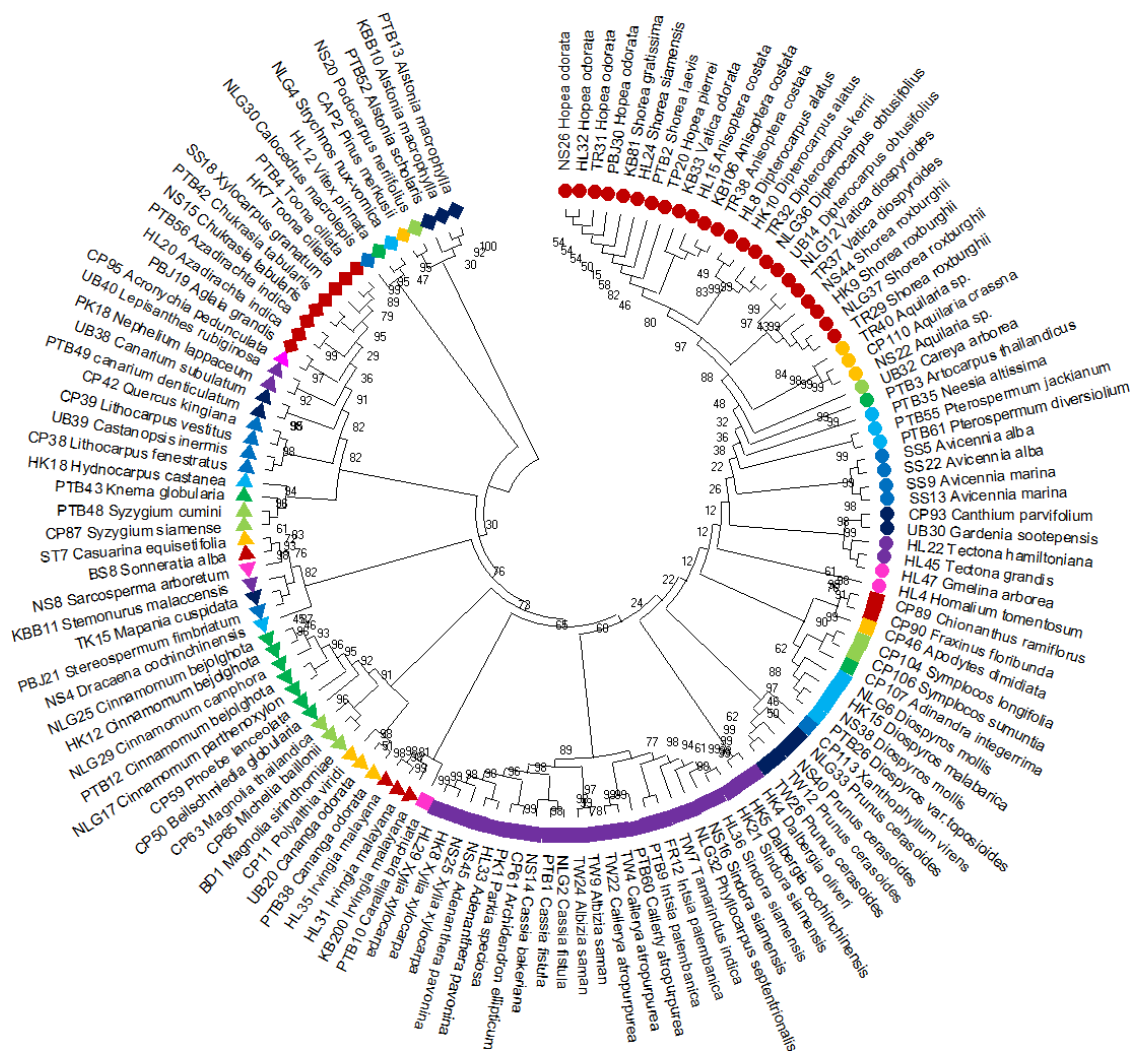
จากการเพิ่มปริมาณซีเอ็นดีเอ็นเอของตัวอย่างพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ในประเทศไทย ด้วยคลอโรพลาสจีโนม 3 ตำแหน่ง คือ Maturase K, RBCL (Ribulose Bisphosphate Carboxylase large chain) และ trnH-psbA (intergenic spacer) มีความยาวนิวคลีโอไทด์ 550 bp 450 bp และ 1,000bp พบว่าตำแหน่ง Maturase K จำนวน 168 ตัวอย่าง สามารถจำแนกออกได้เป็น 45 วงศ์ (families) 90 สกุล (Genus) 126 ชนิด (speices) ดังภาพที่ 14.1 ตำแหน่ง RBCL จำนวน 278 ตัวอย่าง สามารถจำแนกออกได้เป็น 55 วงศ์ 100 สกุล 161 ชนิดดังภาพที่ 14.2 และ ตำแหน่ง trnH-psbA จำนวน 133 ตัวอย่าง สามารถจำแนกออกได้เป็น 42 วงศ์ 75 สกุล 96 ชนิด ดังภาพที่ 14.3 ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ทั้ง 3 ตำแหน่ง สามารถจำแนกออกได้เป็น 65 วงศ์ 140 สกุล 214 ชนิด รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 14.3 นอกจากนี้ พบว่ามี 52 ตัวอย่าง ที่เพิ่มปริมาณซีเอ็นเอได้ทั้ง 3 ตำแหน่ง ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกออกได้เป็น 19 วงศ์ 34 สกุล 47 ชนิด ดังภาพที่ 14.4 และแสดงรายละเอียดการจำแนกดังตารางที่ 14.3 ส่วนความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยวิธี UPGMA

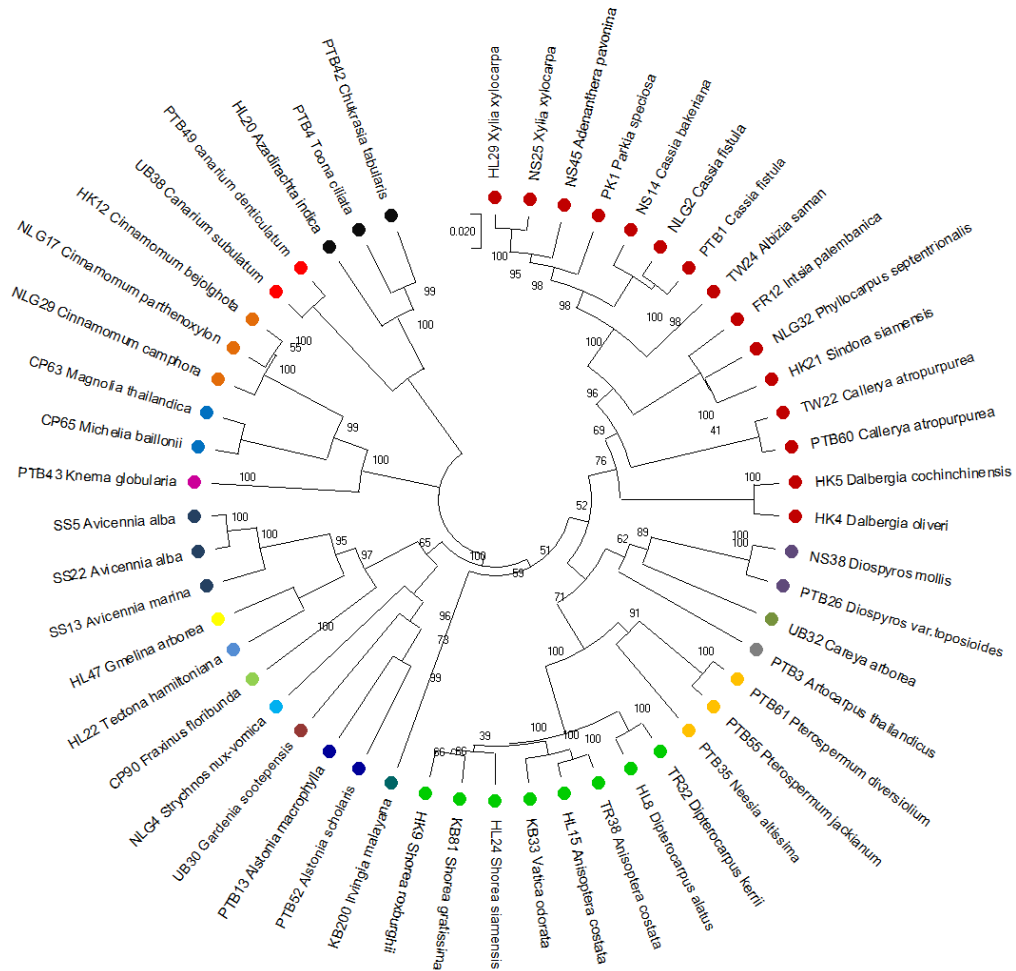


ภาพที่ 14.1 แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ในตำแหน่ง Maturase K



ภาพที่ 14.2 แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ในตำแหน่ง RBCL





ภาพที่ 14.4 แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ใน 3 ตำแหน่ง คือ Maturase K + RBCL + trnH-psbA

ตารางที่ 14.3 ตารางแสดงผลการถอดรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ในพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Maturase K, rbcl (Ribulose Biphosphate Carboxylase large chain) และ trnH-psbA (intergenic spacer)

ลำดับ	วงศ์	ชื่อพฤกษศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง
1	ACANTHACEAE	<i>Acanthus ilicifolius</i>	เหงือกปลาหมอทะเล
		<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว
		<i>Avicennia marina</i>	แสมทะเล
		<i>Avicennia officinalis</i>	แสมดำ
2	ACHARIACEAE	<i>Hydnocarpus calvipetalus</i>	กระเบา
		<i>Hydnocarpus castaneas</i>	กระเบาใหญ่
3	ANACARDIACEAE	<i>Buchanania arborescens</i>	ยาร่วงพรุ
		<i>Canaga odorata</i>	กระดังงาไทย
		<i>Dracontomelon dao</i>	พระเจ้าห้าพระองค์
		<i>Mangifera gedebe</i>	มะม่วงปาน
		<i>Mangifera lagenifera</i>	มะม่วงป่า
		<i>Semecarpus curtisii</i>	รักป่า
4	ANNONACEAE	<i>Canaga odorata</i>	กระดังงาไทย
		<i>Goniothalamus laoticus</i>	ข้าวหลามดง
		<i>Melodorum fruticosum</i>	ลำดวน
		<i>Polyalthia viridi</i>	ยางโอน
5	APOCYNACEAE	<i>Alstonia macrophylla</i>	ทุ้งฟ้า
		<i>Alstonia scholaris</i>	พญาสัตบรรณ/ สัตบรรณ/ ตีนเป็ดดำ
		<i>Cerbera odollam</i>	ตีนเป็ดทะเล
		<i>Holarrhena pubescens</i>	โมกหลวง
		<i>Wrightia arborea</i>	โมกมัน
6	AQUIFOLIACEAE	<i>Ilex confertiflora</i>	เม็ดทับทิม
7	ASPARAGACEAE	<i>Dracaena cochinchinensis</i>	จันทร์แดง
8	BIGNONIACEAE	<i>Mayodendron igneum</i>	กาสะลองคำ
		<i>Stereospermum fimbriatum</i>	แคยอดดำ
9	BURSERACEAE	<i>Canarium denticulatum</i>	แลนบาน
		<i>Canarium subulatum</i>	มะกอกเลื่อม
10	CALOPHYLLACEAE	<i>Calophyllum inophyllum</i>	สารภีทะเล
		<i>Mammea siamensis</i>	สารภี
		<i>Mesua ferrea</i>	บุนนาค
11	CASUARINACEAE	<i>Casuarina equisetifolia</i>	สนทะเล
12	CHRYSOBALANACEAE	<i>Parinari anamensis</i>	มะพอก
13	COMBRETACEAE	<i>Terminalia alata</i>	รกฟ้า
		<i>Terminalia citrina</i>	สมอติ่ง
14	CORNACEAE	<i>Alangium kurzii</i>	ฝาละมี

ลำดับ	วงศ์	ชื่อพฤกษศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง
15	CUPRESSACEAE	<i>Calocedrus macrolepis</i>	สนแผง
16	CYPERACEAE	<i>Mapania cuspidata</i>	ใบเตย
17	DILLENIACEAE	<i>Dillenia excelsa</i>	सानดำ
		<i>Dillenia indica</i>	มะตาด
		<i>Dillenia scabrella</i>	सान
18	DIPTEROCARPACEAE	<i>Anisoptera costata</i>	กระบาก
		<i>Cotylelobium melanoxyton</i>	เคี่ยม
		<i>Dipterocarpus alatus</i>	ยางนา
		<i>Dipterocarpus intricatus</i>	กราด
		<i>Dipterocarpus kerrii</i>	ยางมันหมู
		<i>Dipterocarpus obtusifolius</i>	เหียง
		<i>Hopea pierrei</i>	ตะเคียนราก
		<i>Hopea odorata</i>	ตะเคียนทอง
		<i>Shorea gratissima</i>	เคียนทราย
		<i>Shorea hypochra</i>	พนอง
		<i>Shorea laevis</i>	ตะเคียนสามพอน
		<i>Shorea obtuse</i>	เต็ง
		<i>Shorea robusta</i>	สาละ
		<i>Shorea roxburghii</i>	พะยอม
		<i>Shorea siamensis</i>	รัง
		<i>Vatica diospyroides</i>	จันทน์กะพ้อ
		<i>Vatica odorata</i>	พันทจำ
19	EBENACEAE	<i>Diospyros areolata</i>	มะพลับ
		<i>Diospyros castanea</i>	ตานดำ
		<i>Diospyros decandra</i>	จัน
		<i>Diospyros frutescens</i>	พลับกล้วย
		<i>Diospyros glandulosa</i>	กล้วยฤๅษี
		<i>Diospyros hasseltii</i>	ตะโก
		<i>Diospyros malabarica</i>	พลับป่า
		<i>Diospyros mollis</i>	มะเกลือ
		<i>Diospyros montana</i>	ถ่านไฟผี้
		<i>Diospyros undulata</i>	หม้าย
		<i>Diospyros var. toposioides</i>	เม่าเหล็ก
		<i>Diospyros wallichii</i>	ดำตะโก
20	ELAEOCARPACEAE	<i>Elaeocarpus tectorius</i>	สะท้อนรอก
		<i>Elaeocarpus rugosus</i>	กระท้อนรอก
21	EUPHORBIACEAE	<i>Cleidion javanicum</i>	ดีหมี่
		<i>Endospermum diadenum</i>	ฝาละมี
22	FABACEAE	<i>Adenantha pavonina</i>	มะกล่ำต้น

ลำดับ	วงศ์	ชื่อพฤกษศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง
		<i>Azizia xylocarpa</i>	มะค่าโมง
		<i>Albizia saman</i>	จามจุรี
		<i>Archidendron ellipticum</i>	เกล็ดจระเข้
		<i>Callerya atropurpurea</i>	แฉะ
		<i>Cassia bakeriana</i>	กัลปพฤกษ์
		<i>Cassia fistula</i>	ราชพฤกษ์/ คูณ
		<i>Cynometra malaccensis</i>	มังคาก
		<i>Dalbergia assamica</i>	เก็ดดำ
		<i>Dalbergia cochinchinensis</i>	พะยุง
		<i>Dalbergia oliveri</i>	ชิงชัน/ เก็ดแดง
		<i>Dalbergia parviflora</i>	กระซิก
		<i>Dalbergia sissoo</i>	ประดู่แขก
		<i>Intsia palembanica</i>	หลุมพอ
		<i>Millettia leucantha</i>	สาธร
		<i>Parkia speciosa</i>	สะตอ
		<i>Peltophorum dasyrachis</i>	อะราง
		<i>Peltophorum pterocarpum</i>	นนทรีป่า
		<i>Phyllocarpus septentrionalis</i>	ประดู่แดง
		<i>Pterocarpus indicus</i>	ประดู่บ้าน
		<i>Pterocarpus macrocarpus</i>	ประดู่
		<i>Sindora siamensis</i>	มะค่าแต้
		<i>Xylia xylocarpa</i>	แดง
		<i>Tamarindus indica</i>	มะขาม
23	FAGACEAE	<i>Castanopsis acuminatissima</i>	ก่อเดือย
		<i>Castanopsis costata</i>	ก่อรีว
		<i>Castanopsis inermis</i>	ก่อข้าว
		<i>Lithocarpus fenestratus</i>	ก่อพวง
		<i>Lithocarpus vestitus</i>	ก่อขี้หมู
		<i>Quercus kingiana</i>	ก่อแดง
24	GENTIANACEAE	<i>Fagraea fragrans</i>	กันเกรา
25	GUTTIFERACEAE	<i>Garcinia atroviridis</i>	ชะมวงช้าง
		<i>Garcinia cowa</i>	ชะมวง
		<i>Garcinia eugenifolia</i>	นวลดอกขาว
26	HYPERICACEAE	<i>Cratoxylum cochinchinense</i>	ตีวเกลี้ยง
		<i>Cratoxylum maingayi</i>	ตีวขน,แต้ว
27	ICACINACEAE	<i>Apodytes dimidiata</i>	หมักฟักดง
		<i>Platsea latifolia</i>	มันหมู
28	IRVINGIACEAE	<i>Irvingia malayana</i>	กระบก
29	LABIATAE	<i>Tectona grandis</i>	สัก

ลำดับ	วงศ์	ชื่อพฤกษศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง
		<i>Tectona hamiltoniana</i>	สักพม่า
		<i>Tectona philippinensis</i>	สักฟิลิปปินส์
30	LAMIACEAE	<i>Gmelina arborea</i>	ซ้อ
		<i>Vitex glabrata</i>	ไข่น้ำ
		<i>Vitex pinnata</i>	ตีนนก
		<i>Beilschmiedia globularia</i>	มะเขือขึ้น
31	LAURACEAE	<i>Cinnamomum bejolghota</i>	อบเชย
		<i>Cinnamomum camphora</i>	การบูร
		<i>Cinnamomum ilicioides</i>	ตะไคร้ต้น
		<i>Cinnamomum iners</i>	เขียด
		<i>Cinnamomum parthenoxylon</i>	เทพทาร์
		<i>Cinnamomum verum</i>	อบเชยเทศ
		<i>Litsea glutinosa</i>	หมีเหม็น
		<i>Neolitsea siamensis</i>	ตาทาบ
		<i>Neolitsea zeylanica</i>	เอียน
		<i>Phoebe lanceolata</i>	แหลุก
32	LECYTHIDACEAE	<i>Barringtonia acutangula</i>	จิกน้ำ
		<i>Careya arborea</i>	กระโดน
33	LYTHERACEAE	<i>Lagerstroemia calyculata</i>	ตะแบกแดง
		<i>Lagerstroemia cuspidata</i>	ตะแบก
		<i>Lagerstroemia speciosa</i>	อินทนิลน้ำ
		<i>Sonneratia alba</i>	ลำแพน
		<i>Sonneratia caseolaris</i>	ลำพู
34	MAGNOLIACEAE	<i>Magnolia baillonii</i>	จำปีป่า
		<i>Magnolia champaca</i>	จำปา
		<i>Magnolia sirindhorniae</i>	จำปีสิรินธร
		<i>Magnolia thailandica</i>	จำปีศรีเมืองไทย
		<i>Michelia alba</i>	จำปี
35	MALVACEAE	<i>Heritiera littoralis</i>	หงอนไก่ทะเล
		<i>Heritiera macrophylla</i>	หงอนไก่ใบใหญ่
		<i>Heritiera sumatrana</i>	เสียดข้อ
		<i>Hibiscus macrophyllus</i>	ปอจง (ปอหู)
		<i>Neesia altissima</i>	ทุเรียนผี
		<i>Pterospermum diversifolium</i>	ลำป้าง
		<i>Pterospermum jackianum</i>	พลากรวง
36	MELIACEAE	<i>Aglaia cucullata</i>	แตงน้ำ(แสมแดง)
		<i>Aglaia grandis</i>	ลางสาดป่า
		<i>Azadirachta indica</i>	สะเดา
		<i>Chisocheton cumingianus</i>	ยมมะกอก

ลำดับ	วงศ์	ชื่อพฤกษศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง
		<i>Chukrasia tabularis</i>	ยมหิน
		<i>Lansium parasiticum</i>	กลางสาตเขา
		<i>Toona ciliata</i>	ยมหอม
		<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว
		<i>Xylocarpus moluccensis</i>	ตะบูนดำ/ตะบัน
37	MORACEAE	<i>Artocarpus thailandicus</i>	มะหาด
		<i>Ficus benjamina</i>	ไทรย้อย
38	MYRISTICACEAE	<i>Horsfieldia amygdalina</i>	เลื้อยตนก
		<i>Knema globularia</i>	เลื้อยดำ
39	MYRTACEAE	<i>Syzygium nervosa</i>	หว่าเขา
		<i>Syzygium claviflora</i>	หว่าหิน
		<i>Syzygium cumini</i>	หว่า
		<i>Syzygium siamense</i>	ชมพูน้ำ
40	NEPENTHACEAE	<i>Nepenthes mirabilis</i>	หม้อข้าวหม้อแกงลิง
41	OCHANCEAE	<i>Ochna integerrima</i>	ช้างน้าว
42	OLEACEAE	<i>Chionanthus ramiflorus</i>	อวบน้ำ
		<i>Fraxinus floribunda</i>	จันทร์ทอง
43	PENTAPHYLACACEAE	<i>Adinandra integerrima</i>	พิกุลป่า
	PHYLLANTHACEAE	<i>Eurya acuminata</i>	ปลายสาน
		<i>Phyllanthus emblica</i>	มะขามป้อม
44	PINACEAE	<i>Pinus kesiya</i>	สนสามใบ
		<i>Pinus merkusii</i>	สนสองใบ
45	POACEAE	<i>Dendrocalamus pendulus</i>	ไผ่นวล
46	PODOCARPACEAE	<i>Dacrydium elatum</i>	สามพันปี
		<i>Podocarpus neriifolius</i>	พญาไม้
47	POLYGALACEAE	<i>Xanthophyllum virens</i>	ขางขาว
		<i>Coccoloba uvifera</i>	องุ่นทะเล
48	PRIMULACEAE	<i>Ardisia nervosa</i>	กำลังกาสาตัวผู้
49	RHIZOPHORACEAE	<i>Bruguiera cylindrica</i>	ถั่วขาว
		<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	พังกาหัวส้มดอกแดง
		<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ
		<i>Carallia brachiata</i>	เฉียงพ้านางแอ
		<i>Ceriops decandra</i>	โปรงขาว
		<i>Ceriops tagal</i>	โปรงแดง
		<i>Ceriops zippeliana</i>	โปรงทอง
50	ROSACEAE	<i>Prunus cerasoides</i>	นางพญาเสือโคร่ง
51	RUBIACEAE	<i>Canthium parvifolium</i>	หนามมะเค็ด
		<i>Gardenia sootepensis</i>	ค้ำมอกหลวง
		<i>Morinda coreia</i>	ยอป่า

ลำดับ	วงศ์	ชื่อพฤกษศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง
52	RUBIACEAE	<i>Ochreinauclea maingayi</i>	กระทุ่มน้ำ
53	RUTACEAE	<i>Acronychia pedunculata</i>	กะอวม
		<i>Limonia acidissima</i>	มะขวิด
54	SALICACEAE	<i>Homalium tomentosum</i>	ขานาง
55	SAPINDACEAE	<i>Lepisanthes rubiginosa</i>	มะหวด
		<i>Mischocarpus pentapetalus</i>	พะบัง
		<i>Nephelium lappaceum</i>	เงาะสีชมพู
56	SAPOTACEAE	<i>Madhuca motleyana</i>	สะเตียว
		<i>Madhuca pierrei</i>	ซาง
		<i>Mimusops elengi</i>	พิกุล
		<i>Palaquium obovatum</i>	เตี้ยวพรุ
		<i>Sarcosperma arboretum</i>	มะยาง,เหมือดหอม
57	STENMONURACEAE	<i>Stemonurus malaccensis</i>	อ้ายบาว
58	STERCULIACEAE	<i>Scaphium affine</i>	สำโรง
59	STRYCHNACEAE	<i>Strychnos nux-vomica</i>	แสลงใจ
60	STYRACACEAE	<i>Styrax apricus</i>	กำยาน
61	SYMPLOCACEAE	<i>Symplocos lucida</i>	เหมือดสันนูน
		<i>Symplocos longifolia</i>	เหมือดคนดำ
		<i>Symplocos sumuntia</i>	เหมือดปลาชีว
62	TETRAMELACEAE	<i>Tetrameles nudiflora</i>	สมพง
63	THYMELAEACEAE	<i>Aquilaria crassna</i>	กฤษณา
64	VERBENACEAE	<i>Gmelina arborea</i>	ช่อ
65	ZINGIBERACEAE	<i>Alseodaphne birmanica</i>	ขมิ้นต้น

สรุปผลการศึกษาวิจัย

การศึกษาค้างนี้ได้จัดทำดีเอ็นเอบาโค้ดจากพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ในประเทศไทย โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบและเปลือกของพันธุ์ไม้แต่ละชนิด จำนวน 579 ตัวอย่าง และถอดรหัสพันธุกรรมของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์จีโนม 3 ตำแหน่ง คือ Maturase K, rbcl (Ribulose Biphosphate Carboxylase large chain) และ trnH-psbA (intergenic spacer) มีความยาวนิวคลีโอไทด์ 550 bp 450 bp และ 1,000bp ตามลำดับ สามารถถอดรหัสพันธุกรรมด้วยยีน Maturase K จากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมในไม้ป่าของประเทศไทยได้ จำนวน 168 ตัวอย่าง สามารถจำแนกออกได้เป็น 45 วงศ์ (families) 90 สกุล (Genus) 126 ชนิด (species) ยีน RBCL จำนวน 278 ตัวอย่าง สามารถจำแนกออกได้เป็น 55 วงศ์ 100 สกุล 161 ชนิด และตำแหน่ง trnH-psbA จำนวน 133 ตัวอย่าง นอกจากนี้ได้วิเคราะห์รวมกัน 3 ตำแหน่งพบว่าสามารถจำแนกได้ 65 วงศ์ (Family) 140 สกุล (Genus) และ 240 ชนิด (Species) ซึ่งสอดคล้องกับ

การจำแนกทางอนุกรมวิธาน ข้อมูลดังกล่าวได้เป็นฐานข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบชิ้นส่วนไม้ของกลาง ทั้งในอดีตและในอนาคตได้

ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการพิสูจน์หลักฐานในการวินิจฉัยชนิดพันธุ์ไม้ที่ถูกลักลอบตัดอย่างผิดกฎหมายเพื่อพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของผู้ที่ถูกฟ้องร้องได้ทำผิดกฎหมายหรือไม่

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป การจัดทำฐานข้อมูลพันธุ์กรรมของไม้ป่าในประเทศไทยโดยการถอดรหัสพันธุ์กรรมกำลังต้องดำเนินการในพันธุ์ไม้ป่าที่หายากใกล้สูญพันธุ์ พันธุ์ไม้ป่าที่มีความสำคัญพันธุ์ไม้ป่าสมุนไพร และพันธุ์ไม้ที่สำคัญในประเทศเพื่อเป็นฐานข้อมูลทางด้านดีเอ็นเอของพันธุ์ไม้ในประเทศไทย ซึ่งปัจจุบันพบว่าฐานข้อมูลทางด้านดีเอ็นเอและรหัสพันธุ์กรรมของพันธุ์ไม้ในประเทศไทยยังมีไม่มาก

บทที่ 15

การจำแนกไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*) ออกจาก ไม้ประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus*) ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) กระพี้เขาควาย (*Dalbergia cultrata*) เก็ดดำ (*Dalbergia assamica*) โดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีน Maturase K

คำนำ

พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*) จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว (Leguminosae-Papilionoideae) พะยุง (*D. cochinchinensis*) เป็นไม้เศรษฐกิจที่สำคัญในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบได้ใน กัมพูชา ลาว และไทย สำหรับในประเทศไทยนั้นพบในแถบทางภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศ มีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติอยู่ในป่าผสมผลัดใบและป่าดิบแล้งที่สูงจากระดับน้ำทะเล 50-200 เมตร เป็นไม้ผลัดใบที่มีขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่ (Niyomdham, 2002) ลักษณะเด่นของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) คือ เนื้อไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) โดยกระพี้ (sapwood) ส่วนใหญ่มีสีขาว มีความกว้าง 40-50 มิลลิเมตร ส่วนแก่น (heartwood) มีสีม่วงอ่อนกุหลาบ (light rose purple) ไปจนถึง สีม่วงแดง (burgundy) โดยมีริ้วลายสีน้ำตาลดำหรือสีดำ เป็นไม้ที่ทนทานและแข็งแรง คุณสมบัติเหล่านี้ทำให้เป็นที่สนใจและต้องการอย่างยิ่ง ซึ่งทำให้เป็นที่รู้จักกันในชื่อของ Thailand rosewood หรือ Siamese Rosewood (Keating and Bolza, 1982) พะยุง (*D. cochinchinensis*) จัดไม้ยืนต้นที่มีคุณค่าในอันดับต้นๆของไทย และถือเป็นไม้มงคลชั้นสูง เนื่องจากพะยุง (*D. cochinchinensis*) มีเนื้อไม้หรือแก่นไม้ที่มีสีสันทลวยงดงาม ชักเงาดี และคงทนแข็งแรงดังนั้นจึงมักถูกนำไปใช้ประโยชน์ ทั้งในลักษณะของไม้แปรรูปในการก่อสร้าง และทำเฟอร์นิเจอร์ เครื่องดนตรี เครื่องไม้เครื่องมือต่างๆ รวมถึงวัตถุมงคล ในปัจจุบันเนื้อไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะจีน ไต้หวัน และเวียดนาม และมีราคาค่อนข้างสูงด้วยเหตุดังกล่าวจึงเกิดขบวนการลักลอบตัดไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ในประเทศไทย นอกจากนี้ปัจจุบันพบปัญหาการจำแนกไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ออกจากไม้ที่มีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกัน เช่น ประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus*) ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) กระพี้เขาควาย (*Dalbergia cultrata*) และเก็ดดำ (*Dalbergia assamica*) ทำได้ยากด้วยตาเปล่าจะต้องมีการเอื้อนเนื้อไม้เพื่อดูจากแว่นขยายและผู้เชี่ยวชาญจึงจะสามารถจำแนกได้ ส่วนในการทวนสอบว่าเป็นไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) หรือไม่สามารถจำแนกโดยรหัสพันธุกรรมจำเพาะ ในการจัดทำฐานข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ในการจำแนกชนิดไม้ที่ไม่สามารถพิสูจน์ลักษณะทางสัณฐานและกายภาพในรูปแบบที่แตกต่างกันไป เช่น ขี้เลื่อยที่ตกอยู่ในที่เกิดเหตุ หรือขี้เลื่อยที่ติดอยู่ที่ใบเลื่อยยนต์ ผลิตภัณฑ์รูปแบบต่างๆ ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องดำเนินการในการจัดทำฐานข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะในไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) และไม้ที่มีความสำคัญ และมีค่าทางเศรษฐกิจ

วิธีการศึกษาวิจัย

Changtragoon and Singthong (2016) ได้สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบไม้และเนื้อไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ชิงชัน (*D. oliveri*) เก็ดดำ (*D. assamica*) กระพี้เขาควาย (*D. cultrata*) และประดู่ (*P. macrocarpus*) ด้วยวิธี Doyle and Doyle (1990) และวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ ด้วยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่ยีน maturase K ขนาด 470 bp นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณเรียบร้อยแล้วมาวิเคราะห์หาลำดับพันธุกรรมจากเครื่อง ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied) Biosystem, USA และนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับ นิวคลีโอไทด์ กับฐานข้อมูล genbank และนำไปจำแนกกลุ่มโดยการวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) วิธี Neighbour Joining method แบบ Bootstrap (Felsenstein, 1985).

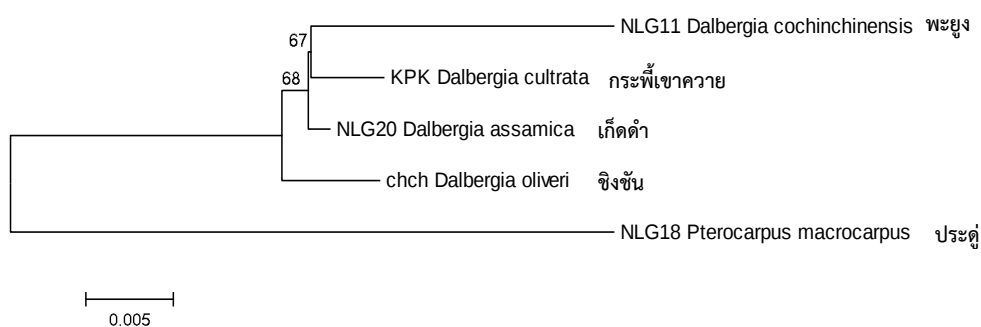
ผลการศึกษาวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการจำแนกไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ออกจาก ชิงชัน (*D. oliveri*) เก็ดดำ (*D. assamica*) กระพี้เขาควาย (*Dalbergia cultrata*) และประดู่ (*P. macrocarpus*) โดยการถอดรหัสพันธุกรรมใน ยีน Maturase K ขนาด 720 bp ดีเอ็นเอสกัดได้จากใบไม้และเนื้อไม้ของตัวอย่างชนิดไม้ดังกล่าวข้างต้นพบว่าไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากไม้ชิงชัน (*D. oliveri*) เก็ดดำ (*D. assamica*) กระพี้เขาควาย (*D. cultrata*) และประดู่ (*P. macrocarpus*) ถึง 41 ตำแหน่ง โดยไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) 19 ตำแหน่ง, กระพี้เขาควาย (*D. cultrata*) 19 ตำแหน่ง เก็ดดำ (*D. assamica*) 16 ตำแหน่ง และประดู่ (*P. macrocarpus*) 49 ตำแหน่ง ส่วนความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) เปรียบเทียบกับ ประดู่ (*P. macrocarpus*) ชิงชัน (*D. oliveri*) กระพี้เขาควาย (*D. cultrata*) และเก็ดดำ (*D. assamica*) แสดงดังภาพที่ 15.1 ภาพที่ 15.2 แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ประดู่ (*P. macrocarpus*) ชิงชัน (*D. oliveri*) กระพี้เขาควาย (*D. cultrata*) และเก็ดดำ (*D. assamica*) (Changtragoon and Singthong, 2016)

	10	20	30	40	50
NLG11 <i>Dalbergia cochinchinensis</i>	AACTTTACTG	GTTTGGACGT	ACGGGGTCCT	CATTCTCCCG	CTCATGGGGC CTGGAGT
chch <i>Dalbergia oliveri</i>	...G...A.	...CA.A..	A..	---CA..T.A	T.AAT A...A.
NLG20 <i>Dalbergia assamica</i>	...G...A.	...C....	.T....A..	---CA..T..	T.AA. A...A.
KPK <i>Dalbergia cultrata</i>	...G...A.	...C....C	A..	---CA..T..	.C...T.AA. A..T.A.
NLG18 <i>Pterocarpus macrocarpus</i>	CCGGGCTTAT	ACAGC.C.T.	C.AATCCATA	---CACATA.	A.AGGTAAA. ACA.GAC

ภาพที่ 15.1 แสดงตำแหน่งและชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะของไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) ที่แตกต่างจาก ไม้ชิงชัน (*D. oliveri*) กระพี้เขาควาย (*D. cultrata*) เก็ดดำ (*D. assamica*) และ ประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus*) ในยีน Mat K

หมายเหตุ : พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) 19 ตำแหน่ง
 : พะยูน (*D. cochinchinensis*) มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก กระพี้เขาควาย (*Dalbergia cultrata*) 18 ตำแหน่ง
 : พะยูน (*D. cochinchinensis*) มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก เก็ดดำ (*Dalbergia assamica*) 16 ตำแหน่ง
 : พะยูน (*D. cochinchinensis*) มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก ประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus*) 49 ตำแหน่ง



ภาพที่ 15.2 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) กระพี้เขาควาย (*D. cultrata*) เก็ดดำ (*D. assamica*) ชิงชัน (*D. oliveri*) และประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus*) ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining แบบ Bootstrap โดยโปรแกรม MEGA4

สรุปผลการศึกษาวิจัย

1. ในการถอดรหัสพันธุกรรมที่ยีน *Maturase K* นั้นสามารถจำแนกไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ออกจากไม้ ไม้ประดู่ (*P. macrocarpus*) ชิงชัน (*D. oliveri*) กระจี้เขาควาย (*D. cultrata*) เก็ดดำ (*D. assamica*) โดยพบว่าไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากไม้ ชิงชัน (*D. oliveri*) เก็ดดำ (*D. assamica*) กระจี้เขาควาย (*D. cultrata*) และประดู่ (*P. macrocarpus*) ถึง 41 ตำแหน่ง โดยพะยูน (*D. cochinchinensis*) มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก ชิงชัน (*D. oliveri*) 19 ตำแหน่ง, กระจี้เขาควาย (*D. cultrate*) 19 ตำแหน่ง เก็ดดำ (*D. assamica*) 16 ตำแหน่ง และประดู่ (*P. macrocarpus*) 49 ตำแหน่ง
2. สามารถพิสูจน์ชนิดจากไม้ที่มีลักษณะทางสัณฐานและกายภาพในรูปแบบที่แตกต่างกันไป เช่น ขี้เลื่อย ผลิตภัณฑ์รูปแบบต่างๆได้โดยใช้การถอดรหัสพันธุกรรมยีนจาก *Maturase K*
3. สามารถใช้ในการทวนสอบในการจำแนกจากทางสัณฐานวิทยาและทางกายภาพ
4. สามารถเสริมศักยภาพและนำไปขยายผลต่อการปฏิบัติในการป้องกันและบังคับใช้กฎหมายของ กองคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าตามอนุสัญญา (ไซเตส: อนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิด สัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้จะสูญพันธุ์)
5. สามารถนำเสนอให้ ไซเตส: อนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ ใกล้จะสูญพันธุ์ ควบคุมการค้าระหว่างประเทศของผลิตภัณฑ์ของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) เพราะ สามารถจำแนกไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ออกจากไม้ชนิดอื่นๆ จากผลิตภัณฑ์ได้จากการวิเคราะห์ ทางดีเอ็นเอได้ (Changtragoon and Singthong, 2016)

บทที่ 16

การจำแนกไม้สะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica*) โดยยีน Maturase K ในคลอโรพลาสต์จีโนม คำนำ

ไม้สะเดา (*Azadirachta* spp.) เป็นไม้ต้นที่ปลูกจัดอยู่ในวงศ์ Meliaceae และเป็นไม้ดั้งเดิมของเขตเอเชียอาคเนย์ ซึ่งมีการกระจายพันธุ์อยู่ในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน พบในป่าเขตร้อนทั่วไปเช่น ในประเทศอินเดีย ปากีสถาน ศรีลังกา มาเลเซีย อินโดนีเซีย และพม่า (Forster and Moser, 2000) และนำไปปลูกในประเทศต่างๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หมู่เกาะแปซิฟิก ออสเตรเลีย อเมริกากลางและอเมริกาใต้ แคริเบียน และตะวันออกกลาง (Stoney, 1997) สำหรับในประเทศไทยพบการกระจายพันธุ์เกือบทุกภาคของประเทศไทย (Gardner *et al.*, 2000) ไม้สะเดานอกจากจะใช้เป็นอาหารแล้วยังเป็นพืชที่มีคุณประโยชน์ทางด้านกำจัดแมลงศัตรูพืชทดแทนการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายแก่ผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังใช้ผสมกับกากน้ำตาลเป็นอาหารสัตว์ ใช้ทำปุ๋ย เป็นยาฆ่าเชื้อ เป็นต้น จากประโยชน์ที่กล่าวมานั้น ไม้สะเดาจึงเป็นที่รู้จักและศึกษากันอย่างกว้างขวางในด้านการนำไปใช้ประโยชน์ สำหรับการศึกษาลักษณะพันธุกรรมได้มีการศึกษามาบ้างแล้วเช่นการศึกษาของ Deshwal *et al.* (2005) และ Dhillon *et al.* (2007) เป็นต้น ทั้งนี้ Changtragoon *et al.* (1996b) และจันท์เพ็ญ และสุจิตรา (2550) ได้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของไม้สะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica*) โดยใช้ Isoenzyme gene และเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลต์ (SSR markers) ซึ่งมีความแตกต่างชัดเจน อย่างไรก็ตามไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) ได้ถูกจัดให้เป็น variety ของไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *A. indica* var. *siamensis* ซึ่งลักษณะภายนอกไม่ว่าลักษณะใบ ลักษณะเปลือกมีความแตกต่างกันและช่วงเวลาการออกดอกออกผลก็ไม่ตรงกันด้วย (Sombatsiri *et al.*, 1995) การศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมจากยีน matK ที่มีอยู่ในคลอโรพลาสต์จีโนมและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) จากแต่ละแหล่งและจากแต่ละประเทศที่มีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติและที่นำไปปลูกในประเทศต่างๆว่าจะมีความแตกต่างกันและมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Changtragoon *et al.* (1996b) และ จันท์เพ็ญ และสุจิตรา (2550) หรือไม่

วัสดุและวิธีการศึกษาวิจัย

สุจิตรา (2554) ได้เก็บใบอ่อนของไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) จำนวน 24 แหล่งจาก 9 ประเทศต่างๆ แหล่งละ 2 ต้น จากสถานีทดลองปลูกนานาชาติ จ.กาญจนบุรี (ตารางที่ 16.1) นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ประยุกต์จากการสกัดของ Doyle and Doyle (1990) และ Changtragoon *et al.* (1996a) เมื่อได้สารละลายดีเอ็นเอแล้วนำไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพด้วยอะกาโรสเจล โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ยีน *maturaseK (matK)* โดยใช้ไพรเมอร์จาก Cuenoud *et al.* (2002) และ Muellner *et al.* (2003) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดโดยใช้ pGEM-T Easy Vector System I kit (Promega) และถ่ายยีนเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน (host) เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม จากนั้นนำไปตรวจยืนยันชั้นดีเอ็นเอหรือยีนที่อยู่ในพลาสมิดสายผสมเพื่อตรวจสอบว่าโคโลนีที่เลือกมานั้นตรงกับขนาดหรือไม่ และนำโคโลนีที่ได้เลี้ยงในอาหาร LB เพื่อสกัดแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์ เมื่อได้สารละลายพลาสมิดสายผสมที่บริสุทธิ์แล้วนำมาทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) และลำดับนิวคลีโอไทด์จะถูกนำมาตรวจสอบความถูกต้องโดยใช้โปรแกรม Bioedit เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว จึงนำไปจำแนกกลุ่มของไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 ด้วยวิธี Neighbour Joining

ตารางที่ 16.1 ไม้สะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) จากแหล่งและประเทศต่างๆที่ใช้ในการศึกษาโดยเก็บรวบรวมจากสถานีวิจัยปลูกนานาชาติ จ.กาญจนบุรี

ลำดับ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ชื่อของแหล่ง	พิกัด	
				ละติจูด	ลองจิจูด
1	<i>A. indica</i> A.Juss. var. <i>siamensis</i>	สะเดาไทย	Ban Bo, Kalasin, Thailand	16 °17'N	103 ° 35'N
2	<i>A. indica</i> A.Juss. var. <i>siamensis</i>	สะเดาไทย	Ban Nong Hoi, Kanchanaburi, Thailand	14 ° 09'N	99 ° 19'N
3	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Sunyani, Republic of Ghana	04 ° 21'N	02 ° 21'N
4	<i>A. indica</i> A.Juss. var. <i>siamensis</i>	สะเดาไทย	Doi Tao, Chiang Mai, Thailand	17 ° 57'N	98 ° 41'N
5	<i>A. indica</i> A.Juss. var. <i>siamensis</i>	สะเดาไทย	Vientiane, Lao People's Democratic	18 ° 00'N	102 ° 45' N
6	<i>A. indica</i> A.Juss. var. <i>siamensis</i>	สะเดาไทย	Tung Luang, Surat Thani, Thailand	09 ° 09'N	99 ° 07'N
7	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Ramannaguda, Orissa, Republic of India	19 ° 05 'N	83 ° 49'N
8	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Yezin, Republic of the Union of Myanmar	19 ° 51'N	96 ° 16'N
9	<i>A. indica</i> A.Juss. var. <i>siamensis</i>	สะเดาไทย	Ban Nong Rong, Kanchanaburi, Thailand	14 ° 05'N	99 ° 40'N
10	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Myene, Republic of the Union of Myanmar	22 ° 03'N	95 ° 13'N
11	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Sagar, Chantoria Madhya Pradesh, Republic of India	21 ° 51'N	78 ° 45'N
12	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Balharshah, Maharashtra, Republic of India	19 ° 51'N	79 ° 25'N

13	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Ghaati Subramanya, Karnataka, Republic of India	13 ° 22'N	77 ° 34'N
14	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Chitradurga, Karnataka, Republic of India	14 ° 02'N	76 ° 04'N
15	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Mandore, Jodhure, Republic of India	26 ° 18'N	73 ° 01'N
16	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Annur, Tamil Nadu, Republic of India	11 ° 17'N	77 ° 07'N
17	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Allahabad Town, Uttar Pradesh, Republic of India	25 ° 28'N	81 ° 54'N
18	<i>A. indica</i> A.Juss. var. <i>siamensis</i>	สะเดาไทย	Khao Laung, Nakhon Sawan, Thailand	15 ° 32'N	99 ° 57'N
19	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Lamahi, Federal Democratic Republic of Nepal	27 ° 52'N	82 ° 31'N
20	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Geta, Federal Democratic Republic of Nepal	28 ° 46'N	80 ° 34'N
21	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Tibbi Laran, Rahimyar Khan, Islamic Republic of Pakistan	28 ° 24'N	70 ° 18'N
22	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Multan, Cantonment Area, Islamic Republic of Pakistan	30 ° 11'N	71 ° 29'N
23	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Kuliyapitiya, Democratic Socialist Republic of Sri Lanka	07 ° 08'N	80 ° 00'N
24	<i>A. indica</i> A.Juss.	สะเดาอินเดีย	Bandia, Replublic of Senegal	14 ° 30'N	17 ° 02'N

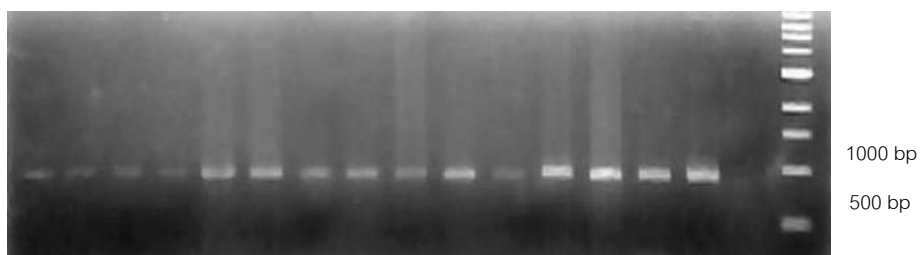
ที่มา: สุจิตรา, 2554

ผลการศึกษาวิจัย

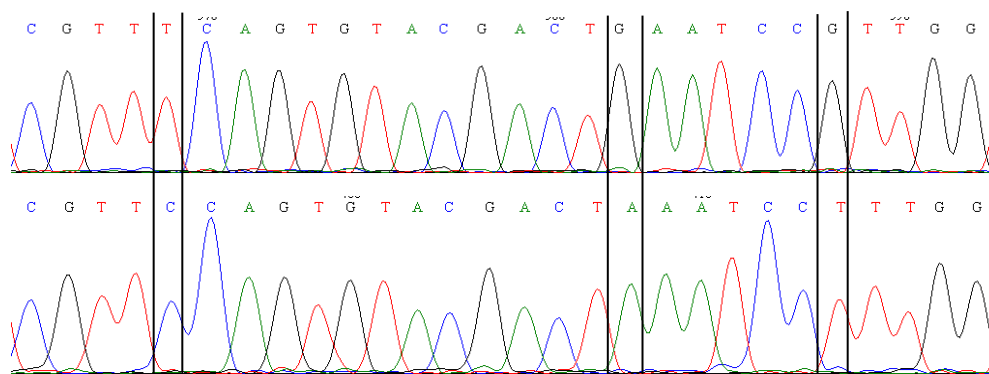
จากการเพิ่มปริมาณซีเอ็นดีเอ็นเอด้วยยีน matK ของไม้สะเดาจากแหล่งต่างๆพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณซีเอ็นดีเอ็นเอได้ทุกแหล่ง ซีเอ็นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 930 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาดของซีเอ็นดีเอ็นเอเป้าหมาย (ภาพที่ 16.1) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน matK ในไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) (ภาพที่ 16.2) ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) ที่ศึกษาทั้งหมดพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 10 ตำแหน่งที่มีความผันแปร (variable nucleotide site) ที่จำเพาะกับกลุ่มไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) (ตารางที่ 16.2)

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้สะเดาในแหล่งต่างๆซึ่งวิเคราะห์ออกมาเป็น phylogenetic tree โดยวิธี Neighbour Joining นั้น สุจิตรา (2554) พบว่าไม้สะเดาจากแหล่งต่างๆ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (ภาพที่ 16.3) กล่าวคือกลุ่มที่ 1 เป็นไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) ประกอบด้วย 7

ประเทศ คือ (1) ประเทศอินเดีย 8 แหล่ง ได้แก่ เมือง Tamil Nadu, Karnataka (Ghaati Subramanyu), Orissa, Chantoria Madhya Pradesh, Maharashtra, Karnataka (Chitradurga), Jodhure และ Uttar Pradesh (2) ประเทศเมียนมาร์ 2 แหล่ง ได้แก่ เมือง Myene และ Yezin (3) ประเทศปากีสถาน 2 แหล่ง ได้แก่ เมือง Cantonment Area และ Rahimyar Khan (4) ประเทศศรีลังกา 1 แหล่ง ได้แก่ เมือง Kuliapitiya (5) ประเทศเซเนกัล 1 แหล่ง ได้แก่ เมือง Bandia (6) ประเทศกานา 1 แหล่ง ได้แก่ เมือง Sunyani (7) ประเทศเนปาล 2 แหล่ง ได้แก่ เมือง Lamahi และ Geta กลุ่มที่ 2 เป็นไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) ประกอบด้วย 2 ประเทศ คือ (1) ประเทศไทย 6 แหล่ง ได้แก่ บ้านหนองหอย และบ้านหนองโรง จ.กาญจนบุรี พังหลวง จ.สุราษฎร์ธานี บ้านบ่อ จ.กาฬสินธุ์ ดอยเต่า จ.เชียงใหม่ และเขาหลวง จ.นครสวรรค์ (2) สปป.ลาว 1 แหล่ง ได้แก่ เมืองเวียงจันทน์ จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถจำแนกไม้สะเดาออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Changtragoon *et al.* (1996a) ในการจำแนกไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) ไม้สะเดาเทียม (*A. excelca*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) โดยใช้ Isoenzyme genes และจันทรเพ็ญ และสุจิตรา (2550) ในการจำแนกไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) กับไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (SSR markers) ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 16.4 และภาพที่ 16.5) และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Singh *et al.* (2002) ที่ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) โดยการใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP markers) และเครื่องหมายเอสเอเอ็มพีแอล (SAMPL markers) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) ควรจะยกระดับจากระดับพันธุ์ (variety) ขึ้นเป็นระดับชนิด (species) อย่างไรก็ตามควรปรึกษากับผู้เชี่ยวชาญพฤกษศาสตร์ที่มีความรู้ความชำนาญในการจำแนกไม้วงศ์ Meliaceae ถึงข้อสรุปในการปรับสถานภาพของไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) อย่างไรก็ตามการที่สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจนจากสะเดาประเทศอินเดีย (*A. indica*) จึงควรให้ความสำคัญต่อการบริหารจัดการดูแลแหล่งพันธุกรรมของไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) ทั้งในถิ่นและนอกถิ่นกำเนิดเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในอนาคต



ภาพที่ 16.1 แสดงการตรวจวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 930 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จากยีน matK (ที่มา: สัจจิรา, 2554)

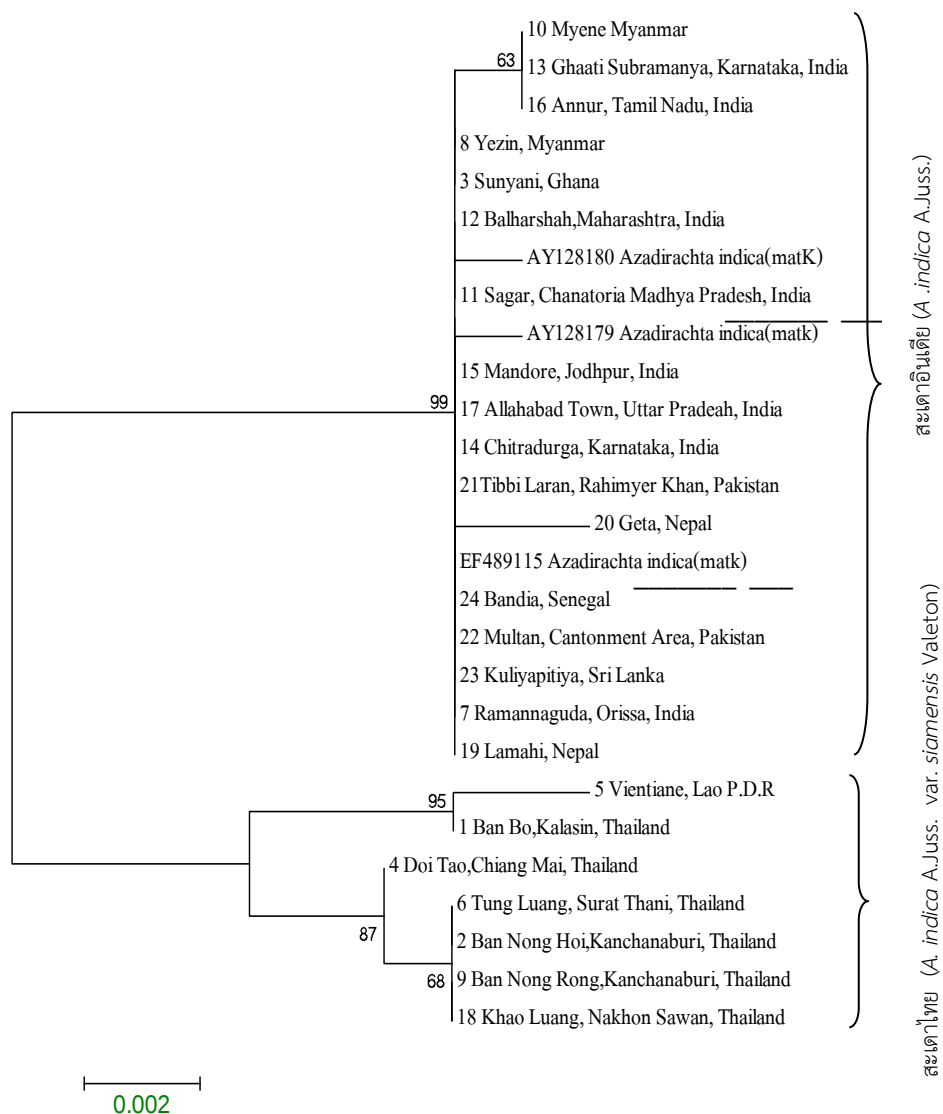


ภาพที่ 16.2 รูปแบบ electrophoregram บางตำแหน่งที่เป็น single nucleotide polymorphism ของไม้สะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) (ที่มา: สัจจิรา, 2554)

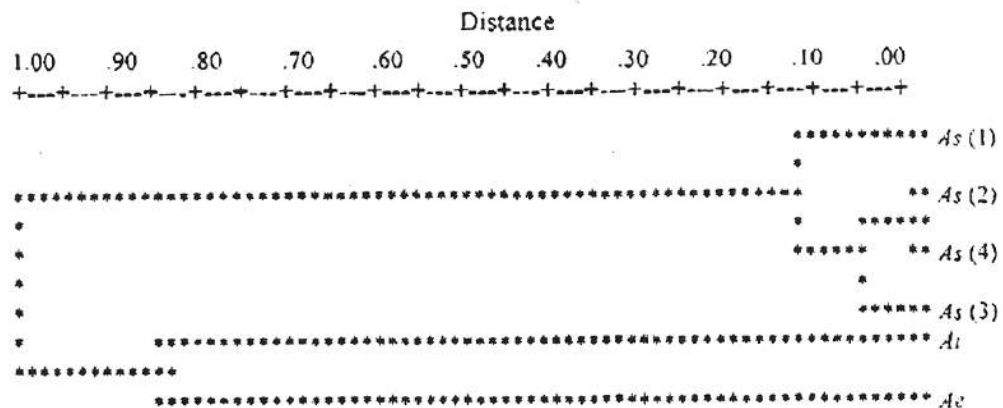
ตารางที่ 16.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 10 ตำแหน่งที่มีความผันแปรในยีน matK ที่มีขนาด 930 คู่เบส โดยมีความจำเพาะกับไม้สะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*)

ชื่อสามัญ	ชื่อแหล่ง	ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปร
Indian neem	EF489115 <i>A.indica</i> *	T A A T C T T G T T C G G C C G T G G A A T C
Indian neem	AY128180 <i>A.indica</i> *	 G
Indian neem	AY128179 <i>A.indica</i> *	 C
Thai neem	18Khao Luang,Thai	C C . G A C . T C . A A T . . . C A T
Thai neem	6Tung Luang,Thai	C C . G A C . T C . A A T . . . C A T
Thai neem	2Ban NongHoi,Thai	C C . G A C . T C . A A T . . . C A T
Thai neem	9Ban NongRong,Thai	C C . G A C . T C . A A T . . . C A T
Thai neem	4Doi Tao,Thai	C C . G A C . T C . A A C A T
Thai neem	1Ban Bo,Thai	C C . . . C . T C . A A . A . . C A T C C . .
Thai neem	5Vientiane,Lao	C C . . . C . T C . A A . A A C A T C C . .
Indian neem	8Yezin,Myanmar	
Indian neem	11 Sagar,India	
Indian neem	7 Ramannaguda,India	
Indian neem	12 Balharshah,India	
Indian neem	14 Chitradurga,Indi	
Indian neem	17 AllahabadTown,In	
Indian neem	15 Mandore,India	
Indian neem	24 Bandia,Senegal	
Indian neem	23 Kuliyaipitiya,Sri	
Indian neem	21 Tibbi Laran,Paki	
Indian neem	22 Multan,Pakistan	
Indian neem	3 Sunyani,Ghana	
Indian neem	19 Lamahi,Nepal	
Indian neem	16 Annur,India	. . C
Indian neem	13 Ghaati,India	. . C
Indian neem	10 Myene,Myanmar	. . C
Indian neem	20 Geta,Nepal	 C C .

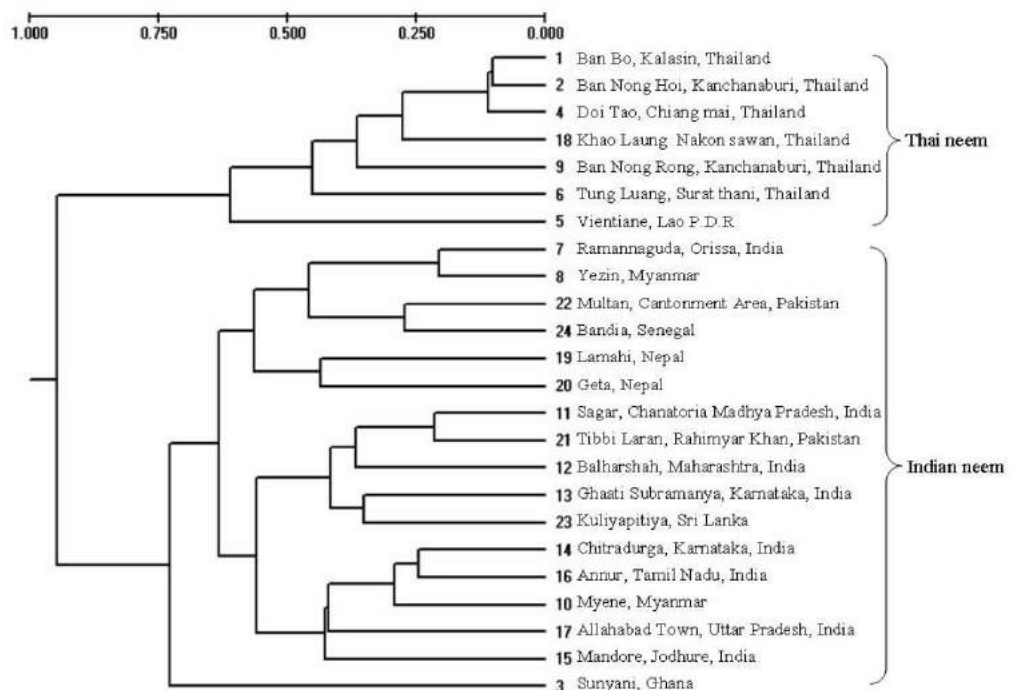
ที่มา: สุจิตรา, 2554



ภาพที่ 16.3 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้สะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) ในแหล่งต่างๆ โดยยีน Maturase K ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining แบบ Bootstrap โดยโปรแกรม MEGA4 (ที่มา: สุจิตรา, 2554)



ภาพที่ 16.4 การจัดกลุ่มไม้สะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) ไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) และ ไม้สะเดาช้างด้วย UPGMA แบบ unbiased genetic distance ด้วย Isoenzyme gene (Changtragoon *et al.*, 1996b) หมายถึง: As (1)-(4) แทนไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) Ai แทนไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) และ Ae แทนไม้สะเดาช้าง



ภาพที่ 16.5 การจำแนกไม้สะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) 24 แหล่งจากการวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์ (จันทร์เพ็ญ และ สุจิตรา, 2550)

สรุปผลการศึกษาวิจัย

จากผลการศึกษาในการถอดรหัสพันธุกรรมด้วยยีน matK ขนาด 930 คู่เบสในไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) จาก 24 แหล่งใน 9 ประชากรพบว่าสามารถแยกกลุ่มของไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) และไม้สะเดาอินเดีย (*A. indica*) ได้อย่างชัดเจน โดยมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ 10 ตำแหน่งและมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่แบ่งออกกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจนโดยสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะนำไปช่วยสนับสนุนการจัดจำแนกไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) ให้เป็นอีกชนิดหนึ่งโดยใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Azadirachta siamensis* แทน *A. indica* var. *siamensis* นอกจากนี้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับด้านป่าไม้ทั้งกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชและกรมป่าไม้ควรให้ความสำคัญในการดูแลรักษาแหล่งทรัพยากรพันธุกรรมของไม้สะเดาไทย (*A. indica* var. *siamensis*) ทั้งในและนอกถิ่นกำเนิดไว้อย่างยั่งยืนเพื่ออนุรักษ์การใช้ประโยชน์และวิจัยศึกษาพัฒนาขยายผลต่อยอด (สุจิตรา, 2554)

บทที่ 17

การพิสูจน์ไม้โกงกาง (*Rhizophora* spp.) ว่าเป็นไม้โกงกางลูกผสมหรือไม่ โดยใช้การถอดรหัสพันธุกรรมในนิวเคลียส และคลอโรพลาสต์ยีน

คำนำ

ไม้โกงกาง (*Rhizophora* spp.) มีอยู่ประมาณ 73 ชนิดและมีไม้โกงกางลูกผสมที่มีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วโลก (Spalding *et al.*, 2010) ประเทศไทยมีไม้โกงกางอยู่ 34 ชนิด (สำนักอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2555) ลูกผสมตามธรรมชาติในพืชเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติ โดยมีการรายงานว่าต้นที่คาดว่าจะปลูกลูกผสมของสกุลไม้โกงกาง (*Rhizophora*) ลำแพน (*Sonneratia*) สกุลฝาด (*Lumnitzera*) สกุลพังกา (*Bruguiera*) (Tomlinson, 1986; Duke and Ge, 2011) ในการวินิจฉัยไม้โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) ไม้โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) และไม้โกงกางสไตโลซา (*Rhizophora stylosa*) ในประเทศมาเลเซียนั้น Ng *et al.* (2013) และ Ng *et al.* (2015) ได้ใช้ single nucleotide polymorphisms (SNPs) จากนิวเคลียสจีโนมศึกษา

ด้วยอุทยานสิ่งแวดล้อมนานาชาติสิรินธร (อนส.) อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี ได้ขอความอนุเคราะห์จากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ให้ผู้เชี่ยวชาญศึกษาวิเคราะห์ทางพันธุกรรมไม้โกงกางที่คาดว่าจะปลูกลูกผสมระหว่างโกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) และโกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในบริเวณอุทยานสิ่งแวดล้อมนานาชาติสิรินธรว่าเป็นไม้โกงกางลูกผสมจริงหรือไม่

วัสดุและวิธีการศึกษาวิจัย

Changtragoon *et al.* (2016) ได้ทำการเก็บตัวอย่างโกงกางใบใหญ่เล็ก (*Rhizophora apiculata*) โกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) และโกงกางลูกผสม (ภาพที่ 17.1) มาสกัด DNA ด้วยชุดสกัด DNeasy Plant Kit (QIAGEN) แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนในส่วนของนิวเคลียส (Nucleus) 3 ยีน คือ DLDH ขนาด 1088 bp SBE2 ขนาด 709 bp และ FMRm11 ขนาด 540 bp และยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม คือ atpB-rbcL ขนาด 712 bp (ตารางที่ 17.1) แล้วจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษา จากหลักการของวิธี Chain termination method ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) โดยทำพีซีอาร์ซึ่งจะติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชแต่ละชนิด
โดยผ่านโปรแกรม Bioedit, DnaSP4.0 และ Mega 3.1



โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*)



โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*)



โกงกางลูกผสม (Putative hybrid)



โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*)
โกงกางลูกผสม และ โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*)

ภาพที่ 17.1 ตัวอย่างใบโกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) และ โกงกางลูกผสม (Putative hybrid) (ที่มา: Changtragoon et al., 2016)

ตารางที่ 17.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ศึกษา	ไพรเมอร์ (5'-3')	แหล่งที่มา
cpDNA region		
atpB-rbcL spacer	F: GAAATGGAAGTTAGCACTCG R: AAGATTCAGCAGCTACCGCA	Inomata <i>et al.</i> (2009) Ng <i>et al.</i> (2015)
nDNA region		
DLDH	F: TGGATGGTCATATAGCTCT R: GAACAAGCTCCCCTGCATTAG	Inomata <i>et al.</i> (2009) Ng <i>et al.</i> (2015)
SBE2	F: CAAAGTTTGTGAGTCTTATC R: GTCCTGACATTAAACAGCC	Inomata <i>et al.</i> (2009) Ng <i>et al.</i> (2015)
FMRrm11	F: TTTCTATTTATGATCCCATCATCTC R: GCGTTTAACTGCCACAATTC	Cerón-Souza <i>et al.</i> (2010) Ng <i>et al.</i> (2015)

ที่มา: Changtragoon *et al.*, 2016

ผลการศึกษาวิจัย

1. การพิสูจน์ว่าไมโทคอนดรียาลูกผสมว่าเป็นลูกผสมจริงหรือไม่

การพิสูจน์ไมโทคอนดรียาลูกผสมว่าเกิดจากการผสมของไมโทคอนดรียาใบเล็ก (*R. apiculata*) กับไมโทคอนดรียาใบใหญ่ (*R. mucronata*) หรือไม่นั้นพิสูจน์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมโดยยีนในนิวเคลียส 3 ยีน ไมโทคอนดรียาทั้ง 3 คือ DLDH ขนาด 1088 bp SBE2 ขนาด 708 bp และ FMRrm11 ขนาด 540 ผลการศึกษาพบว่าไมโทคอนดรียาลูกผสมดังกล่าวมียีนที่จำเพาะของทั้งไมโทคอนดรียาใบเล็ก (*R. apiculata*) และไมโทคอนดรียาใบใหญ่ (*R. mucronata*) จึงสรุปได้ว่าไมโทคอนดรียาลูกผสมเป็นลูกผสมระหว่างไมโทคอนดรียาใบเล็ก (*R. apiculata*) และไมโทคอนดรียาใบใหญ่ (*R. mucronata*) จริง (ภาพที่ 17.2)

2. การพิสูจน์ว่าไมโทคอนดรียาใบเล็ก (*R. apiculata*) หรือไมโทคอนดรียาใบใหญ่เป็นต้นแม่ของไมโทคอนดรียาลูกผสมดังกล่าว

การพิสูจน์ต้นแม่โดยการถอดรหัสพันธุกรรมในคลอโรพลาสต์ยีนในไมโทคอนดรียาลูกผสมดังกล่าว โดยเปรียบเทียบระหว่างไมโทคอนดรียาใบเล็ก (*R. apiculata*) และไมโทคอนดรียาใบใหญ่ (*R. mucronata*) พบว่าไมโทคอนดรียาใบใหญ่ (*R. mucronata*) เป็นต้นแม่และยีนที่จำเพาะถูกถ่ายทอดโดยไมโทคอนดรียาใบใหญ่ (*R. mucronata*) (ภาพที่ 17.3)

ชนิดพันธุ์ที่ศึกษา	ตำแหน่งคลอโรพลาสต์เอ็นเอที่ศึกษา																																				
	DLDH(1088 bp)								SBE2(708 bp)												FMRrm11 (540)																
	0	0	1	4	5	6	6	7	7	1	1	2	2	2	2	3	461	4	5	7	0	1	1	2	3	3	4	4	0	4	0	7	7	9	5	8	
	0	4	1	0	1	4	4	0	2	0	4	3	7	9	9	5		9	7	0	6	1	4	4	0	0	9	9	2	0	5	6	3	8	9	5	0
	2	0	5	6	3	8	9	5	0	5	0	7	2	1	2	9		0	1	8	0	4	0	7	7	9	5	8									
<i>R.apiculata</i>	G	G	A	G	C	C	A	T	C	A	C	G	T	A	G	C	A	G	A	T	A	A	A	G	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
<i>R.mucronata</i>	T	A	G	A	T	T	G	C	G	T	G	T	A	-	-	T	G	-	G	C	T	G	G	C	G	A	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
Putative hybrid	T	G	G	G	T	C	A	T	G	T	C	G	A	-	-	T	G	G	T	T	A	G	C	A	A	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	

ภาพที่ 17.2 ความแตกต่างของลำดับนิวคลีอัสที่จำเพาะกับไม้โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) ไม้โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) และไม้โกงกางที่คาดว่าเป็นลูกผสม (Putative hybrid) ที่ นิวคลีอัส 3 ตำแหน่ง (DLDH SBE2 และ FMRrm11) (ที่มา: Changtragoon *et al.*, 2016)

ชนิดพันธุ์ที่ศึกษา	ตำแหน่งคลอโรพลาสต์เอ็นเอที่ศึกษา																																	
	atpB-rbcL(713 bp)																																	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	5	5	5	5	
	1	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	9	9	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	7	7	7
	9	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	3	3	3	3	
<i>R.apiculata</i>	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	C	A	A	A	A	A	A	A	G	T	T	A	A	G	G	G	G	
<i>R.mucronata</i>	C	C	A	T	T	T	G	T	C	T	A	T	C	A	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	T	T
Putative hybrid	C	C	A	T	T	T	G	T	C	T	A	T	C	A	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	T	T

ภาพที่ 17.3 ความแตกต่างของลำดับนิวคลีอัสที่จำเพาะกับไม้โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) ไม้โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) และไม้โกงกางที่คาดว่าเป็นลูกผสม (Putative hybrid) ใน ตำแหน่งคลอโรพลาสต์ (atpB-rbcL intergenic spacer) (ที่มา: Changtragoon *et al.*, 2016)

สรุปผลการศึกษาวิจัย

1. การพิสูจน์ไม้โกงกางว่าเป็นลูกผสมหรือไม่และเกิดจากการผสมของไม้โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) กับไม้โกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) หรือไม่นั้นพิสูจน์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมโดยยีน ในนิวคลีอัส 3 ยีน พบว่าไม้โกงกางลูกผสมดังกล่าวมียีนที่จำเพาะของทั้งไม้โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) และไม้โกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) จึงสรุปได้ว่าไม้โกงกางลูกผสมเป็นลูกผสมระหว่างไม้โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) และไม้โกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) จริง

2. การพิสูจน์ว่าไม้โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) หรือใบใหญ่เป็นต้นแม่ของไม้โกงกางลูกผสมดังกล่าว การพิสูจน์ต้นแม่โดยการการถอดรหัสพันธุกรรมในคลอโรพลาสต์ยีนในไม้โกงกางลูกผสมดังกล่าว โดยเปรียบเทียบระหว่างไม้โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) และไม้โกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) พบว่าไม้โกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) เป็นต้นแม่และยีนที่จำเพาะถูกถ่ายทอดโดยไม้โกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*)

3. การพิสูจน์ถึงสถานภาพที่จริงว่าไม้โกงกางดังกล่าวเป็นลูกผสมจริง สามารถกระตุ้นให้นักวิชาการที่อุทยานสิ่งแวดล้อมนานาชาติสิรินธรขยายผลต่อยอดต่อการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในอนาคต เพื่อใช้ในการฟื้นฟูป่าได้เนื่องจากไม้โกงกางลูกผสมดังกล่าวมีลักษณะการเจริญเติบโตและรากค้ำยันที่ใหญ่ ใบใหญ่อย่างชัดเจน แข็งแรงกว่าไม้โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) และโกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) ผลการศึกษานี้อุทยานสิ่งแวดล้อมนานาชาติสิรินธรได้มีการขยายผลในการติดป้ายให้ความรู้แก่ผู้รับบริการฝึกอบรม ผู้ร่วมประชุมสัมมนานานาชาติ และนักท่องเที่ยวที่มาเยี่ยมชมป่าชายเลนที่อุทยานสิ่งแวดล้อมนานาชาติ สิรินธร ได้รับทราบข้อมูลทางวิชาการในการตรวจพิสูจน์ว่าเป็นลูกผสมจริง โดยใช้ดีเอ็นเอ เทคโนโลยีจากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ทำให้สร้างภาพลักษณ์อันดีด้านวิชาการทางด้านการพันธุกรรมไม้ป่าของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช และความร่วมมือทางวิชาการของทั้งสองหน่วยงาน (Changtragoon *et al.*, 2016)

บทที่ 18

คดีนิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 1: การพิสูจน์ว่าไม้ซี้เลื่อยของกลาง และไม้ของกลางในที่เกิดเหตุเป็นชนิดเดียวกัน และเป็นไม้หวงห้ามหรือไม่

คำนำ

ตามที่ได้รับหนังสือจากสำนักป้องกันปราบปราม และควบคุมไฟป่า ส่วนยุทธการด้านป้องกันและปราบปรามที่ ทส 0904.3/3263 ลงวันที่ 28 กันยายน 2553 เรื่องการตรวจพิสูจน์เนื้อไม้จากตัวอย่างของกลางเนื้อไม้และซี้เลื่อยจำนวน 4 ตัวอย่าง ดังนี้ ตัวอย่างที่ 1 คือ ตัวอย่างเนื้อไม้ตรวจเก็บจากจุดกองไม้ในป่า ตัวอย่างที่ 2 คือ ตัวอย่างซี้เลื่อยตรวจเก็บจากจุดกองไม้ในป่า ตัวอย่างที่ 3 คือ ตัวอย่างซี้เลื่อยตรวจเก็บจากพื้นดินข้างขนาบที่พิกัดผู้ต้องหา และตัวอย่างที่ 4 คือ ตัวอย่างซี้เลื่อยตรวจเก็บจากเลื่อยโซยนต์ของกลางในขนาบที่พิกัดผู้ต้องหาจากสถานที่เกิดเหตุคดีกระทำความผิดเกี่ยวกับการป่าไม้ในเขตอุทยานแห่งชาติเขาสก ตำบลพะแสง อำเภอบ้านตาขุน จังหวัด สุราษฎร์ธานี โดยสำนักบริหารพื้นที่อนุรักษ์ 4 (สุราษฎร์ธานี) ส่วนอนุรักษ์และป้องกันทรัพยากร เพื่อต้องการพิสูจน์ว่า วัตถุของกลางเป็นไม้ชนิดเดียวกันหรือไม่ และวัตถุของกลางเป็นไม้ชนิดใด จึงได้ทำการส่งตัวอย่างมาให้สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช เพื่อตรวจหารหัสพันธุกรรมนั้น ในการนี้สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืชได้มอบหมายให้ผู้เขียนทำการศึกษาวินิจฉัยพันธุกรรมของตัวอย่างดังกล่าว

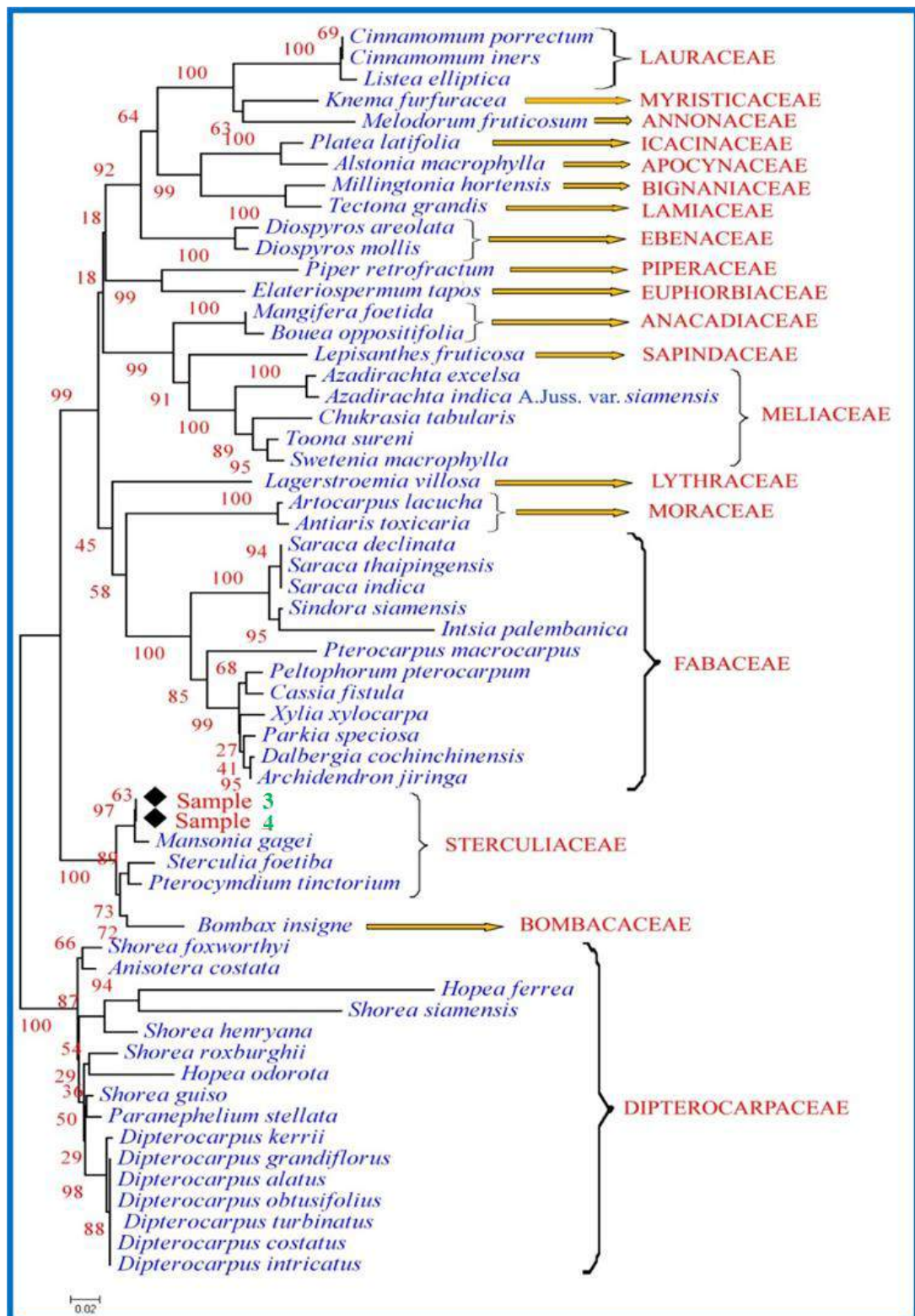
วิธีการวินิจฉัยพันธุกรรม

ได้มีสกัด DNA จากตัวอย่างเนื้อไม้ 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 1) และซี้เลื่อย 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 2 3 และ 4) ด้วยชุดสกัด DNeasy Plant Kit (QIAGEN) แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ ซึ่งเป็นยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม คือ psbA-trnH ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษา จากหลักการของวิธี Chain termination method ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) โดยทำพีซีอาร์ซึ่งจะติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไป ทำไบรสุทธี และนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้ทำการศึกษาไว้และกับฐานข้อมูล gene bank ของโลกที่มีอยู่ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

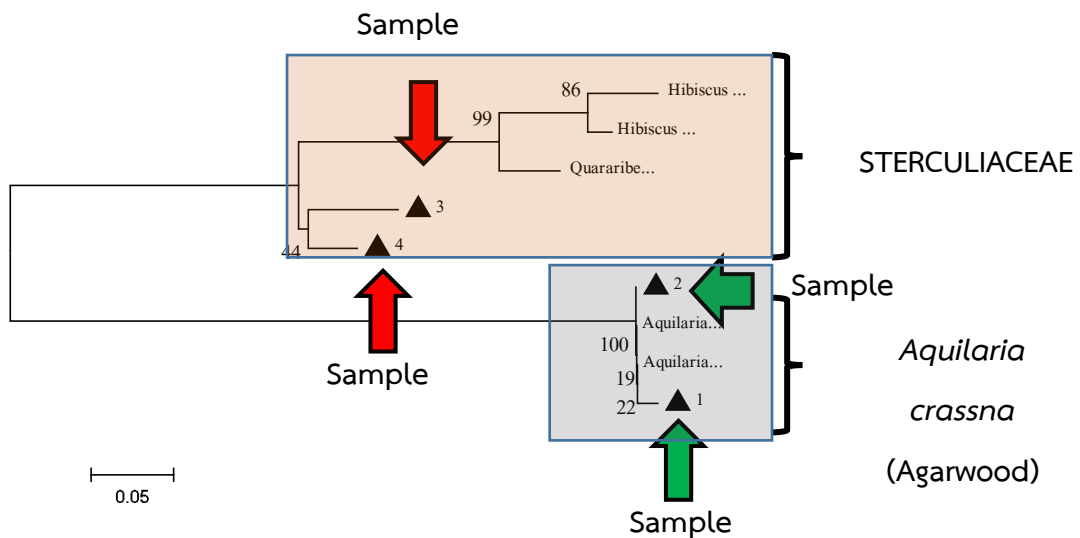
ผลการวินิจฉัยพันธุ์กรรม

การศึกษาวิจัยตัวอย่างเนื้อไม้ 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 1) และชิ้นเนื้อของกลางจำนวน 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 2 3 และ 4) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งของดีเอ็นเอและยีนส่วนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ คือ *Maturase K* ยีน และ *trnH-psbA* spacer region ผลการศึกษาในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ใน *Maturase K* ยีน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียงตัวอย่างที่ 3 และ 4 แล้ววิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ กับฐานข้อมูล DNA barcode ของไม้ป่าในประเทศไทยที่ได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้ พบว่าตัวอย่างที่ 3 และ 4 เป็นไม้ชนิดเดียวกันและมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับไม้ในวงศ์ปอ (STERCULIACEAE) (ภาพที่ 18.1)

ผลการศึกษาวิจัยในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ใน *trnH-psbA* spacer region ของกลางทั้งหมด 4 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างที่ 1 และ 2 เป็นไม้ชนิดเดียวกันและมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับไม้กฤษณา ส่วน ตัวอย่างที่ 3 และ 4 เป็นไม้ชนิดเดียวกันและมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับไม้ในวงศ์ปอ (STERCULIACEAE) ดังนั้นจึงพบว่าตัวอย่างที่ 1 และ 2 เป็นไม้คนละชนิดกับตัวอย่างที่ 3 และ 4 (ภาพที่ 18.2) (สุจิตรา, 2560)



ภาพที่ 18.1 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากตัวอย่างเชื้อที่เลี้ยงกับพรรณไม้ที่มีในฐานข้อมูล (genbank) ในยีน Maturase k (Mat K) (ที่มา: สุจิตรา, 2560)



ภาพที่ 18.2 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากตัวอย่างเชื้อเห็ดกับพรรณไม้ที่มีในฐานข้อมูล (genbank) ใน trnH-psbA ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining แบบ Bootstrap โดยโปรแกรม MEGA4 (ที่มา: สุจิตรา, 2560)

สรุปผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

1. การศึกษาวิจัยตัวอย่างเนื้อไม้ 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 1) และเชื้อเห็ด 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 2 3 และ 4) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม คือ psbA-trnH ผลการศึกษาจากตัวอย่างของกลางทั้งหมด 4 ตัวอย่าง สามารถถอดรหัสพันธุกรรมได้ 4 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างที่ 1 และ 2 เป็นไม้ชนิดเดียวกันและมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับไม้กฤษณา ส่วนตัวอย่างที่ 3 และ 4 เป็นไม้ชนิดเดียวกันและมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับไม้ไผ่หวัดคอป ดังนั้นจึงพบว่าตัวอย่างที่ 1 และ 2 เป็นไม้คนละชนิดกับตัวอย่างที่ 3 และ 4
2. ผลการวินิจฉัยพันธุกรรมครั้งนี้ได้จัดส่งรายงานผลเป็นทางการจากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ไปยังสำนักบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 4 (สุราษฎร์ธานี) ตามหนังสือที่ ทส 0907.7/152 ลงวันที่ 26 มกราคม 2554 เพื่อดำเนินการต่อไป (สุจิตรา, 2560)

บทที่ 19

คดีนิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 2: การพิสูจน์ว่าไม้มะม่วง (*Mangifera* sp.) ของกลางมาจากมะม่วงป่าที่เป็นไม้หวงห้ามหรือไม่

คำนำ

ตามที่ได้รับหนังสือจากสำนักป้องกันปราบปราม และควบคุมไฟป่า ส่วนยุทธการด้านป้องกันและปราบปราม ที่ ทส 0904.302/1963 ลงวันที่ 8 กรกฎาคม 2558 เรื่องขอให้ตรวจพิสูจน์ไม้ของกลางจากตัวอย่างไม้ของกลาง 1 ตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 19.1 เพื่อต้องการพิสูจน์ว่า ไม้ของกลางว่าเป็นไม้หวงห้ามตามบัญชีท้ายพระราชกฤษฎีกากำหนดไม้หวงห้าม พ.ศ. 2530 หรือไม่ อุทยานแห่งชาติรามคำแหงได้ตรวจพิสูจน์เบื้องต้น พบว่าเป็นไม้มะม่วง (*Mangifera* sp.) จึงได้จัดส่งตัวอย่างเนื้อไม้มะม่วงของกลาง ใบมะม่วงป่าในอุทยานแห่งชาติรามคำแหงและใบมะม่วงบ้านชนิดละ 1 ตัวอย่าง (มะม่วงน้ำดอกไม้ มะม่วงเขียวเสวย มะม่วงพิมเสน มะม่วงโชคอนันต์ มะม่วงเขียวใหญ่ มะม่วงฟ้าลั่น มะม่วงกะล่อนบ้าน มะม่วงเพชรบ้านลาด มะม่วงแก้ว และมะม่วงกล้วย) มาเพื่อการศึกษาเปรียบเทียบทางพันธุกรรม ดังแสดงในภาพที่ 19.2 ดังนั้นเพื่อความถูกต้อง และชัดเจน อุทยานแห่งชาติรามคำแหง จึงได้ทำการส่งตัวอย่างมาให้กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช เพื่อตรวจหารหัสพันธุกรรม ซึ่งผู้เขียนได้รับมอบหมายตามสายงานในการตรวจวินิจฉัยพันธุกรรมไม้ของกลางดังกล่าว

วิธีการวินิจฉัยพันธุกรรม

ได้มีการสกัด DNA จากตัวอย่างเนื้อไม้และใบไม้ จากตัวอย่างที่ส่งมาดังภาพที่ 19.1 และ 19.2 ด้วยชุดสกัด DNeasy Plant Kit (QIAGEN) แล้วนำ ดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม คือ trnH-psbA (intergenic spacer) ดังภาพที่ 19.3 แล้วจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษา จากหลักการของวิธี Chain termination method ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) โดยทำพีซีอาร์ซึ่งจะติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชแต่ละชนิดโดยผ่านโปรแกรม Bioedit , DnaSP4.0 และ Mega 3.1



ภาพที่ 19.1 ท่อนไม้ของกลางต้องสงสัย



ภาพที่ 19.2 ตัวอย่างใบมะม่วงป่า (*Mangifera* spp.) จากอุทยานแห่งชาติรามคำแหง

ผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

การศึกษาวินิจฉัยตัวอย่างเนื้อไม้มะม่วงของกลาง 1 ตัวอย่าง ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ คือ trnH-psbA spacer region ผลการศึกษาจากตัวอย่างเนื้อไม้มะม่วงของกลาง 1 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับไม้มะม่วงป่าที่อุทยานแห่งชาติรามคำแหง จ.สุโขทัย ส่งมาเปรียบเทียบจำนวน 3 ตัวอย่างและไม้มะม่วงบ้าน ในบริเวณพื้นที่ชาวบ้านที่อยู่ในบริเวณอุทยานแห่งชาติดังกล่าว 10 ตัวอย่างได้แก่ มะม่วงน้ำดอกไม้ มะม่วงเขียวเสวย มะม่วงพิมเสน มะม่วงโชคอนันต์ มะม่วงเขียวใหญ่ มะม่วงฟาลัน มะม่วงกะล่อนบ้าน มะม่วงเพชรบ้านลาด มะม่วงแก้ว และมะม่วงกล้าย พบว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของชิ้นมะม่วงของกลางที่ได้จาก PCR product มีขนาดเท่ากับมะม่วงพันธุ์พื้นเมือง (380 bp.) แต่มีขนาดต่างจากมะม่วงป่า (680 bp.) และพบว่า Variable nucleotide sites ใน non-coding trnH-psbA spacer region ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของชิ้นไม้มะม่วงของกลางเหมือนกับของมะม่วงบ้านและต่างจากมะม่วงป่า นอกจากนี้ตัวอย่างไม้ของกลางมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับมะม่วงบ้านและพบว่า species specific variable nucleotide site ของมะม่วงป่า (*Mangifera* spp.) ในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม คือ trnH-psbA (intergenic spacer) มีทั้งหมด 44 ตำแหน่ง มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบ point mutation ในรูปแบบ transitions คือมีการแทนที่เบส purine ด้วย เบส purine หรือ แทนที่เบส pyrimidine ด้วยเบส pyrimidine เช่น $A \leftrightarrow G$ และ $C \leftrightarrow T$ และมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบ point mutation ในรูปแบบ transversion คือมีการแทนที่เบส purine ด้วย เบส pyrimidine หรือ แทนที่เบส

pyrimidine ด้วยเบส purine เช่น $A \leftrightarrow T$, $C \leftrightarrow G$, $A \leftrightarrow C$ และ $T \leftrightarrow G$ รายละเอียดผลการศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ได้แสดงใน Changtragoon *et al.* (2017)

สรุปผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

1. การศึกษาวิจัยตัวอย่างเนื้อไม้ของกลางต้องสงสัยจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม คือ psbA-trnH พบว่าตัวอย่างเนื้อไม้ของกลางมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับไม้มะม่วงที่เป็นมะม่วงบ้าน

2. ได้จัดส่งรายงานผลการวินิจฉัยพันธุกรรมอย่างเป็นทางการจากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ไปยัง สำนักบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 14 (ตาก) ที่ ทส 0924.5/2232 ลงวันที่ 26 มิถุนายน 2558 เพื่อดำเนินตามขั้นตอนต่อไป

บทที่ 20

คดีนิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 3: การพิสูจน์ตัวอย่างเนื้อไม้ของกลางว่าเป็นไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) หรือไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*) โดยใช้วิธีพิสูจน์ลักษณะทางกายวิภาคภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Stereo Microscope) และถอดรหัสพันธุกรรม

คำนำ

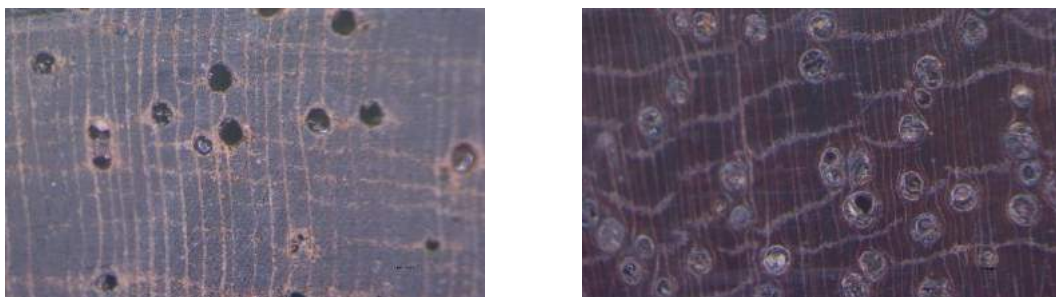
ด้วยสำนักบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 6 (สงขลา) มีหนังสือ ด่วนที่สุด ที่ ทส 0916.303/4961 ลงวันที่ 22 มิถุนายน 2560 รายงานว่า คณะกรรมการตรวจสอบข้อเท็จจริง ตามคำสั่งสำนักบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 6 ที่ 140/2560 ลงวันที่ 5 พฤษภาคม พ.ศ. 2560 ได้ทำการตรวจสอบไม้ของกลางที่เจ้าหน้าที่อุทยานแห่งชาติเขาปู่-เขาย่า ตรวจยึดเมื่อวันที่ 29 พฤษภาคม 2556 คือไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) ท่อน จำนวน 9 ท่อน ปริมาตร 0.58 ลูกบาศก์เมตร คดีอาญาที่ 287/2556 ยึดทรัพย์ที่ 109/2556 ของสถานีตำรวจภูธรนาโยงซึ่งเก็บรักษาไว้ ณ ที่ทำการหน่วยพิทักษ์อุทยานแห่งชาติ ที่ ขป.3 (บ้านน้ำราบ) และคณะกรรมการฯ ได้ลงความเห็นร่วมกันว่าไม้ของกลางดังกล่าวไม่น่าจะเป็นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ตามที่เจ้าหน้าที่ตรวจยึดไว้ แต่น่าจะเป็นชนิดไม้นากบุด ดังนั้นเพื่อให้เกิดความชัดเจนเกี่ยวกับไม้ของกลางดังกล่าว เห็นควรให้ผู้เชี่ยวชาญทางด้านพิสูจน์เนื้อไม้ของกลางดังกล่าว มาพิสูจน์เนื้อไม้ของกลางว่าเป็นไม้ชนิดใดจะได้แจ้งให้อุทยานเขาปู่-เขาย่า ได้รายงานและดำเนินการต่อไป ซึ่งผู้เขียนได้รับมอบหมายตามสายงานให้ตรวจพิสูจน์ไม้ของกลางดังกล่าว

วิธีการวินิจฉัยพันธุกรรม

เนื่องจากเนื้อไม้ที่ส่งมาวินิจฉัยชนิดพันธุ์มีลักษณะมียางเหนียวในเนื้อไม้ซึ่งยากต่อการสกัดดีเอ็นเอจึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของไม้ร่วมด้วยดังนี้

1. วิเคราะห์ลักษณะทางกายวิภาคของไม้ standard โดยเปรียบเทียบและอ้างอิงจาก อุทาร์ตัน และ คณะ (2559) ได้แก่ ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis* Pierre) และไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea* Linn.) ภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Stereo Microscope) ขนาด 500 μm พบว่า ลักษณะทางกายวิภาคของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) พบว่าพอร์ส่วนมากเป็นพอร์เดี่ยว (solitary pore) พอร์แฝด (multiple pore) มีน้อย แบบของการเรียงตัวไม่เด่นชัด การกระจายเป็นแบบ กระจายกระจาย (diffuse pore) พอร์ใหญ่ทางภายในพอร์มีสารตกค้าง (deposit) เป็นบางพอร์ เส้นเรย์เห็นไม่ค่อยชัด พาเรงคิมาเป็นแบบ พาเรงคิมาแบบปึก (aliform parenchyma) และ พาเรงคิมาแบบปึกต่อ (confluent parenchyma) มีลายริ้ว (ripple mark) ดังภาพที่ 20.1 ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*) พบว่าพอร์ เป็นแบบพอร์เดี่ยว (solitary pore) ส่วนมากพอร์แฝด (multiple pore) มีน้อย การเรียงเป็นแบบพอร์เฉียง (pore oblique) การกระจายเป็นแบบ กระจายกระจาย (diffuse pore) พอร์ใหญ่ทางภายในพอร์มีไทโลส (tylose) เกือบทุกพอร์ และ มีสารตกค้าง

(deposit) เป็นบางพอร์ เส้นเรย์เห็นชัด พาเรงคิมาเป็นแบบพาเรงคิมาไม่ติดพอร์ (metatracheal parenchyma) ดังภาพที่ 20.1



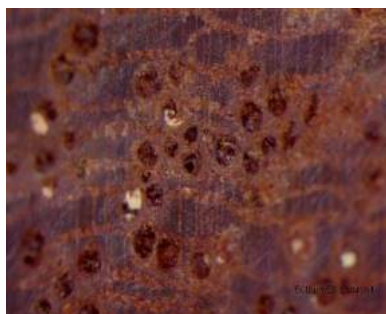
ภาพที่ 20.1 ภาพถ่ายทางกายวิภาคภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Stereo Microscope) กำลังขยาย 500 μm ของไม้ standard ของไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) (ซ้าย) และไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*) (ขวา)

2. ถอดรหัสพันธุกรรมในส่วนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ คือ psbA-trnH spacer region

สกัด DNA จากตัวอย่างเนื้อไม้ด้วยชุดสกัด DNeasy Plant Kit (QIAGEN) แล้วนำ ดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม คือ psbA-trnH (intergenic spacer) แล้วจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษา จากหลักการของวิธี Chain termination method ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) โดยทำพีซีอาร์ซึ่งจะติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ ไปทำให้บริสุทธิ์ และนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชแต่ละชนิดโดยผ่านโปรแกรม Bioedit , DnaSP4.0 และ Mega 3.1

ผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

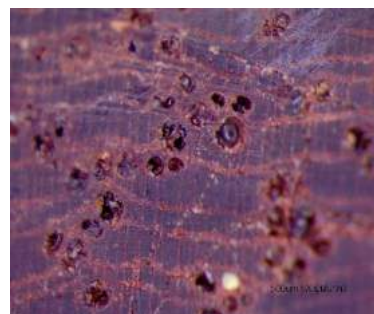
1. ผลการพิสูจน์ตัวอย่างเนื้อไม้ของกลาง 9 ตัวอย่าง โดยการพิสูจน์ลักษณะทางกายวิภาคภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Stereo Microscope) พบว่าลักษณะทางกายวิภาคของไม้ของกลางทั้ง 9 ตัวอย่าง มีลักษณะทางกายภาพตรงกับไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*) คือ พอร์ เป็นแบบ พอร์เดี่ยว (solitary pore) ส่วนมาก พอร์แฝด (multiple pore) มีน้อย การเรียงเป็นแบบ พอร์เฉียง (pore oblique) การกระจายเป็นแบบ กระจัดกระจาย (diffuse pore) พอร์ใหญ่ ทางภายในพอร์มีไทโลส (tylose) เกือบทุกพอร์ และ มีสารตกค้าง (deposit) เป็นบางพอร์ เส้นเรย์เห็นชัด พาเรงคิมาเป็นแบบ พาเรงคิมาไม่ติดพอร์ (metatracheal parenchyma) ดังภาพที่ 20.2



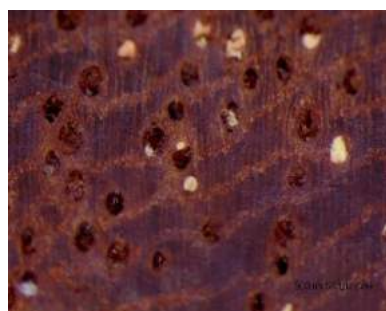
ตัวอย่างที่ 1



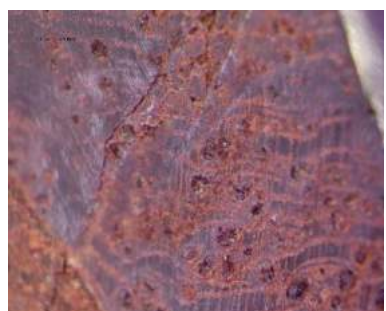
ตัวอย่างที่ 2



ตัวอย่างที่ 3



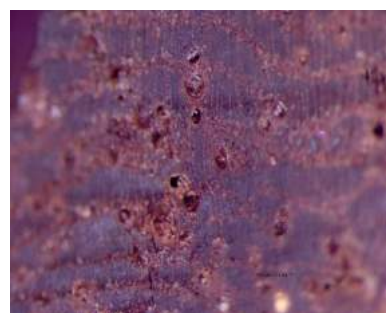
ตัวอย่างที่ 4



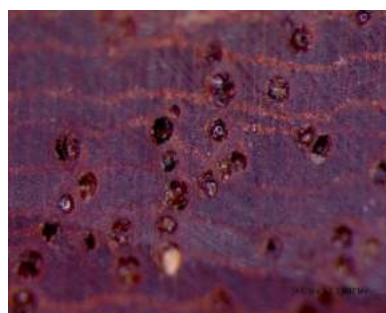
ตัวอย่างที่ 5



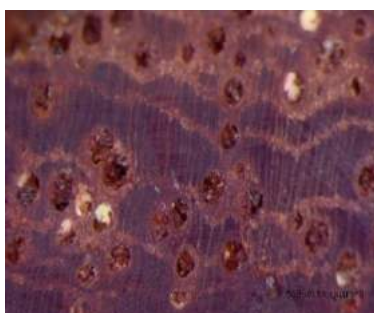
ตัวอย่างที่ 6



ตัวอย่างที่ 7



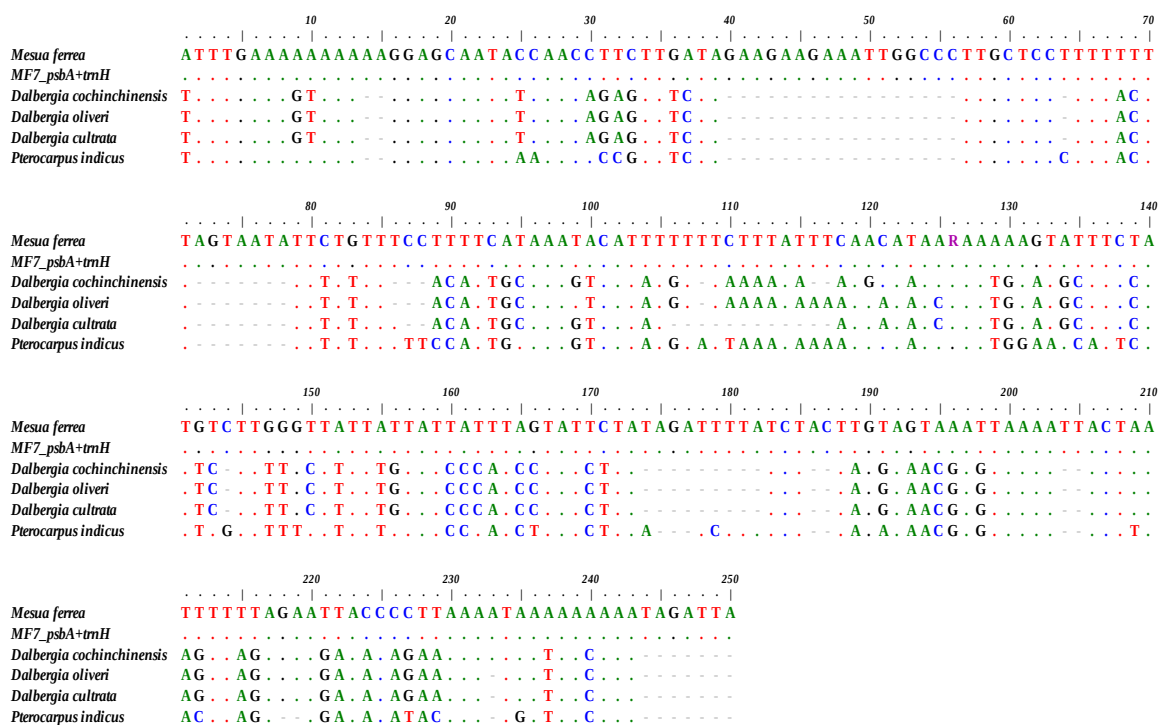
ตัวอย่างที่ 8



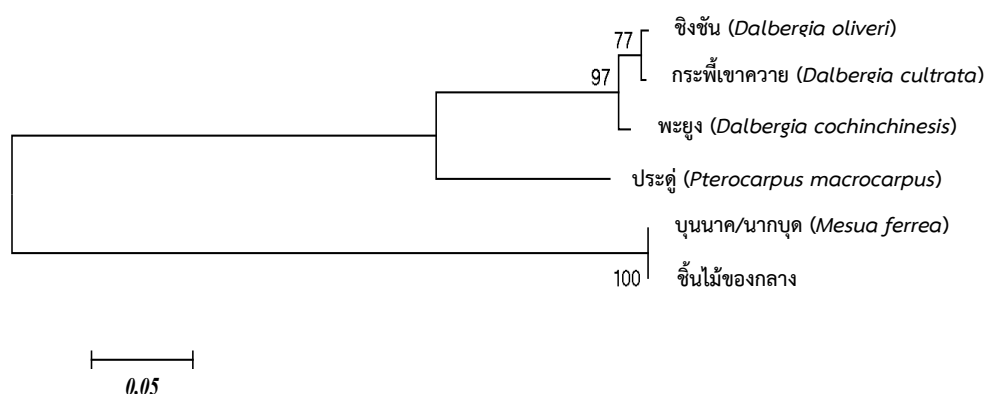
ตัวอย่างที่ 9

ภาพที่ 20.2 ภาพถ่ายทางกายวิภาคภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Stereo Microscope) กำลังขยาย 500 μm ของตัวอย่างไม้ของกลาง 9 ตัวอย่าง

2. ผลการศึกษาวิจัยตัวอย่างเนื้อไม้ของกลาง ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ คือ trnH-psbA spacer region ผลการศึกษาจากตัวอย่างเนื้อไม้ของกลาง 1 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไม้ฐานข้อมูลคือ ไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*) ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) กระพี้เขาควาย พบว่า Variable nucleotide sites ใน non-coding trnH-psbA spacer region ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของชิ้นไม้ของกลางเหมือนกับไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*) (ภาพที่ 20.3) นอกจากนี้ตัวอย่างไม้ของกลางมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตรงกับไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*) (ภาพที่ 20.4)



ภาพที่ 20.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้ป่าโดยแสดงความสัมพันธ์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอบาร์ไคต์ของไม้ของกลาง (MF7) ไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*) กับไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) ไม้ชิงชัน (*D. oliveri*) กระพี้เขาคาย (*D. cultrata*) ไม้ประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus*)



ภาพที่ 20.4 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้ของกลางเทียบกับไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ไม้ประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus*) และไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*) ในส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน trnH กับ psbA ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining แบบ Bootstrap โดยโปรแกรม MEGA4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม้ของกลางมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตรงกับไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*)

สรุปผลการวินิจฉัยพันธุ์กรรม

1. การศึกษาวิจัยตัวอย่างขึ้นไม้จำนวน 9 ตัวอย่าง ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ลักษณะทางกายวิภาคของไม้ standard โดยเปรียบเทียบและอ้างอิงจาก อุทาร์ตัน และ คณะ (2559) ได้แก่ ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) และไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*) ภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Stereo Microscope) ขนาด 500 μm พบว่าเป็นไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*) ไม่ใช่ไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*)
2. จากผลการศึกษาวิจัยตัวอย่างเนื้อไม้ของกลางจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน trnH-psbA spacer region พบว่าดีเอ็นเอของขึ้นไม้ของกลางเหมือนกับไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*)
3. ผลการวินิจฉัยพันธุ์กรรมครั้งนี้ได้จัดส่งรายงานผลเป็นทางการจากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ไปยังสำนักบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 6 (สงขลา) ตามหนังสือที่ ทส 0907.7/2535 ลงวันที่ 18 ตุลาคม 2560 เพื่อดำเนินในส่วนที่เกี่ยวข้องต่อไป

บทที่ 21

คตินิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 4: การพิสูจน์ว่าไม้สัก (*Tectona grandis*) ของกลางที่ถูกจับกุมเป็นไม้สักที่ถูกตัดมาจากสวนป่าหรือไม่

คำนำ

สำนักงานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมจังหวัดพิจิตรเมื่อปี 2557 ได้มีการประสานและขอความอนุเคราะห์มายังกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช พร้อมส่งเนื้อเยื่อไม้สัก จำนวน 6 ชิ้น และเก็บเนื้อเยื่อที่ต่อไม้สักในสวนป่า จำนวน 5 ต่อ มาเพื่อให้ทำการตรวจพิสูจน์ DNA เนื้อเยื่อไม้สัก ในการพัฒนาเทคนิคความสามารถดำเนินการได้หรือไม่ ซึ่งผู้เขียนได้รับมอบหมายตามสายงานให้ตรวจพิสูจน์ไม้ของกลางดังกล่าว

วิธีการวินิจฉัยพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอจากชิ้นไม้สัก (*Tectona grandis*) ของกลางจำนวน 6 ชิ้นและเนื้อไม้จากตอที่ถูกลักลอบตัดจำนวน 5 ต่อ ดังภาพที่ 21.1 ตามวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีการสกัดของ Doyle and Doyle (1990) และ Changtragoon *et al.* (1996a) แล้วนำมาละลายใน 1X TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 50-100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส วัดคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8% และนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb แล้วบันทึกภาพ แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์มาวิเคราะห์โดยเครื่องหมาย ดีเอ็นเอชนิดไมโครแซเทลไลท์ (microsatellite markers) 4 เครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้ Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany) นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรมดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 50 หรือ 55 หรือ 60 องศาเซลเซียส ตามอุณหภูมิของ annealing ของไพรเมอร์ 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 วินาที จำนวน 35 รอบ วิเคราะห์โดยวิธีการดีเอสแอลเอส หลังจากนั้นวิเคราะห์จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (number of allele per locus, N) และวิเคราะห์ลักษณะพันธุกรรมของแต่ละตัวอย่าง การจัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) และ TFPGA version 1.3 (Miller, 1997)



ภาพที่ 21.1 ตัวอย่างชิ้นไม้สัก (*Tectona grandis*) ของกลางที่ทำการศึกษา

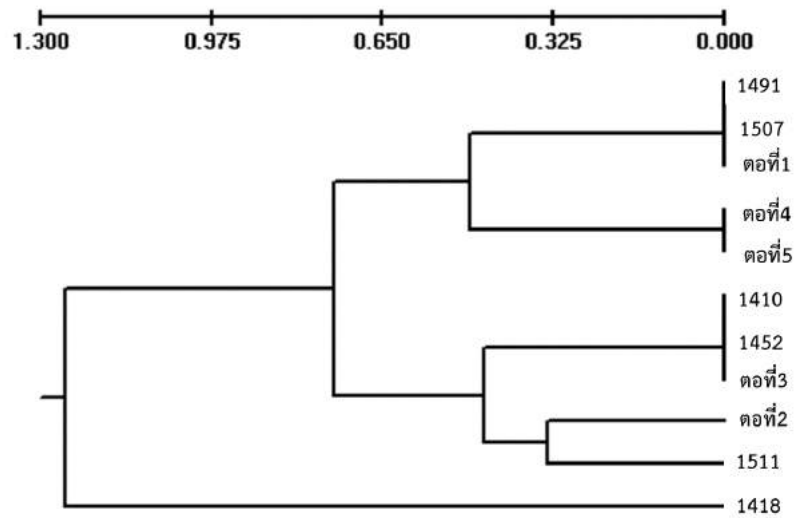
ผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

ผลการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครเซพเทลไลท์ 4 ตำแหน่ง โดยการหาค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมเพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ได้แสดงในตารางที่ 21.1 และภาพที่ 21.2 ตามลำดับ พบว่า

1. ไม้ท่อนหมายเลข 1491 และ 1507 มีความเหมือนทางพันธุกรรมกับต่อที่ 1
2. ไม้ท่อนหมายเลข 1410 และ 1452 มีความเหมือนทางพันธุกรรมกับต่อที่ 3
3. ไม้ท่อนหมายเลข 1511 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับต่อที่ 2
4. ต่อที่ 4 มีความเหมือนทางพันธุกรรมกับต่อที่ 5
5. ไม้ท่อนหมายเลข 1418 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากต่อที่ 1 – 5 และไม้ท่อนที่เหลือ

ตารางที่ 21.1 แสดงค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) ของสัก (*Tectona grandis*) 11 ประชากร

ประชากร	ต่อ1	ต่อ2	ต่อ3	ต่อ4	ต่อ5	1410	1418	1452	1491	1507	1511
ต่อ1	*****										
ต่อ2	0.3365	*****									
ต่อ3	1.0000	0.6931	*****								
ต่อ4	0.4825	0.4825	1.2425	*****							
ต่อ5	0.4825	0.4825	1.2425	0.0000	*****						
1410	0.8473	0.3365	0.0000	0.4825	0.4825	*****					
1418	1.2528	0.5596	0.6931	1.8688	1.8688	1.2528	*****				
1452	0.8473	0.3365	0.0000	0.4825	0.4825	0.0000	1.2528	*****			
1491	0.0000	0.3365	1.0000	0.4825	0.4825	0.8473	1.2528	0.8473	*****		
1507	0.0000	0.3365	1.0000	0.4825	0.4825	0.8473	1.2528	0.8473	0.0000	*****	
1511	0.8473	0.3365	0.6931	0.7702	0.7702	0.3365	1.2528	0.3365	0.8473	0.8473	*****



ภาพที่ 21.2 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้สัก (*Tectona grandis*)

สรุปผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

1. การตรวจพิสูจน์ตรวจพิสูจน์ DNA เนื้อเยื่อไม้สัก โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ 4 เครื่องหมายดีเอ็นเอ พบว่าท่อนไม้ของกลางมีลักษณะทางพันธุกรรมตรงกับต่อไม้สัก (*Tectona grandis*) ในสวนป่า
2. รายงานผลการวินิจฉัยพันธุกรรมได้จัดส่งอย่างเป็นทางการจากกรม อุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ไปยังหน่วยงานที่ร้องขอเพื่อดำเนินตามขั้นตอนต่อไป

บทที่ 22

คดีนิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 5: การวินิจฉัยว่าชิ้นไม้ของกลาง 142 ชิ้น ว่ามาจากต้นใดต้นหนึ่งของไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*) ที่ถูกลักลอบตัดหรือไม่

คำนำ

ตามหนังสือสถานีตำรวจภูธรบ้านแพน จังหวัดชัยภูมิ ที่ ตช.0018(ชย)(16)/1936 ลงวันที่ 21 สิงหาคม 2558 เรื่อง ขอรบผลการตรวจพิสูจน์เปรียบเทียบเนื้อเยื่อชิ้นไม้ของกลาง การพิสูจน์ตัวอย่างชิ้นไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*) ของกลางที่เก็บรวบรวมได้จากบริเวณเถียงนาท้องที่ตำบล สระพัง อำเภอบ้านแพน จังหวัด ชัยภูมิ จำนวน 142 ชิ้น ดังแสดงในภาพ 22.1 โดยการวิเคราะห์ผลทางดีเอ็นเอเปรียบเทียบว่าเศษชิ้นไม้ของกลางดังกล่าวว่า เป็นต้นเดียวกับตอของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ซึ่งถูกลักลอบตัดจากอุทยานแห่งชาติน้ำพอง จ.ขอนแก่น ที่ปรากฏในบริเวณที่เกิดเหตุหรือไม่ ซึ่งผู้เขียนได้รับมอบหมายตามสายงานให้ตรวจพิสูจน์พันธุกรรมไม้ของกลางดังกล่าว

วิธีการวินิจฉัยพันธุกรรม

ได้มีการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*) ของกลางจำนวน 142 ชิ้น (ภาพที่ 22.1) เนื้อไม้จากตอที่ถูกลักลอบตัดจำนวน 3 ตอ และใบของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) จากอุทยานแห่งชาติน้ำพอง จ.ขอนแก่นจำนวน 15 ต้น สกัดดีเอ็นเอใช้ตามวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีการสกัดของ Doyle and Doyle (1990) และ Changtragoon et al. (1996a) แล้วนำมาละลายใน 1X TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 50-100 ไมโครลิตรเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส วัดคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8% และนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb แล้วบันทึกภาพ แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ในชิ้นไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ของกลางเปรียบเทียบกับเนื้อไม้จาก 3 ตอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มาวิเคราะห์โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite markers) 9 เครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้ Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany) นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรมดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 50 หรือ 55 หรือ 60 องศาเซลเซียส ตามอุณหภูมิของ annealing ของไพรเมอร์ 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 วินาที จำนวน 35 รอบ วิเคราะห์โดยวิธีการดีดีเอส ฟลูออเรสเซนซ์ หลังจากนั้นวิเคราะห์จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (number of allele per locus, N) และ

วิเคราะห์ลักษณะพันธุกรรมของแต่ละตัวอย่าง การจัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh et al., 1999) และ TFPGA version 1.3 (Miller, 1997)

ภาพที่ 22.1 ตัวอย่างขึ้นไม้พะยุงที่ใช้ในการพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ



ผลการศึกษาวินิจฉัยพันธุกรรม

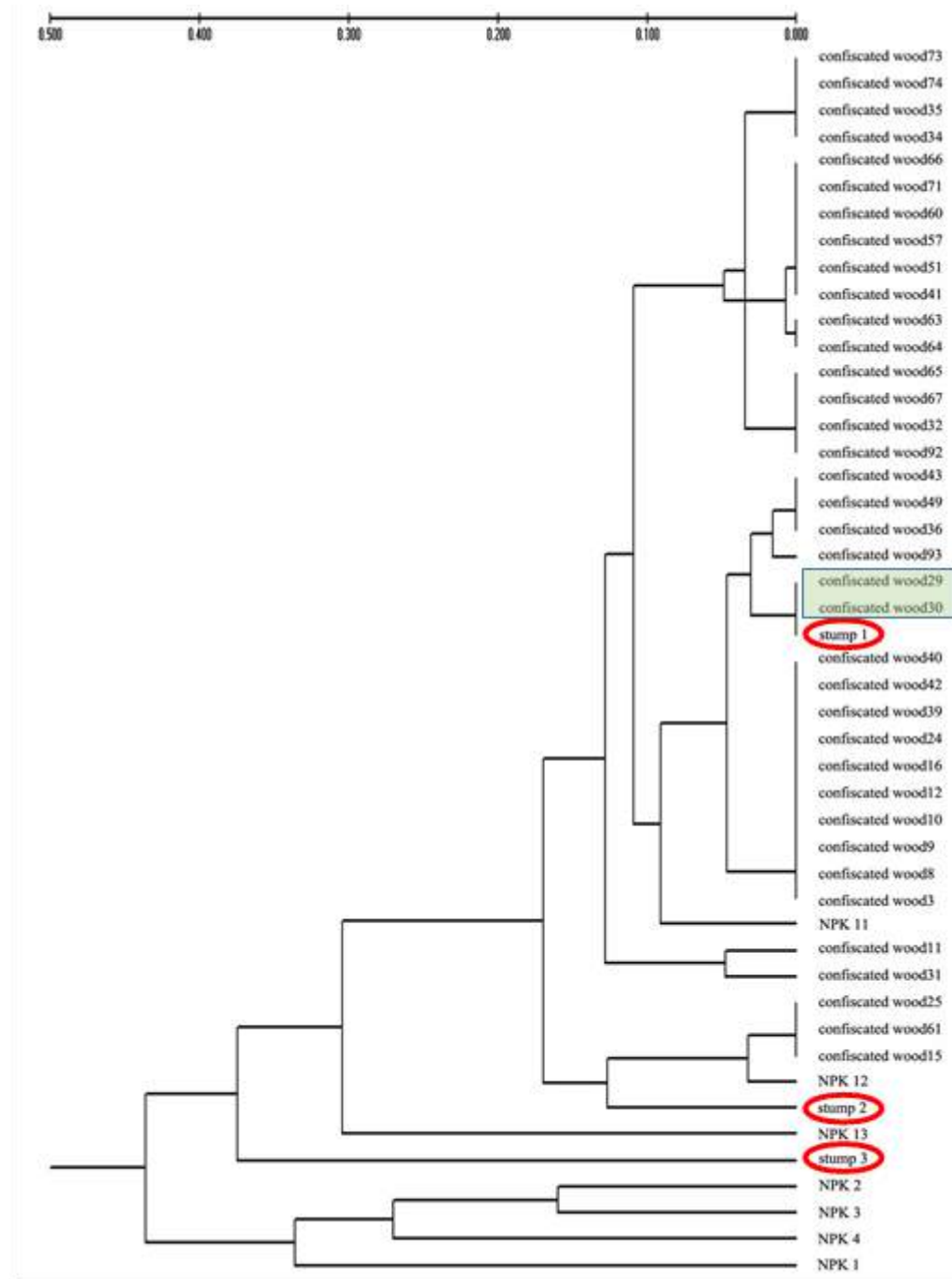
ผลการพิสูจน์ตัวอย่างไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ของกลาง โดยการวิเคราะห์ผลทางดีเอ็นเอ เปรียบเทียบว่าเศษชิ้นไม้ของกลางดังกล่าวว่า เป็นต้นเดียวกับตอที่ปรากฏในบริเวณที่เกิดเหตุหรือไม่

จากการวิเคราะห์ผลทางดีเอ็นเอชิ้นไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ของกลางจำนวน 142 ชิ้น มีตัวอย่างชิ้นไม้ที่สามารถสกัดดีเอ็นเอและทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน 1-9 เครื่องหมายดีเอ็นเอได้มี 64 ตัวอย่าง และเมื่อนำตัวอย่างชิ้นไม้ทั้ง 64 ตัวอย่างมาทำการเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมกับตัวอย่างตอไม้ 3 ตอที่อยู่ในบริเวณที่เกิดเหตุพบว่า

1. จากการศึกษาในเครื่องหมายดีเอ็นเอ 9 เครื่องหมายมี 5 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกตอไม้ทั้ง 3 ตอออกจากกันได้
2. มีตัวอย่างชิ้นไม้ 2 ตัวอย่างคือ ตัวอย่างชิ้นไม้เลขที่ 29 และ 30 มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกับตัวอย่างตอไม้ที่ 1 (ตารางที่ 22.1 และ ภาพที่ 22.1)
3. ตัวอย่างชิ้นไม้ 61 ตัวอย่าง มีลักษณะทางพันธุกรรมไม่เหมือนตอไม้ทั้ง 3 ตอ คือชิ้นไม้หมายเลข 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 24, 25, 27, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 42, 47, 48, 51, 53, 54, 55, 57, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 84, 90, 91, 92, 103, 131, 133, 134, 137, 138, 140
4. มีตัวอย่างชิ้นไม้ 3 ตัวอย่างที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับตอไม้ที่ 1 คือ ตัวอย่างชิ้นไม้หมายเลข 43, 49, 36 และ 93 (ตารางที่ 22.1 และ ภาพที่ 22.1)

ตารางที่ 22.1 แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของต้นไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) ของกลาง และต้นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์ 9 ตำแหน่ง

ตัวอย่าง	Genotype in 9 loci								
	(COC_011)	(COC_08)	(COC_06)	(COC_05)	(DELB_18)	(COC_018)	(COC_07)	(DL4)	(DELB_120)
stump 1	11	23	11	11	12	11	11	33	11
stump 2	12	12	11	11	12	11	12	33	11
stump 3	34	13	11	13	22	11	13	33	11
3	11	23	11	11	22	11	11	33	11
8	11	23	11	11	22	11	11	33	11
9	11	23	11	11	22	11	11	33	11
10	11	23	11	11	22	11	11	33	11
11	11	23	11	11	12	11	11	13	11
12	11	23	11	11	22	11	00	33	11
13	11	23	11	00	11	22	00	00	00
15	11	23	11	11	11	11	00	33	00
16	11	23	11	11	22	11	11	33	11
24	11	23	11	11	22	11	11	33	11
25	11	23	11	11	11	11	12	33	11
29	11	23	11	11	12	11	11	33	11
30	11	23	11	11	12	11	11	33	11
31	11	23	11	00	00	00	11	11	11
32	11	23	11	11	12	00	11	00	11
34	11	23	11	11	22	11	11	00	11
35	11	23	11	11	22	11	11	00	11
36	11	23	11	13	00	00	11	00	11
39	11	23	11	11	22	11	11	33	11
40	11	23	11	11	22	11	11	33	11
41	11	23	11	00	00	00	11	23	11
42	11	23	11	11	22	11	11	33	11
43	11	23	11	00	00	16	11	33	11
49	11	23	11	00	00	00	11	33	11
51	11	23	11	00	00	00	11	23	11
57	11	23	11	11	00	00	11	23	00
60	11	23	11	11	00	00	11	23	00
61	11	23	11	11	11	11	12	33	11
63	11	23	11	11	12	00	11	23	00
64	11	23	11	11	12	00	11	23	11
65	11	23	11	11	12	00	11	22	00
66	11	23	11	11	11	00	11	23	00
67	11	23	11	11	12	00	11	22	00
71	11	23	11	11	00	00	11	23	00
73	11	23	11	11	22	00	00	22	00
74	11	23	11	11	00	00	11	22	00
92	11	23	11	11	12	00	11	22	11
93	11	23	11	11	11	00	11	33	11



ภาพที่ 22.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 3 ตำแหน่ง ในชิ้นไม้ของกลางของไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) เปรียบเทียบกับต่อไม้ 3 ต่อ ที่ถูกลักลอบตัดอย่างผิดกฎหมาย และต้นพะยูน (*D. cochinchinensis*) 7 ต้นจากอุทยานแห่งชาติน้ำพอง จ.ขอนแก่น ได้แสดงให้เห็นว่าไม้ชิ้นที่ 23 และ 30 มีลักษณะพันธุกรรมตรงกับ ต่อไม้ที่ถูกลักลอบตัดต่อที่ 1 (ที่มา: สุจิตรา, 2560)

สรุปผลการวินิจฉัยพันธุ์กรรม

พิสูจน์ได้ว่าขึ้นไม้ของกลาง 2 ชิ้นมีลักษณะทางพันธุกรรมตรงกับไม้พะยูนต้นหนึ่งที่ถูกลักลอบตัด

1. พิสูจน์ได้ว่าขึ้นไม้ของกลาง 2 ชิ้นมีลักษณะทางพันธุกรรมตรงกับไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ต้นหนึ่งที่ถูกลักลอบตัด (สุจิตรา, 2560)

2. ผลการวินิจฉัยพันธุ์กรรมได้ส่งอย่างเป็นทางการโดย กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ไปยัง สถานีตำรวจภูธรบ้านแท่น เมื่อวันที่ 17 ธันวาคม 2558 เลขหนังสือ ที่ ทส 0907.7/26721 เพื่อดำเนินการในส่วนที่เกี่ยวข้องต่อไป

3. เมื่อวันที่ 19 มกราคม 2564 ได้รับรายงานจาก นายอภิเดช หมั่นน้อย ผู้อำนวยการส่วนอนุรักษ์และป้องกันทรัพยากร สำหรับบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 8 (ขอนแก่น) ว่าคดีนี้ได้สิ้นสุดแล้ว และผู้ต้องหาได้รับสารภาพในชั้นศาล ศาลจึงได้พิพากษาให้รอลงอาญาจำเลย ปรับผู้ต้องหา 5,000 บาท และริบของกลาง และหลังจากนั้นมาก็ไม่พบการตัดไม้พะยูนในพื้นที่อุทยานแห่งชาตินี้ที่อีกเลย

จะเห็นได้ว่าผลจากการศึกษาด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์สามารถนำไปขยายผลในการดำเนินการทางกฎหมายและป้องปรามไม่ให้เกิดการทำผิดกฎหมายได้อีกในอนาคต

บทที่ 23

คดีนิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 6: กิ่งไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) ของต้นพะยูนต้องสงสัยมีพันธุกรรมตรงกับราก กิ่งที่งอกของ ไม้พะยูนที่คาดว่าถูกลักลอบลื้อต้นไปปลูกอีกที่หรือไม่

คำนำ

ได้มีการประสานขอความร่วมมือจากสถานีตำรวจในต่างจังหวัดโดยให้มีการส่งของกลางตรวจพิสูจน์ ไม้ของกลางจากตัวอย่างไม้ของกลาง 4 รายการ

รายการที่ 1. กิ่งไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) ที่เก็บจากต้นพะยูน (*D. cochinchinensis*) ต้องสงสัยที่พบปลูกอยู่ในบริเวณพื้นที่ของผู้ต้องหา จำนวน 6 ท่อน/ชิ้น (1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6)

รายการที่ 2. เนื้อไม้ส่วนลำต้นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ต้องสงสัยที่พบปลูกอยู่ในพื้นที่ของผู้ต้องหาจำนวน 1 ชิ้น

รายการที่ 3. รากของต้นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่ถูกลักไป ที่ถูกตัดเหลืออยู่ที่หลุมดินที่เกิดเหตุจำนวน 1 ท่อน/ชิ้น

รายการที่ 4. กิ่งไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่งอกเกิดจากรากของต้นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่ถูกตัดไปส่วนที่เหลืออยู่ที่หลุมดินที่เกิดเหตุจำนวน 10 กิ่ง

เพื่อตรวจพิสูจน์ว่า 1. วัตถุพยานรายการที่ 1, ที่ 2, ที่ 3 และ 4 เป็นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) หรือไม่ 2. วัตถุพยานรายการที่ 1 และ 2 ที่พบและเก็บจากต้นพะยูน (*D. cochinchinensis*) ต้องสงสัยมีลักษณะทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ตรงกันกับวัตถุพยานรายการที่ 3 และ ที่ 4 ที่เก็บจากบริเวณหลุมดินในบริเวณที่เกิดเหตุซึ่งเป็นส่วนของราก และกิ่งไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่เกิดงอกจากส่วนรากของต้นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ต้นที่ถูกลักขุดยกเอาไปหรือไม่ จึงได้ทำการส่งวัตถุพยานมาให้กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชเพื่อตรวจหารหัสพันธุกรรม ซึ่งผู้เขียนได้รับมอบหมายตามสายงานให้ตรวจพิสูจน์พันธุกรรมชิ้นส่วนไม้ของกลางดังกล่าว

วิธีการวินิจฉัยพันธุกรรม

1. ตรวจสอบวัตถุพยานรายการที่ 1, 2, 3 และ 4 เป็นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) หรือไม่ โดยการถอดรหัสพันธุกรรม

สกัด DNA จากตัวอย่างเนื้อไม้และใบด้วยชุดสกัด DNeasy Plant Kit (QIAGEN) แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ ซึ่งเป็นยีนในส่วน of คลอโรพลาสต์จีโนม คือ *rbcl* ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษา จากหลักการของวิธี Chain termination method ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) โดยทำพีซีอาร์ซึ่งจะติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ ไป ทำหีบริสุทธ์ และนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer

(Applied Biosystems, USA) แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

2. วัตถุพยานรายการที่ 1 และ 2 ที่พบและเก็บจากต้นพะยูน (*D. cochinchinensis*) ต้องสงสัยมีลักษณะทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ตรงกันกับวัตถุพยานรายการที่ 3 และ ที่ 4 ที่เก็บจากบริเวณหลุมดินในบริเวณที่เกิดเหตุซึ่งเป็นส่วนของราก และกิ่งไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่เกิดงอกจากส่วนรากของต้นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ต้นที่ถูกลักขุดยกเอาไปหรือไม่

สกัดดีเอ็นเอจากชิ้นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ของกลางจำนวน 4 ชิ้น สกัดดีเอ็นเอใช้ตามวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีการสกัดของ Doyle and Doyle (1990) และ Changtragoon *et al.* (1996a) แล้วนำมาระบายใน 1X TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 50-100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส วัดคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8% และนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb แล้วบันทึกภาพ แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ในชิ้นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ของกลาง

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มาวิเคราะห์โดยเครื่องหมาย ดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite markers) 12 เครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้ Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany) นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรมดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 50 หรือ 55 หรือ 60 องศาเซลเซียส ตามอุณหภูมิของ annealing ของไพรเมอร์ 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 วินาที จำนวน 35 รอบ วิเคราะห์โดยวิธีการดีฟลูออเรสเซนซ์ หลังจากนั้นวิเคราะห์จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (number of allele per locus, N) และวิเคราะห์ลักษณะพันธุกรรมของแต่ละตัวอย่าง การจัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) และ TFPGA version 1.3 (Miller, 1997)

ผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

1. ผลการพิสูจน์วัตถุพยานรายการที่ 1, 2, 3 และ 4 ว่าเป็นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) หรือไม่ โดยการถอดรหัสพันธุกรรมยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม คือ *rbcL* ขนาด 520 bp แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชแต่ละชนิดโดยผ่านโปรแกรม Bioedit และ Mega 6 ผลการศึกษาพบว่าวัตถุพยานทั้ง 4 รายการเป็นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ดังภาพที่ 23.1

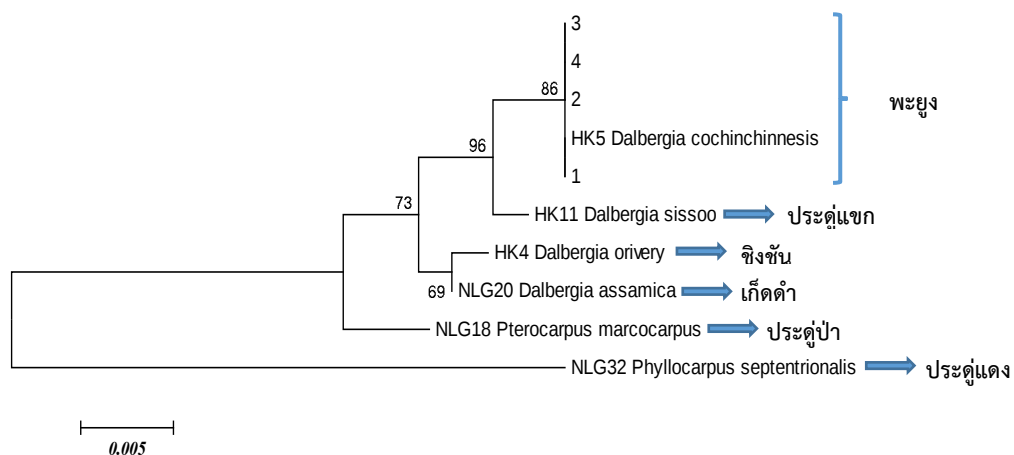
2. ผลการพิสูจน์วัตถุพยานรายการที่ 1 และ 2 ที่พบและเก็บจากต้นพะยูน (*D. cochinchinensis*) ต้องสงสัยมีลักษณะทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ตรงกันกับวัตถุพยานรายการที่ 3 และ ที่ 4 ที่เก็บจากบริเวณหลุมดินในบริเวณที่เกิดเหตุซึ่งเป็นส่วนของราก และกิ่งไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่เกิดงอกจากส่วนราก

ของต้นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ต้นที่ถูกลักขุดยกเอาไปหรือไม่ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite markers) 12 เครื่องหมายดีเอ็นเอพบว่า

2.1 วัตถุพยานรายการที่ 1 และ 2 มีลักษณะทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ไม่ตรงกัน แสดงดังตารางที่ 23.1, ภาพที่ 23.2 และ ภาพที่ 23.3

2.2 วัตถุพยานรายการที่ 3 และ ที่ 4 มีลักษณะทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ตรงกัน แสดงดังตารางที่ 23.1, ภาพที่ 23.2 และ ภาพที่ 23.3

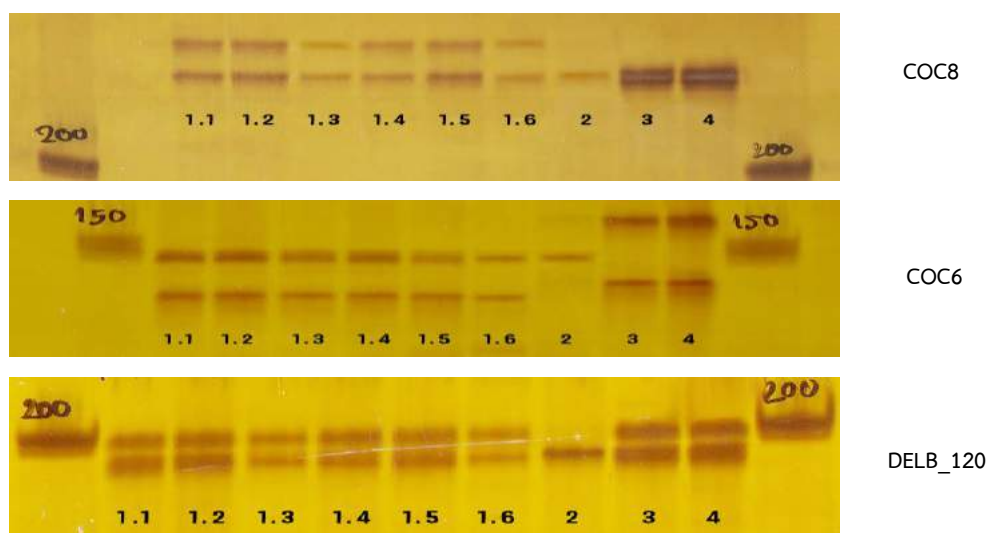
2.3 วัตถุพยานรายการที่ 1 และ 2 มีลักษณะทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ไม่ตรงกันกับวัตถุพยานรายการ ที่ 3 และ ที่ 4 แสดงดังตารางที่ 23.1, ภาพที่ 23.2 และ ภาพที่ 23.3



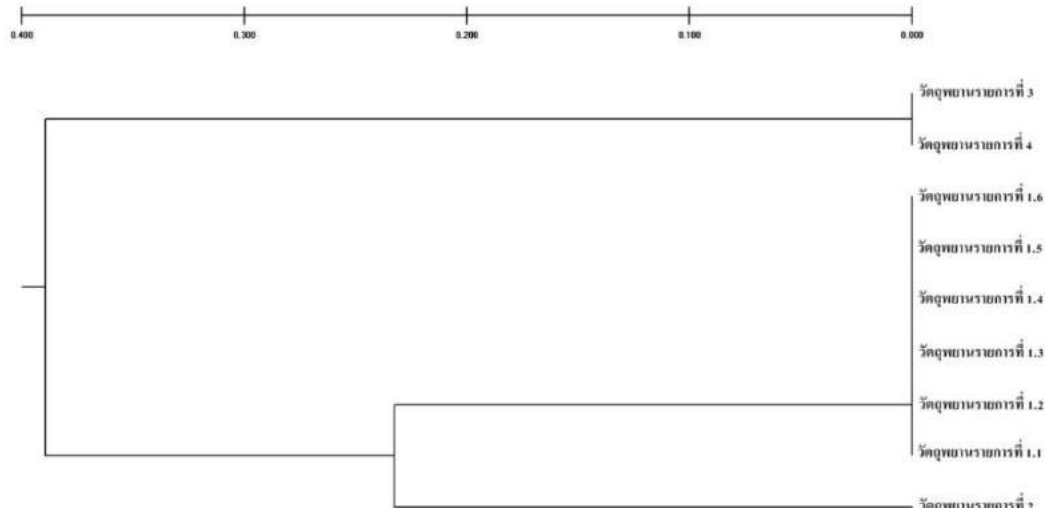
ภาพที่ 23.1 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของวัตถุพยานรายการที่ 1, 2, 3 และ 4 เปรียบเทียบกับไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) ในยีน *rbcl* ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining แบบ Bootstrap โดยโปรแกรม MEGA 4

ตารางที่ 23.1 แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของวัตถุดิบรายการที่ 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 2, 3 และ 4 จากการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์ 12 ตำแหน่ง

วัตถุ พยาน	ไพรเมอร์ (Primer)											
	coc_11	coc_8	coc_6	coc_5	DELB_18	coc_18	coc_7	coc_13	DL4	DELB_120	DELB_46	DELB_57
1.1	22	13	23	11	12	12	12	22	11	12	11	11
1.2	22	13	23	11	12	12	12	22	11	12	00	11
1.3	22	13	23	11	12	12	12	22	11	12	00	11
1.4	22	13	23	11	12	12	12	22	11	12	11	11
1.5	22	13	23	11	12	12	12	22	11	12	11	11
1.6	22	13	23	11	12	12	12	22	11	12	00	11
2	00	33	22	11	00	00	00	00	11	11	33	11
3	13	24	12	11	12	11	12	13	11	12	12	11
4	13	24	12	11	12	11	12	13	11	12	12	11



ภาพที่ 23.2 แสดงตัวอย่างตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่ง COC8, COC6 และ DELB_120 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถแยกลักษณะลักษณะทางพันธุกรรมของวัตถุดิบรายการที่ 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 2, 3 และ 4 ได้



ภาพที่ 23.3 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลโลไทป์ 12 ตำแหน่งของวัตถุพยานรายการที่ 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 2, 3 และ 4 ที่แสดงให้เห็นว่าวัตถุพยานรายการที่ 1 และ 2 มีลักษณะทางพันธุกรรมไม่เหมือนกับวัตถุพยานรายการที่ 3 และ 4

สรุปผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

1. การตรวจพิสูจน์วัตถุพยานรายการที่ 1, ที่ 2, ที่ 3 และ 4 ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม คือ *rbcl* พบว่าวัตถุพยานรายการที่ 1, ที่ 2, ที่ 3 และ 4 เป็นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) และวัตถุพยานรายการที่ 1 และ 2 โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลโลไทป์มีลักษณะทางพันธุกรรมไม่เหมือนกับวัตถุพยานรายการที่ 3 และ 4
2. แสดงให้เห็นว่าไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่ถูกลักลอบล่อมต้นในที่เกิดเหตุมีลักษณะพันธุกรรมไม่ตรงกับต้นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ที่คาดว่าจะนำไปปลูกที่พื้นที่หนึ่ง
3. รายงานผลการวินิจฉัยทางพันธุกรรมได้จัดส่งอย่างเป็นทางการจากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชไปยัง หน่วยงานที่ร้องขอความให้ตรวจวิเคราะห์ลักษณะพันธุกรรมของไม้พะยูนดังกล่าวเพื่อทราบและดำเนินการต่อไป

บทที่ 24

คดีนิติวิทยาศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ คดีที่ 7: การพิสูจน์วัตถุพยาน ไม้ของกลางเป็นไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) หรือไม้ และซีลี้อย และเศษไม้ของกลางมีพันธุกรรมตรงกับต่อไม้ที่ถูกตัดจากวัดหรือไม่

คำนำ

ได้รับการประสานขอความร่วมมือจากสถานีตำรวจในจังหวัดหนึ่งเพื่อ ส่งของกลางตรวจพิสูจน์ ไม้ของกลางจากตัวอย่างไม้ของกลาง 3 รายการ เพื่อตรวจพิสูจน์ว่า

1. วัตถุพยานรายการที่ 8.1, ที่ 8.2 และ 8.3 เป็นไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) หรือไม้อย่างไร
2. วัตถุพยานรายการที่ 8.1, ที่ 8.2 และ 8.3 มีโครงสร้างทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ตรงกันหรือไม่อย่างไร
3. วัตถุพยานรายการที่ 8.3 เก็บจากเลื่อยโซยนต์และบนกระเบรลพวงลากของรถไถที่ต้องสงสัยมีโครงสร้างทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ตรงกับวัตถุพยานรายการที่ 8.1 ที่เก็บจากต่อไม้ที่เกิดเหตุหรือไม่อย่างไร จึงได้ทำการส่งวัตถุพยานมาให้อัยการส่งวัตถุพยานมาให้กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช เพื่อตรวจหารหัสพันธุกรรม ซึ่งผู้เขียนได้รับมอบหมายตามสายงานให้ตรวจพิสูจน์พันธุกรรมชิ้นส่วนไม้ของกลางดังกล่าว

วิธีการวินิจฉัยพันธุกรรม

วัตถุพยานที่รับมาทำการศึกษา

รายการที่ 8.1. เศษซีลี้อย, เศษไม้, กิ่งไม้, เก็บจากบริเวณต่อไม้ที่เกิดเหตุภายในวัด จำนวน 3 ซอง (ตามหมายเลขของลำดับที่ 1.1, 1.2, 1.3)

รายการที่ 8.2. เศษซีลี้อย, เศษไม้, เก็บจากบริเวณป่าทุ่งนาด้านทิศตะวันตกบ้านคำโพธิ์ จำนวน 2 ซอง (ตามหมายเลขของลำดับที่ 2.1, 2.2)

รายการที่ 8.3. เศษไม้, เศษซีลี้อย เก็บจากอุปกรณ์เลื่อยโซยนต์และบนกระเบรลพวงลากของรถไถ จำนวน 4 ซอง (ตามหมายเลขของลำดับที่ 3.1, 3.2, 3.3, 3.4)

1. สกัดดีเอ็นเอ สกัด DNA จากตัวอย่างเนื้อไม้และใบจากวัตถุพยานรายการที่ 8.1 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 1.1, 1.2, 1.3) วัตถุพยานรายการที่ 8.2 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 2.1, 2.2) วัตถุพยานรายการที่ 8.3 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 3.1, 3.2, 3.3, 3.4) ด้วยชุดสกัด DNeasy Plant Kit (QIAGEN) พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้เพียง 3 ตัวอย่าง ได้แก่ วัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3, 2.2 และ 3.1 และตัวอย่างที่ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ ทำให้ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปได้ ได้แก่ วัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.1, 1.2, 2.1, 3.2, 3.3 และ 3.4

2. ตรวจสอบวัตถุพยาน รายการที่ 8.1 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3), ที่ 8.2 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 2.2) และที่ 8.3 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 3.1) เป็นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) หรือไม้ โดยการ

3. ถอดรหัสพันธุกรรม

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ ซึ่งเป็นยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม คือ trnH + psbA ขนาด 350 bp ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษา จากหลักการของวิธี Chain termination method ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) โดยทำพีซีอาร์ซึ่งจะติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ไม้ชิงชัน (*D. Oliveri*) กระพี้เขาควาย (*D. cultrata*) และประดู่ (*P. macrocarpus*) 3. วัตถุประสงค์การวิจัยที่ 8.1 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3), ที่ 8.2 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 2.2) และที่ 8.3 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 3.1) มีโครงสร้างทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ตรงกันหรือไม่อย่างไร และวัตถุประสงค์การวิจัยที่ 8.3 เก็บจากเลื่อยโซยนต์และบนกระเบรพวงลากของรถไถที่ต้องสงสัยมีโครงสร้างทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ตรงกับวัตถุประสงค์การวิจัยที่ 8.1 ที่เก็บจากตอไม้ที่เกิดเหตุหรือไม่อย่างไร

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 10 ตำแหน่ง และเปรียบเทียบกับไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากอุทยานแห่งชาติภูเก้าภูพานคำ อุทยานแห่งชาติผาแต้ม และอุทยานแห่งชาติภูเวียง

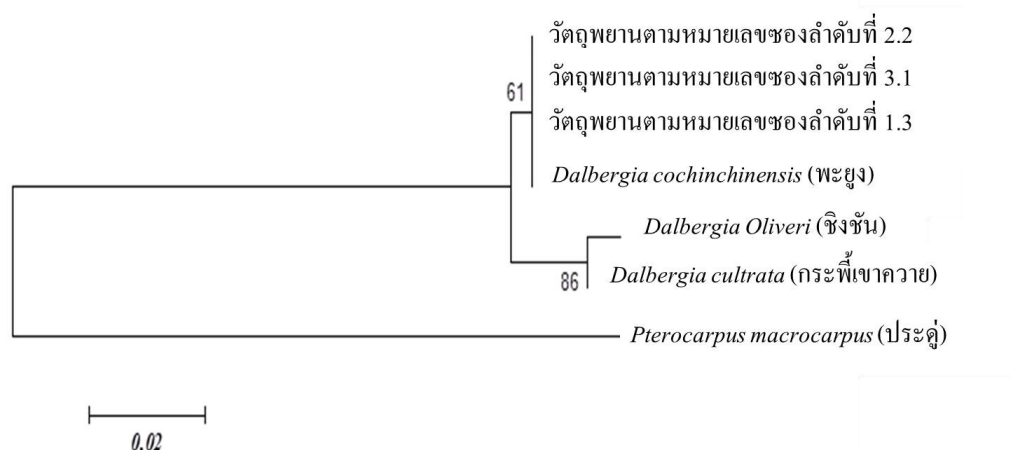
ผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

1. ผลการพิสูจน์วัตถุประสงค์การวิจัยที่ 8.1 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3), ที่ 8.2 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 2.2) และที่ 8.3 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 3.1) ว่าเป็นไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) หรือไม่ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม คือ trnH + psbA ขนาด 350 bp โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ชิงชัน (*D. Oliveri*) กระพี้เขาควาย (*D. cultrata*) และประดู่ (*P. macrocarpus*) โดยผ่านโปรแกรม Bioedit และ Mega 6 ผลการศึกษาพบว่าวัตถุประสงค์การวิจัยทั้ง 3 ตัวอย่างมีรหัสพันธุกรรมตรงกับไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ดังภาพที่ 24.1

2. ผลการพิสูจน์วัตถุประสงค์การวิจัยที่ 8.1 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3), ที่ 8.2 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 2.2) และที่ 8.3 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 3.1) มีโครงสร้างทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ตรงกันหรือไม่อย่างไร โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite markers) 10 เครื่องหมายดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) จากอุทยานแห่งชาติภูเก้าภูพานคำ อุทยานแห่งชาติผาแต้ม และอุทยานแห่งชาติภูเวียง พบว่าวัตถุประสงค์การวิจัยตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3, 2.2 และ 3.1 มีลักษณะทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) เหมือนกัน ดังตารางที่ 24.1 ภาพที่ 24.2 และภาพที่ 24.3

3. ผลการพิสูจน์วัตถุประสงค์การวิจัยที่ 8.3 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 3.1) เก็บจากเลื่อยโซยนต์และบนกระเบรพวงลากของรถไถที่ต้องสงสัยมีโครงสร้างทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ตรงกับวัตถุประสงค์การวิจัยที่ 8.1 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3) ที่เก็บจากตอไม้ที่เกิดเหตุหรือไม่อย่างไร พบว่าวัตถุประสงค์การวิจัยที่ 8.3

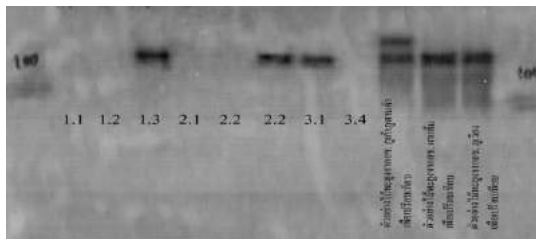
ตามหมายเลขของลำดับที่ 3.1 (ซีเลื่อยบริเวณรยางค์ที่ต้องสงสัย) และวัดอุทยานรายการที่ 8.1 ตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3 (ใบไม้และกิ่งไม้ที่เก็บจากตอไม้ที่เกิดเหตุ) มีลักษณะทางพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) เหมือนกัน ดังตารางที่ 24.1 ภาพที่ 24.2 และภาพที่ 24.3



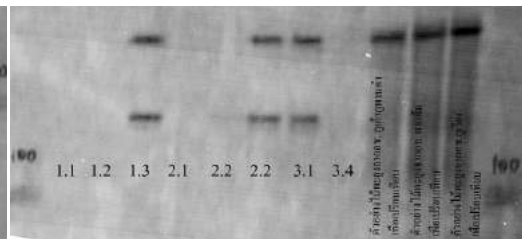
ภาพที่ 24.1 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมวัดอุทยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3, 2.2, และ 3.1 ในยีน tmH+psbA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรมไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) ไม้ชิงชัน (*D. oliveri*) กระพี้เขาควาย (*D. cultrata*) และ ไม้ประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus*) ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining แบบ Bootstrap โดยโปรแกรม MEGA 4

ตารางที่ 24.1 แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของวัดอุทยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3, 2.2, 3.1 และ ตัวอย่างไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) จากแหล่งอื่นที่ใช้เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่ง

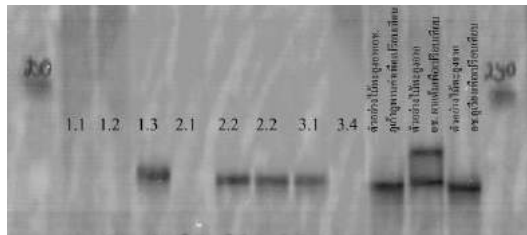
วัดอุทยาน	ไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ 10 ตำแหน่ง									
	Coc 11	Coc 8	Coc 6	Coc 5	DELB 18	Coc 18	Coc 7	Coc 13	DL 4	DELB 120
1.3 (ใบไม้ที่เก็บจากบริเวณตอไม้ที่เกิดเหตุ)	11	11	22	12	11	33	11	22	11	22
2.2 (เศษไม้จากที่แปรรูปไม้)	11	11	22	12	11	33	11	22	11	22
3.1 (ซีเลื่อยบริเวณรยางค์)	11	11	22	12	11	33	11	22	11	22
ตัวอย่างไม้พะยูนจากอช. ภูเก้าภูพานคำ	12	24	11	22	11	35	11	22	11	22
ตัวอย่างไม้พะยูนจาก อช. ผาแต้ม	11	33	23	22	11	12	11	13	11	12
ตัวอย่างไม้พะยูนจาก อช. ภูเวียง	11	12	11	22	11	34	12	22	11	22



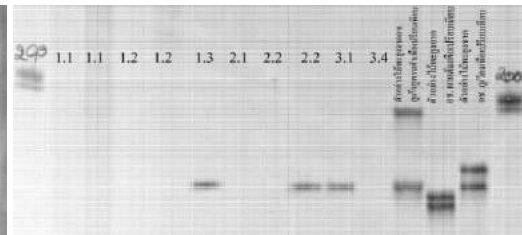
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COC11



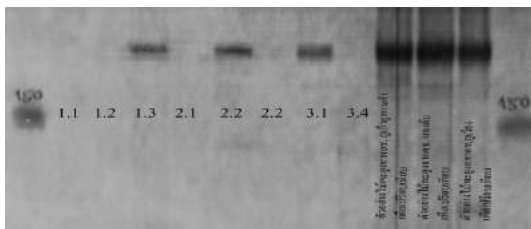
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COC5



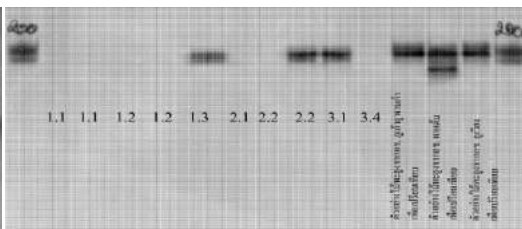
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COC6



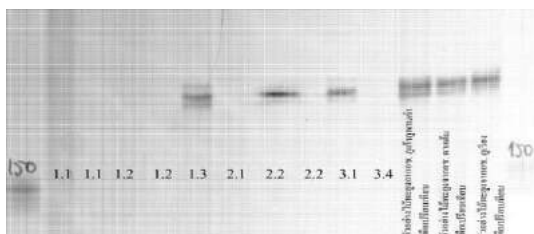
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COC18



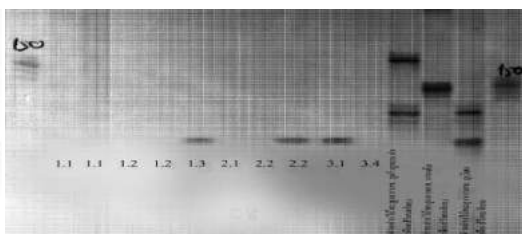
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง DL4



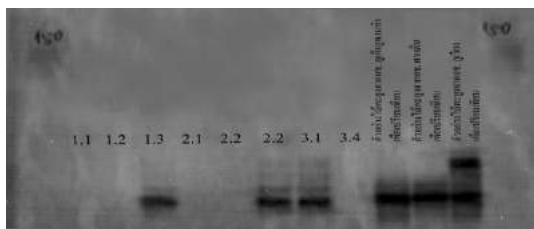
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง DELB_120



ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง DELB_18



ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COC8

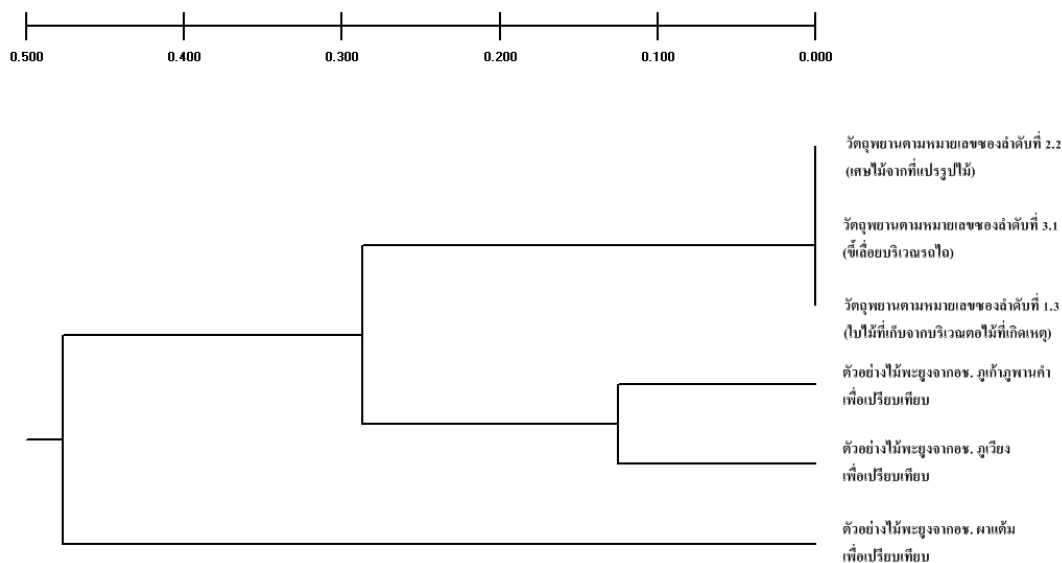


ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COC7



ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COC13

ภาพที่ 24.2 แสดงตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง ที่แสดงให้เห็นว่าวัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3, 2.2 และ 3.1 มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน



ภาพที่ 24.3 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่งของวัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3 วัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 2.2 วัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 3.1 และตัวอย่างไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) จากแหล่งอื่นที่ใช้เปรียบเทียบ ที่แสดงให้เห็นว่า วัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3, 2.2 และ 3.1 มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน

สรุปผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

1. การตรวจพิสูจน์วัตถุพยานรายการที่ 8.1 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3) ที่ 8.2 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 2.2) และที่ 8.3 (ตามหมายเลขของลำดับที่ 3.1) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม คือ trnH + psbA พบว่าวัตถุพยานรายการทั้ง 3 ตัวอย่างมีรหัสพันธุกรรมตรงกับไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*)

2. การตรวจพิสูจน์วัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3, 2.2 และ 3.1 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 10 เครื่องหมายดีเอ็นเอ พบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันและวัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 3.1 (ขี้เลื่อยบริเวณรถไถที่ต้องสงสัย) และวัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3 (ไปไม้และกิ่งไม้ที่เก็บจากต้นไม้ที่เกิดเหตุ) มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน

3. ผลการวินิจฉัยพันธุกรรมครั้งนี้ได้จัดส่งรายงานผลเป็นทางการจากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ไปยังสถานีตำรวจที่ร้องขอความร่วมมือวิเคราะห์พันธุกรรมในไม้ของกลางเพื่อให้ทางสถานีตำรวจได้รับทราบและดำเนินการต่อไป

บทที่ 25

คดีนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า: การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและการถอดรหัสพันธุกรรม ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

คำนำ

บทนี้เป็นการประมวลประสบการณ์ของผู้เขียนในการดำเนินงานด้านนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าในประเทศไทยเมื่อสิบกว่าปีก่อนซึ่งนับว่าเป็นงานที่ไม่เคยมีประสบการณ์ด้านนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่ามาก่อน โดยได้ใช้รหัสพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในการจำแนกชนิดพันธุ์ สายพันธุ์ และแหล่งที่มาของสัตว์ป่าของกลางเพื่อการบังคับใช้กฎหมายทั้งภายในและภายนอกประเทศ ทั้งนี้ อู๋รังอุตัง เสือ ช้าง และวัวแดง เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองและใกล้สูญพันธุ์ในบัญชีไซเตส และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ในการวินิจฉัยจำนวนตัวของเสือของกลาง อย่างไรก็ตามสัตว์ป่าเหล่านี้และผลิตภัณฑ์ของสัตว์ป่าดังกล่าวได้ถูกล่าและลักลอบอย่างผิดกฎหมายในเอเชียและแอฟริกา จากประสบการณ์ของผู้เขียนในคดีสัตว์ป่าของกลางที่มีการวินิจฉัยตรวจสอบแหล่งที่มา ชนิดพันธุ์ สายพันธุ์ และจำนวนตัว 4 คดี ที่ถูกนำมาเสนอเป็นกรณีศึกษาในบทนี้ กล่าวคือได้มีการวินิจฉัยตรวจสอบแหล่งที่มาตามภูมิศาสตร์ในอู๋รังอุตังที่เป็นสัตว์ป่าของกลาง 53 ตัว การวินิจฉัยชนิดพันธุ์ของเนื้อเสือของกลาง 17 ชิ้น เนื้อเสือของกลาง 6 ชิ้น และจำนวนตัวของเสือของกลาง และการวินิจฉัยชนิดของช้างจากผลิตภัณฑ์ช้าง 7 ผลิตภัณฑ์และการวินิจฉัยว่าเนื้อของกลางเป็นวัวแดงหรือไม่ ในการที่จะวินิจฉัยแหล่งที่มาของอู๋รังอุตังของกลาง สายพันธุ์ของชิ้นเนื้อเสือของกลาง ชนิดพันธุ์ของช้างจากผลิตภัณฑ์ช้าง และชิ้นเนื้อของกลาง คาดว่าในวัวแดงนี้ได้ทำการศึกษาโดยการถอดรหัสพันธุกรรมที่ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอและจำนวนตัวของเสือด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ (Changtragoon, 2012) กรณีศึกษาทั้ง 4 นี้ สรุปพอสังเขปมีดังต่อไปนี้

กรณีศึกษาที่ 1: อู๋รังอุตัง อู๋รังอุตังได้ถูกลักลอบเข้าประเทศอย่างผิดกฎหมาย ประเทศไทยมีความต้องการที่จะส่งอู๋รังอุตังกลับคืนถิ่นเดิม แต่ต้องการให้กลับให้ถูกแหล่งกำเนิดเดิม จึงได้มีการวินิจฉัยแหล่งพันธุกรรมของอู๋รังอุตังดังกล่าวด้วยการถอดรหัสพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง Control region เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแหล่งพันธุกรรมของอู๋รังอุตังระดับนานาชาติของ Genbank NCBI (National Center for Biotechnology Information) ผลการศึกษาดังกล่าวพบว่า อู๋รังอุตัง 53 ตัว เป็นสายพันธุ์บอร์เนียว (*P. pygmacus pygmacus*) อู๋รังอุตัง 50 ตัว มีความเป็นไปได้ว่ามาจากตะวันตกเฉียงใต้และตอนกลางของกาลิมันตัน บนเกาะบอร์เนียว ประเทศอินโดนีเซีย ส่วนอีก 3 ตัว มีความเป็นไปได้ว่า มาจากตะวันออกของกาลิมันตัน เกาะบอร์เนียว ประเทศอินโดนีเซีย ผลการศึกษามีประโยชน์ต่อหน่วยงานบังคับใช้กฎหมายและหน่วยงานไซเตสของประเทศไทยที่สามารถดำเนินส่งอู๋รังอุตังกลับสู่แหล่งกำเนิดเดิมได้ (Changtragoon, 2012)

กรณีศึกษาที่ 2: เสือ (*Panthera spp.*) เสือที่ได้ถูกวินิจฉัยครั้งนี้เกิดจากการการลักลอบล่าและนำส่งไปตามเส้นทางชายแดนภาคเหนือของไทย สำหรับการค้าที่ผิดกฎหมายและได้ถูกจับกุมโดยหน่วยงาน

ไซเตสของประเทศไทย ดังนี้ ชิ้นเนื้อของกลางเสือ 17 ชิ้น และมีหนังเสือของกลาง 6 ชิ้น ถูกนำมาวินิจฉัยชนิดและสายพันธุ์ของเสือ การถอดรหัสพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียที่ตำแหน่ง [1] C1494F/T1936R (ND6; NADH dehydrogenase subunit 6) [2] C2339F/T2893R (CytB; cytochrome b) [3] L14724/HCAT (CytB; cytochrome b) Cracraft *et al.* (1998) [4] CR-UPF/CR-R2B (CR: control region) [5] C8276F/T8620R (ND1; NADH dehydrogenase subunit 1) [6] T8942F/C9384R (ND2; NADH dehydrogenase subunit 2) และ [7] C9366F/T9882R (ND2; NADH dehydrogenase subunit 2) และประมวลผลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ใน NCBI (National Center for Biotechnology Information) ผลการศึกษาพบว่าจากตัวอย่างชิ้นเนื้อของกลาง 17 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเสือโคร่ง (*Panthera tigris*) 12 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 3 สายพันธุ์ ดังนี้ สายพันธุ์ Indochinese tiger (*Panthera tigris corbetti*) Amur tiger (*Panthera tigris altaica*) และ Malayan tiger (*Panthera tigris jacksoni*) ส่วนอีก 3 ตัวอย่างนั้นเป็นเสือดาว (*Panthera pardus*) 1 ตัวอย่าง และเสือลายเมฆ (*Neofelis nebulosa*) 2 ตัวอย่าง ส่วนหนึ่งอีก 6 ชิ้นนั้นพบว่า 3 ตัวอย่างเป็นเสือ Indochinese (*Panthera tigris corbetti*) และอีก 3 ชิ้นเป็นเสือดาว (*Panthera pardus*) ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการบังคับใช้กฎหมายและการป้องกันและอนุรักษ์พันธุ์เสือ และขยายผลจับกุมผู้กระทำความผิดทั้งในประเทศไทยและสหรัฐอเมริกา (Changtragoon, 2012)

กรณีศึกษาที่ 3: งาช้าง ผลจากการศึกษาการถอดรหัสพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียที่ตำแหน่ง Cytochrome b ยีนเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของช้างระดับนานาชาติและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่า มีตำแหน่งที่จำเพาะนิวคลีโอไทด์กับช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) 15 ตำแหน่ง และมี 14 ตำแหน่งที่จำเพาะกับช้างแอฟริกา (*Loxodonta africana cyclotis*) ผลการศึกษาพบว่า 5 ผลิตรักษังช้างมาจากช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) และอีก 2 ผลิตรักษังช้างมาจากช้างแอฟริกาที่มาจากป่า (*Loxodonta africana cyclotis*) (Changtragoon, 2012)

กรณีศึกษาที่ 4: เนื้อของกลางที่ต้องสงสัยได้ถูกส่งมาจากหน่วยปฏิบัติการของเครือข่ายการบังคับใช้กฎหมายสัตว์ป่าและพันธุ์พืชแห่งภูมิภาคอาเซียน (ASEAN-Wildlife Enforcement Network: ASEAN-WEN) และ ไซเตสของประเทศไทยกับกัมพูชาได้ให้ประเทศไทยช่วยวินิจฉัยว่าเป็นเนื้อของวัวแดงหรือไม่ ผลจากการศึกษาวินิจฉัยรหัสพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียที่ตำแหน่ง Cytochrome b ยีน เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสัตว์ป่าระดับนานาชาติและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่า ชิ้นเนื้อดังกล่าว เป็นเนื้อของควาย Water buffalo (*Bubalus bubalis*) เนื่องจากควายไม่ได้อยู่ในบัญชีไซเตสและไม่ได้ขัดต่อกฎหมายไซเตสจึงได้รายงานให้หน่วยปฏิบัติการในประเทศกัมพูชาดำเนินการต่อไป จากการนำเสนอกรณีศึกษาทั้ง 4 ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าวิธีการวินิจฉัยสัตว์ป่าแต่ละชนิดไม่ว่าจำแนกชนิด สายพันธุ์ หรือแหล่งที่มาขึ้นต้องอาศัยฐานข้อมูล Genbank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าข้อมูลพันธุกรรมของการศึกษาระดับนานาชาติที่รวบรวมอย่างเป็นระบบเพื่อใช้ในฐานะข้อมูลกลางมี

ความสำคัญอย่างยิ่งต่อการดำเนินการทางนิติวิทยาศาสตร์ที่ต้องการความรวดเร็วเพื่อนำไปใช้ในการบังคับใช้กฎหมายได้ทันต่อเหตุการณ์

รายละเอียดในการพิสูจน์ชนิดพันธุ์ของแต่ละกรณีศึกษามีดังต่อไปนี้

กรณีศึกษาที่ 1: อรุ้งอุ๋ง การวินิจฉัยแหล่งที่มาของอรุ้งอุ๋งที่เป็นของกลางโดยการถอดรหัสพันธุกรรม **คำนำ**

เนื่องจากการทำลายแหล่งที่อยู่อาศัยและการรุกราน ทำให้อรุ้งอุ๋ง (*Pongo pygmaeus*) ใกล้สูญพันธุ์และถูกคุกคามอย่างรุนแรงในพื้นที่เล็ก ๆ บนเกาะบอร์เนียวและสุมาตรา ประมาณห้าสิบปีที่แล้ว Van Bemmelen (1968) และ Jones (1969) ได้จำแนกลิงอรุ้งอุ๋งตามอนุกรมวิธานออกเป็นสองสายพันธุ์ย่อยที่แตกต่างกัน ได้แก่ บอร์เนียว (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) และสุมาตรา (*Pongo pygmaeus abelii*) ในอดีตมีการศึกษาทางพันธุกรรมจำนวนมากเกี่ยวกับความแตกต่างของลิงอรุ้งอุ๋ง การแยกความแตกต่าง และสายพันธุ์ย่อยโดยใช้การวิเคราะห์ไอโซไซม์ (Janczewski *et al.*, 1990) ความยาวที่แตกต่างกันของส่วน restriction ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (Zhi *et al.*, 1996) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (Warren *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001; Kanthaswamy and Smith, 2002) nuclear minisatellite (Zhi *et al.*, 1996) รวมถึงลำดับดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย (Zhi *et al.*, 1996; Xu and Arnason, 1996; Warren, *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001) Zhang *et al.* (2001) ประมาณจากข้อมูลของพวกเขาว่าเวลาความแตกต่างระหว่างสองสายพันธุ์ย่อยนั้นอยู่ที่ประมาณ 2.3 $\pm$ 0.5 ล้านปีก่อน (MYA) ซึ่งเร็วกว่าการแยกการกระจายทางธรณีวิทยาของพวกมันมาก ไม่มีสายพันธุ์ย่อยใดที่ประสบปัญหาคอขวดเมื่อเร็ว ๆ นี้ แม้ว่า ชนิดย่อยของสุมาตราอาจมีการขยายตัวเมื่อประมาณ 82,000 ปีก่อน อย่างไรก็ตาม Warren *et al.* (2001) ได้เสนอแนะว่าทั้งสองชนิดย่อยถูกแยกออกจากกันทางภูมิศาสตร์เป็นเวลา 10,000–15,000 ปี และมีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น Warren *et al.* (2001) ได้รายงานการวิจัย คาดว่า อรุ้งอุ๋งบอร์เนียวและสุมาตราแยกจากกันเมื่อประมาณ 1.1 ล้านปีก่อน (MYA) และประชากรบอร์เนียวที่แตกต่างกันสี่กลุ่ม (1. กาลิมันตันตะวันตกเฉียงใต้และกลางกาลิมันตัน 2. กาลิมันตันตะวันตกเฉียงเหนือและซาราวัก 3. ซาบาห์และ 4. กาลิมันตันตะวันออก) แยกจากกันเมื่อ 860,000 ปีก่อน การค้นพบนี้มีนัยสำคัญสำหรับการจัดการ การผสมพันธุ์ และแนวทางปฏิบัติในการอนุรักษ์และคุ้มครองลิงอรุ้งอุ๋ง (Changtragoon, 2012)

หลายปีผ่านมามีอรุ้งอุ๋งหลายตัวถูกนำเข้าประเทศไทยอย่างผิดกฎหมายโดยมีอรุ้งอุ๋ง 53 ตัว ดังแสดงในภาพที่ 25.1 ถูกยึดและดูแลโดยกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช อย่างไรก็ตาม รัฐบาลราชอาณาจักรไทยได้ตัดสินใจส่งลิงอรุ้งอุ๋งเหล่านั้นกลับไปยังแหล่งกำเนิด ดังนั้น การหาแหล่งทางภูมิศาสตร์ของอรุ้งอุ๋งที่ไม่รู้จักจึงมีความจำเป็นสำหรับการจัดการโครงการนำลิงอรุ้งอุ๋งกลับคืนสู่สภาพเดิมและการวางแผนกลยุทธ์การอนุรักษ์ (Karesh *et al.*, 1997) การส่งลิงอรุ้งอุ๋งที่ถูกยึดไปยังแหล่งกำเนิดที่ถูกต้องเป็นสิ่งสำคัญมาก การวิจัยทางพันธุกรรมก่อนหน้านี้ที่ทำโดย Warren *et al.* (2001) ได้จัดทำฐานข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อเปรียบเทียบกับลำดับดีเอ็นเอของลิงอรุ้งอุ๋งที่ไม่ทราบที่มาและระบุ

แหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ของพวกมัน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงสามารถระบุที่มาของอูรังอุตังที่ถูกยึดได้โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย



ภาพที่ 25.1 แสดงภาพอูรังอุตังที่ถูกนำเข้าประเทศไทยอย่างผิดกฎหมาย

วิธีการวินิจฉัยพันธุกรรม

ได้นำตัวอย่างเลือดอูรังอุตังมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Qiagen© DNeasy blood extraction kit แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ (PCR, polymerase chain reaction) ด้วยไพรเมอร์ซึ่งเป็นยีนในไมโทคอนเดรีย โดยการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA บริเวณ Control region ขนาด 278 bp (F: 5'CAACATGAATATCACCC R:5'-TGTGCGGGATATTGATTTAC) โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของบริเวณที่มีความผันแปร จากงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาในบริเวณ Control region ของอูรังอุตัง, ชิมแพนซี และมนุษย์ และเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนเข้ากับ พลาสมิดใช้ชุด pGEM-T Easy Vector System I kit (Promega, USA) ซึ่งมาพร้อมกับพลาสมิด pGEM-Teasy vector และถ่ายยีนเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน (host) เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม โดยวิธี CaCl_2 heat shock transformation (Sambrook *et al.*, 1989) หลังจากนั้นตรวจยืนยันชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนที่อยู่ในพลาสมิดสายผสม และเพิ่มปริมาณในเซลล์เจ้าบ้านโดยใช้วิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ จากนั้นสกัดแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด High Pure Plasmid Isolation Kit จาก Roche ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษา จากหลักการของวิธี Chain termination method ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) โดยทำพีซีอาร์ ซึ่งจะติดฉลากด้วย ฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) แล้วนำลำดับดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียที่ได้รับจากอูรังอุตังต้นกำเนิดที่ไม่รู้จักมาเปรียบเทียบกับลำดับ mtDNA ของลิงอูรังอุตังที่สอดคล้องกันจาก Warren *et al.* (2001) ใน NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) จากนั้นวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ กับฐานข้อมูล gene bank โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อไปนี้: BioEdit sequence alignment, DnaSP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003) และ Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2004)

ผลการวินิจฉัยพันธุ์กรรมและวิจารณ์

ลำดับ DNA ของไมโทคอนเดรียที่บริเวณ Control region ของอูรังอุตังที่ถูกยึด 53 ตัว มีความยาว 280-304 bp ในขณะที่ Warren *et al.* (2001) พบว่ามีความยาว 245-278 bp อ้างอิงจากการเปรียบเทียบขนาดที่ผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในลิงอูรังอุตัง กับ Warren *et al.* (2001) และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการชี้ให้เห็นว่าอูรังอุตังที่ถูกยึดเป็นสายพันธุ์ย่อยบอร์เนียว (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) แสดงว่าลิงอูรังอุตังที่ถูกยึด 50 ตัว มีตำแหน่งตัวแปรจำเพาะของประชากร (A98) ที่สอดคล้องกับลำดับจากทางตะวันตกเฉียงใต้และกาลิมันตันกลางซึ่งไม่พบในลำดับของประชากรอื่น ในทางกลับกันอูรังอุตังที่ถูกยึดอีกสามตัวที่เหลือมีตำแหน่งมีความผันแปรจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง A78 สำหรับประชากรจากกาลิมันตันตะวันออกที่ตีพิมพ์โดย Warren *et al.* (2001) โดยสามารถศึกษาเพิ่มเติมได้จาก phylogenetic tree การจัดกลุ่มอูรังอุตัง โดยการถอดรหัสพันธุ์กรรมจา Control region รายละเอียดสามารถศึกษาได้จาก Changtragoon (2010) และ Changtragoon (2012) ลำดับดีเอ็นเอของอูรังอุตังห้าสิบตัวมีลำดับเบสเดียวกันกับลำดับของประชากรทางตะวันตกเฉียงใต้และทางตอนกลางของกาลิมันตัน ขณะที่อูรังอุตังอีกสามตัวมีลำดับชั้นของประชากรกาลิมันตันตะวันออก จากผลการศึกษาดังกล่าว ชี้ให้เห็นว่าอูรังอุตังห้าสิบตัวมาจากกาลิมันตันตะวันตกเฉียงใต้และตอนกลาง บอร์เนียว และอูรังอุตังอีกสามตัว (หมายเลข 32, 44 และ 46) อาจมาจากกาลิมันตันตะวันออกบอร์เนียว ประเทศอินโดนีเซีย จากข้อมูลของผลลัพธ์นี้ รัฐบาลของราชอาณาจักรไทยได้ส่งอูรังอุตังที่ถูกยึดทั้งหมดไปยังประเทศอินโดนีเซียเพื่อพักฟื้นและนำตัวกลับคืนสู่ประชากรบอร์เนียวที่เหมาะสม

ผลจากการวินิจฉัยพันธุ์กรรมครั้งนี้มีประโยชน์สำหรับผู้บังคับใช้กฎหมายและการดำเนินการตามกฎหมาย CITES (อนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์) เพื่อส่งลิงอูรังอุตังที่ถูกยึดกลับไปยังแหล่งกำเนิด ดังที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ อูรังอุตังในเกาะและประชากรต่าง ๆ ได้แยกย้ายกันไปนานแล้ว หากถูกส่งไปผิดที่อาจไม่ได้รับการต้อนรับจากกลุ่ม และไม่สามารถสื่อสารกับตัวอื่นได้ หรืออาจไม่พบคู่ครองที่เหมาะสม ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อแหล่งพันธุ์กรรมของลิงอูรังอุตังตามธรรมชาติเหล่านั้น ดังนั้น ข้อมูลที่ได้รับในเรื่องนี้และการศึกษาอื่นๆ จึงมีความสำคัญมากสำหรับการวิจัยทางนิเวศวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าที่มีประสิทธิภาพ การบังคับใช้กฎหมาย CITES รวมถึงเครือข่ายการบังคับใช้สัตว์ป่าอาเซียน (ASEAN-WEN) (Changtragoon, 2012)

สรุปผลการวินิจฉัยพันธุ์กรรม

จากผลการเปรียบเทียบตำแหน่งที่ผันแปรของนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการชี้ให้เห็นว่าลิงอูรังอุตังที่ถูกยึดจำนวน 53 ตัวนั้นเป็นสายพันธุ์ย่อยของบอร์เนียว (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) อูรังอุตังห้าสิบตัวอาจมาจากทางตะวันตกเฉียงใต้และทางตอนกลางของกาลิมันตัน บอร์เนียว และลิงอูรังอุตังอีก 3 ตัวที่อาจมาจากกาลิมันตันตะวันออก บอร์เนียว อินโดนีเซีย ผลลัพธ์นี้มีประโยชน์สำหรับ CITES (อนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์) และการดำเนินการเพื่อส่งลิงอูรังอุตังเหล่านั้นกลับไปยังแหล่งกำเนิดที่ถูกต้อง (Changtragoon, 2010; Changtragoon, 2012)

กรณีศึกษาที่ 2: เสือ (*Panthera spp.*) การจำแนกชนิดพันธุ์สายพันธุ์และจำนวนตัวของเสือจากตัวอย่างชิ้นเนื้อและหนังเสือที่เป็น_ของกลางโดยการถอดรหัสพันธุกรรมและการศึกษา DNA fingerprinting

คำนำ

เมื่อประมาณสิบกว่าปีก่อนกองคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าตามอนุสัญญาได้เคยส่งตัวอย่างชิ้นเนื้อสัตว์ป่าของกลาง คือชิ้นเนื้อเสือ 17 ตัวอย่าง และสำนักงานอธิบดีกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ได้ส่งตัวอย่างหนังเสือ 6 ตัวอย่าง รายละเอียดแสดงดัง ตารางที่ 25.1 มาให้สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช เพื่อตรวจหารหัสพันธุกรรมนั้นในการนี้สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืชได้มอบหมายให้ ข้าพเจ้าซึ่งขณะนั้นทำหน้าที่หัวหน้ากลุ่มงานพันธุกรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่ง Changtragoon and Singthong (2012) และ Changtragoon (2012) ได้ทำการศึกษาวิจัยพันธุกรรมของตัวอย่างดังกล่าว ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์โดยถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนในไมโทคอนเดรีย 7 ชิ้นส่วนของยีนเพื่อจำแนกชนิดพันธุ์และกลุ่มของเสือ (subspecies) และ Changtragoon and Maklang (2010) และ สุจิตรา และพิชญกร (2552) ใช้ไมโครแซทเทลไลท์มาร์คเกอร์ เพื่อวินิจฉัยจำนวนตัวของตัวอย่างแต่ละชนิด

วิธีการวินิจฉัยพันธุกรรม

การถอดรหัสพันธุกรรมมีวิธีการ ดังนี้

ได้มีการนำตัวอย่างเนื้อและหนังเสือมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีน (PCR, polymerase chain reaction) ด้วยไพรเมอร์ซึ่งเป็นยีนในไมโทคอนเดรียจากการศึกษาของ Lou *et al.* (2004) ด้วย Primer ID [1] C1494F/T1936R (ND6; NADH dehydrogenase subunit 6) [2] C2339F/T2893R (CytB; cytochrome b) [3] L14724/HCAT (CytB; cytochrome b) Cracraft *et al.* (1998) [4] CR-UPF/CR-R2B (CR: control region)[5] C8276F/T8620R (ND1; NADH dehydrogenase subunit 1) [6] T8942F/C9384R (ND2; NADH dehydrogenase subunit 2) และ [7] C9366F/T9882R (ND2; NADH dehydrogenase subunit 2) และเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนเข้ากับพลาสมิดใช้ชุด pGEM-T Easy Vector System I kit (Promega, USA) ซึ่งมาพร้อมกับพลาสมิด pGEM-Teasy vector และถ่ายยีนเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน (host) เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม โดยวิธี $CaCl_2$ heat shock transformation (Sambrook *et al.*, 1989) หลังจากนั้นตรวจยืนยันชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนที่อยู่ในพลาสมิดสายผสม หลังจากเพิ่มปริมาณในเซลล์เจ้าบ้านโดยใช้วิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ และสกัดแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด High Pure Plasmid Isolation Kit จาก Roche ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษา จากหลักการของวิธี Chain termination method ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) โดยทำพีซีอาร์ซึ่งจะติดฉลากด้วย ฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ ไป ทำให้บริสุทธิ์ และนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล gene bank ของโลกที่มีอยู่ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Changtragoon and Singthong, 2010a และ Changtrafgoon, 2012)

ตารางที่ 25.1 ตัวอย่างเชื้อที่รับมาศึกษา

ตัวอย่างที่รับมา	ลำดับของตัวอย่าง	รหัสยของตัวอย่าง
ชิ้นเนื้อหมายเลข 1	ตัวอย่างที่ 1	pan 1
ชิ้นเนื้อหมายเลข 2	ตัวอย่างที่ 2	pan 2
ชิ้นเนื้อหมายเลข 3	ตัวอย่างที่ 3	pan 3
ชิ้นเนื้อหมายเลข 4	ตัวอย่างที่ 4	pan 4
ชิ้นเนื้อหมายเลข 5	ตัวอย่างที่ 5	pan 5
ชิ้นเนื้อหมายเลข 6	ตัวอย่างที่ 6	pan 6
ชิ้นเนื้อหมายเลข 7	ตัวอย่างที่ 7	pan 7
ชิ้นเนื้อหมายเลข 8	ตัวอย่างที่ 8	pan 8
ชิ้นเนื้อหมายเลข 9	ตัวอย่างที่ 9	pan 9
ชิ้นเนื้อหมายเลข 10	ตัวอย่างที่ 10	pan 10
ชิ้นเนื้อหมายเลข 11	ตัวอย่างที่ 11	pan 11
ชิ้นเนื้อหมายเลข 12	ตัวอย่างที่ 12	pan 12
ชิ้นเนื้อหมายเลข 13	ตัวอย่างที่ 13	pan 13
ชิ้นเนื้อหมายเลข 14	ตัวอย่างที่ 14	pan 14
ชิ้นเนื้อหมายเลข 15	ตัวอย่างที่ 15	pan 15
ชิ้นเนื้อหมายเลข 16	ตัวอย่างที่ 16	pan 16
ชิ้นเนื้อหมายเลข 17	ตัวอย่างที่ 17	pan 17
หนังสือหมายเลข 18	ตัวอย่างที่ 18	pan 18
หนังสือหมายเลข 19	ตัวอย่างที่ 19	pan 19
หนังสือหมายเลข 20	ตัวอย่างที่ 20	pan 20
หนังสือหมายเลข 21	ตัวอย่างที่ 21	pan 21
หนังสือหมายเลข 22	ตัวอย่างที่ 22	pan 22
หนังสือหมายเลข 23	ตัวอย่างที่ 23	pan 23

การศึกษา DNA fingerprinting มีวิธีการดังนี้

ได้มีการนำตัวอย่างเนื้อและหนังสือ มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNeasy Tissue Kit (250) จาก QIAGEN แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีน (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ ไพรเมอร์ 9 คู่จาก Menotti-Raymond *et al.* (1999) ดังนี้ Fca032 Fca043 Fca044 Fca077 Fca094 Fca212 Fca304 Fca441 และ Fca453 ต่อจากนั้นจึงแยกชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ตัวกลางชนิด non-denaturing polyacrylamide gel ภายใต้อุปกรณ์ Gel-scan 3000 ที่ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ 6 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.6X

TBE buffer ที่ผสมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ผ่านกระแสไฟฟ้า 1,000 โวลต์ นาน 45 นาที เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 bp ในการวิเคราะห์ผลนั้นวิเคราะห์ข้อมูลไมโครแซทเทลไลต์ โดยคำนวณหา ค่าเฮตเตอโรไซโกซิตี (heterozygosity) โดยใช้โปรแกรม TFPGA (Miller, 1997) และจัดแผนผังความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรม (สุจิตรา และพิชญกร, 2552 และ Changtragoon, 2012)

ผลการศึกษาวิจัย : การถอดรหัสพันธุกรรม

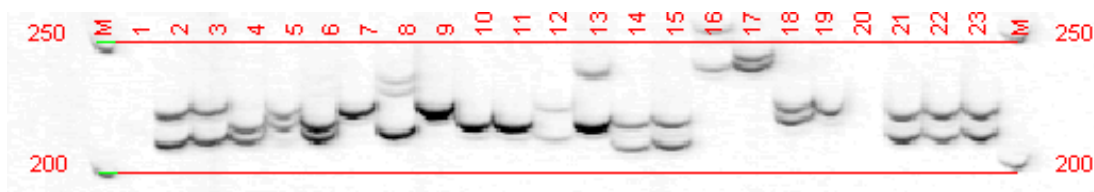
ผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนไมโทคอนเดรีย จากตัวอย่างชิ้นเนื้อ 17 ตัวอย่าง พบว่า 12 ตัวอย่างเป็นชิ้นเนื้อเสือโคร่ง (*Panthera tigris*) 3 ตัวอย่าง เป็นเสือดาว (*Panthera pardus*) และ 2 ตัวอย่างเป็นเสีอลายเมฆ (*Neofelis nebulosa*) รายละเอียดแสดงดังภาพที่ 25.2 โดยที่ชิ้นเนื้อเสือโคร่ง 12 ตัวอย่าง ได้ถูกถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนไมโทคอนเดรีย 7 ชิ้นส่วนของยีนโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ที่ทำการศึกษาโดยรายงานของ Lou *et al.* (2004) และ Cracraft *et al.* (1998) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ Amur Tiger (*Panthera tigris altaica*), Indochinese Tiger (*P. t. corbetti*) และ Malayan Tiger (*P. t. jacksoni*) รายละเอียดศึกษาเพิ่มเติมได้จาก Changtragoon and Singthong (2010a) และ Changtragoon (2012)



ภาพที่ 25.2 แสดงการจำแนกเสือโดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนไมโทคอนเดรียโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่ทำการศึกษารายงานของ Cracraft *et al.* (1998) โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี Neighbor-joining (NJ) tree และ Bootstrap test สามารถจำแนกเสือออกเป็น 3 ชนิด คือ เสือโคร่ง (*Panthera tigris*) เสือดาว (*Panthera pardus*) เสือลายเมฆ (*Neofelis nebulosa*) (ที่มา: Changtragoon and Singthong, 2010a; สุจิตรา และ กิตติยา, 2552)

ผลการศึกษา DNA fingerprinting

จากการศึกษาโดยวิธี ไมโครแซทเทลไลท์ มาร์คเกอร์ เพื่อศึกษา DNA fingerprinting ของชิ้นเนื้อเสือ 17 ชิ้น ดังภาพที่ 25.3 และนำมาวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม (genotypes) ด้วยวิธีการไมโครแซทเทลไลท์ มาร์คเกอร์ 9 ตำแหน่ง พบว่า ชิ้นเนื้อทั้ง 17 ชิ้น เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลได้จำนวนเสือโคร่งทั้งหมด 9 ตัว โดยตัวอย่างชิ้นเนื้อเสือที่ 2 และตัวอย่างชิ้นเนื้อเสือที่ 3 เป็นเสือโคร่งตัวเดียวกัน ตัวอย่างชิ้นเนื้อเสือที่ 7 และตัวอย่างชิ้นเนื้อเสือที่ 9 เป็นเสือโคร่งตัวเดียวกัน ตัวอย่างชิ้นเนื้อเสือที่ 10 ตัวอย่างเสือชิ้นเนื้อที่ 11 เป็นเสือโคร่งตัวเดียวกัน ตัวอย่างชิ้นเนื้อเสือดาว 3 ตัวอย่าง เมื่อนำมาวิเคราะห์ได้จำนวนเสือดาว 3 ตัว และตัวอย่างชิ้นเนื้อเสीलายนเมฆ 2 ตัวอย่าง เมื่อนำมาวิเคราะห์ได้เสीलายนเมฆ 2 ตัว ดังตารางที่ 25.2 และภาพที่ 25.4



ภาพที่ 25.3 แสดงรูปจีโอไทป์ของดีเอ็นเอที่เกิดจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง FCA – 453

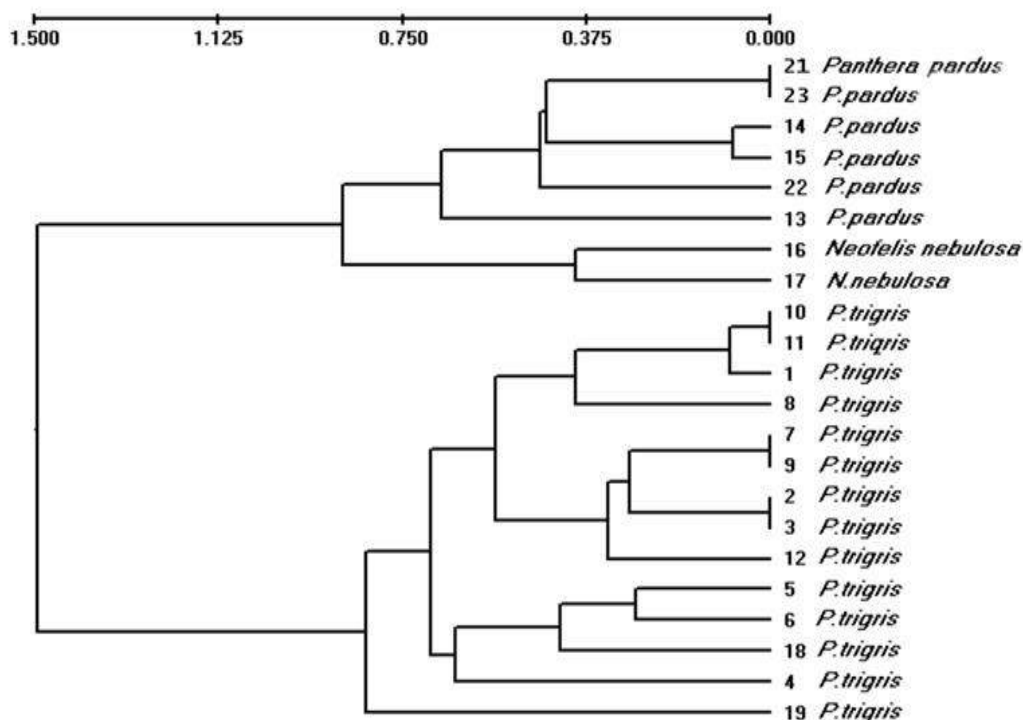
ของตัวอย่างเสือ 23 ตัวอย่าง แถวที่ 1 – 12 คือ เสือโคร่ง แถวที่ 13 – 15 คือ เสือดาว แถวที่ 16 – 17 คือ เสीलายนเมฆ แถวที่ 18 – 19 คือ เสือโคร่ง แถวที่ 21 – 23 คือ เสือดาว แถวที่ 20 คือ ตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แถว M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 ladder (ที่มา: สุจิตรา และพิชญกร)

ตารางที่ 25.2 ลักษณะทางพันธุกรรม (genotypes) ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ 9 ตำแหน่งในเสือโคร่ง เสือดาว และเสือลายเมฆ

จำนวน ตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	ชื่อ	ชนิดพันธุ์	SSR Loci											
				Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca
				032	043	044	077	094	212	304	441	453			
1	Tissue	Tiger	<i>Panthera tigris</i>	22	24	24	33	33	56	0	46	12			
2	Tissue	Tiger	<i>P. tigris</i>	11	24	24	33	33	35	35	45	12			
3	Tissue	Tiger	<i>P. tigris</i>	11	24	24	33	33	35	35	45	12			
4	Tissue	Tiger	<i>P. tigris</i>	11	24	12	44	34	35	34	36	23			
5	Tissue	Tiger	<i>P. tigris</i>	11	24	33	34	13	35	45	55	33			
6	Tissue	Tiger	<i>P. tigris</i>	12	22	34	33	13	35	34	56	33			
7	Tissue	Tiger	<i>P. tigris</i>	11	34	34	33	23	56	55	46	12			
8	Tissue	Tiger	<i>P. tigris</i>	22	24	34	34	33	0	36	36	23			
9	Tissue	Tiger	<i>P. tigris</i>	11	34	34	33	23	56	55	46	12			
10	Tissue	Tiger	<i>P. tigris</i>	12	24	34	33	33	56	44	46	12			
11	Tissue	Tiger	<i>P. tigris</i>	12	24	34	33	33	56	44	46	12			
12	Tissue	Tiger	<i>P. tigris</i>	11	24	33	33	22	35	35	45	12			
13	Tissue	Leopard	<i>P.pardus</i>	33	11	24	11	22	12	46	45	23			
14	Tissue	Leopard	<i>P.pardus</i>	33	12	24	22	22	12	41	33	13			
15	Tissue	Leopard	<i>P.pardus</i>	33	22	24	22	22	12	41	33	23			
16	Tissue	Clouded Leopard	<i>Neofelis nebulosa</i>	33	11	44	22	55	36	66	11	33			
17	Tissue	Clouded Leopard	<i>N. nebulosa</i>	33	22	34	22	45	45	67	11	13			
18	Skin	Tiger	<i>P. tigris</i>	22	24	34	44	13	36	45	45	33			
19	Skin	Tiger	<i>P. tigris</i>	33	24	33	44	33	0	55	36	12			
20*	Skin	Tiger	<i>P. tigris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
21	Skin	Leopard	<i>P. pardus</i>	33	22	24	22	33	12	24	22	23			
22	Skin	Leopard	<i>P. pardus</i>	33	12	24	33	22	12	24	22	13			
23	Skin	Leopard	<i>P. pardus</i>	33	22	24	22	33	12	24	22	23			

*ไม่สามารถทำการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยกระบวนการ PCR (Polymerase Chain Reaction)

ที่มา: Changtragoon and Maklang, 2010; สุจิตรา และ พิษณุกร, 2552



ภาพที่ 25.4 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเสือโคร่ง เสือดาว เสือลายเมฆ จากการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม TFPGA version 1.3 (ที่มา: สุจิตรา และ พิษณุกร, 2552)

สรุปผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนในไมโทคอนเดรีย จากตัวอย่างหนังเสือ 6 ตัวอย่าง พบว่าเป็นหนังเสือโคร่ง 3 ตัวอย่าง และหนังเสือดาว 3 ตัวอย่าง ซึ่งผลที่วิเคราะห์ได้ไม่ตรงกับข้อมูลที่ได้รับตัวอย่างที่ได้รายงานว่าเป็นหนังเสือโคร่ง 5 ตัวอย่าง และหนังเสือดาว 1 ตัวอย่าง โดยที่หนังเสือโคร่ง 3 ตัวอย่าง ได้ถูกถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนในไมโทคอนเดรีย 7 ชิ้นส่วนของยีน โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่ทำการศึกษาโดยรายงานของ Lou *et al.* (2004) ได้เป็นกลุ่ม Indochinese Tiger (*P. t. corbetti*) ส่วนผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อศึกษา DNA fingerprinting เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเสือและนำมาวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม (genotypes) ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 9 ตำแหน่ง พบว่าตัวอย่างของหนังเสือ 6 ตัวอย่าง เป็นหนังเสือโคร่ง 2 ตัว และหนังเสือดาว 2 ตัว โดยหนังเสือดาวตัวอย่างที่ 21 และ 23 เป็นหนังเสือดาวตัวเดียวกันแสดงรายละเอียดดังภาพที่ 5 อย่างไรก็ตามในการศึกษาการถอดรหัสพันธุกรรมขึ้นเนื้อเสือโคร่งตัวอย่างที่ 4 และหนังเสือโคร่งตัวอย่างที่ 20 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน ต้องรอการยืนยันในอนาคตต่อไปว่าทั้งสองตัวอย่างเป็นเสือโคร่งตัวเดียวกัน หรือคนละตัว เนื่องจากตัวอย่างหนังที่ 20 ไม่

สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อศึกษา DNA fingerprinting ด้วยเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์

ผลจากการศึกษาทั้ง 2 วิธี โดยวิธีถอดรหัสพันธุกรรมและการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ดังนี้ ขึ้นเนื้อ 17 ตัวอย่าง เป็น เสือโคร่ง (*Panthera tigris*) จำนวน 9 ตัวโดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม (subspecies) คือเสือโคร่งกลุ่ม Indochinese Tiger (*Panthera tigris corbetti*) 4 ตัว, Amur Tiger (*P. t. altaica*) 2 ตัว , Malayan Tiger (*P. t. jacksoni*) 3 ตัว เสือดาว (*Panthera pardus*) 3 ตัว และเสีอลายเมฆ (*Neofelis nebulosa*) 2 ตัว ส่วนหนังเสือ 6 ตัวอย่าง เป็น เสือโคร่ง 2 ตัว คือ subspecies Indochinese Tiger (*P. t. corbetti*) เสือดาว 2 ตัว (*Panthera pardus*) ทั้งนี้เมื่อรวมตัวอย่างขึ้นเนื้อและหนังเสือที่รับมาทำการศึกษาวิจัย สามารถสรุปได้ว่ามีเสือโคร่งทั้งหมด 11 ตัว เสือดาว 5 ตัว และเสีอลายเมฆ 2 ตัว รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 25.3 (สุจิตรา และ พิษณุกร , 2552 ; Changtragoon and Maklang, 2010; Changtragoon and Singthong, 2010a; Changtragoon, 2012)

ตารางที่ 25.3 สรุปผลการวิเคราะห์จำแนกชนิดเสือและกลุ่มของเสือโคร่งจากการถอดรหัสพันธุกรรมโดยใช้ 7 ชิ้นส่วนของยีน

จำนวนตัวอย่างที่รับ	จำนวนตัวที่วิเคราะห์ได้	ชื่อวิทยาศาสตร์	common name
ขึ้นเนื้อ 17 ตัวอย่าง (Pan 1 – Pan 17)	เสือโคร่ง 9 ตัว	1. <i>Panthera tigris altaica</i>	Amur Tiger
		2. <i>P. t. altaica</i>	Amur Tiger
		3. <i>P. t. corbetti</i>	Indochinese Tiger
		4. <i>P. t. corbetti</i>	Indochinese Tiger
		5. <i>P. t. corbetti</i>	Indochinese Tiger
		6. <i>P. t. corbetti</i>	Indochinese Tiger
		7. <i>P. t. jacksoni</i>	Malayan Tiger
		8. <i>P. t. jacksoni</i>	Malayan Tiger
		9. <i>P. t. jacksoni</i>	Malayan Tiger
	เสือดาว 3 ตัว	1. <i>P. pardus</i>	leopard
		2. <i>P. pardus</i>	leopard
		3. <i>P. pardus</i>	leopard
	เสีอลายเมฆ 2 ตัว	1. <i>Neofelis nebulosa</i>	Clouded Leopard
		2. <i>Neofelis nebulosa</i>	Clouded Leopard
หนังเสือ 6 ตัวอย่าง (Pan 18-Pan 23)	เสือโคร่ง 2 ตัว	1. <i>P. t. corbetti</i>	Indochinese Tiger
		2. <i>P. t. corbetti</i>	Indochinese Tiger
		3. <i>P. t. corbetti</i>	Indochinese Tiger
	เสือดาว 2 ตัว	1. <i>P. pardus</i>	leopard
		2. <i>P. pardus</i>	leopard

ที่มา: สุจิตรา และ พิษณุกร, 2552

กรณีศึกษาที่ 3: งาช้าง การจำแนกชนิดพันธุ์สายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์งาช้างของกลางโดยการถอดรหัส

พันธุกรรม

คำนำ

ตามที่ได้รับตัวอย่างผลิตภัณฑ์งาช้างของกลาง คือ ผลิตภัณฑ์งาช้างแกะสลัก 7 ตัวอย่างและรกช้าง รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 25.4 มาให้สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช เพื่อตรวจหารหัสพันธุกรรม นั้นในการนี้สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืชได้มอบหมายให้ ข้าพเจ้าทำหน้าที่หัวหน้ากลุ่มงาน พันธุกรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพในขณะนั้นทำการศึกษาวิจัยพันธุกรรมของตัวอย่างดังกล่าว ซึ่ง Changtragoon and Singthong (2010b) ได้ทำการวิเคราะห์โดยถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนใน ไมโทคอนเดรีย 4 ชิ้นส่วนของยีนเพื่อจำแนกชนิดพันธุ์และกลุ่มของงาช้าง (subspecies)

วิธีการวินิจฉัยพันธุกรรม

การถอดรหัสพันธุกรรมมีวิธีการดังนี้

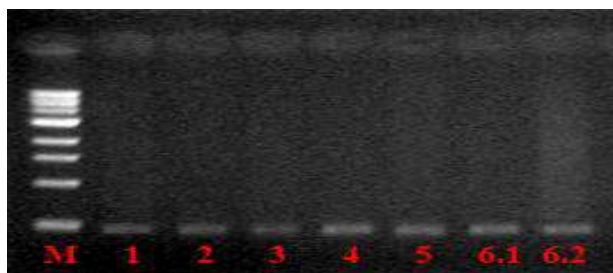
ได้นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์งาช้างมาทำการกำจัดแคลเซียม (decalcification) โดยเริ่มจากการบด ตัวอย่างผลิตภัณฑ์งาช้างให้ละเอียด นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์งาช้างที่บดละเอียด 200 mg+EDTA 1ml vortex จนละลาย (ประมาณ 2 นาที) เขย่าที่ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น centrifuge 9000 g 10 นาที 21 องศาเซลเซียสแล้วทิ้งส่วนใส ทำซ้ำอีก 2 รอบ จากนั้นเติม dH₂O 1ml vortex centrifuge 9000 g 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใส ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์งาช้างที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมแล้วมาสกัด ดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีน (PCR, polymerase chain reaction) ด้วยไพรเมอร์ ซึ่งเป็นยีนในไมโทคอนเดรียจากการศึกษาของ Lei *et al.*, 2008 ดังแสดงในภาพที่ 25.5 และเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนเข้ากับ พลาสมิดใช้ชุด pGEM-T Easy Vector System I kit (Promega, USA) ซึ่งมาพร้อมกับพลาสมิด pGEM-Teasy vector และถ่ายยีนเข้าสู่แบคทีเรีย เจ้าบ้าน (host) เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม โดยวิธี CaCl₂ heat shock transformation (Sambrook *et al.*, 1989) หลังจากนั้นตรวจยืนยันชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนที่อยู่ในพลาสมิดสายผสม หลังจากเพิ่มปริมาณในเซลล์เจ้าบ้านโดยใช้วิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ และสกัดแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด High Pure Plasmid Isolation Kit จาก Roche ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษา จากหลักการของวิธี Chain termination method ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) โดยทำพีซีอาร์ซึ่งจะติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) ภาพที่ 25.6 แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ กับฐานข้อมูล gene bank ของโลกที่มีอยู่ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Changtragoon and Singthong, 2010b; Changtragoon, 2012)

ตารางที่ 25.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์งาช้างจากที่รับมาศึกษา

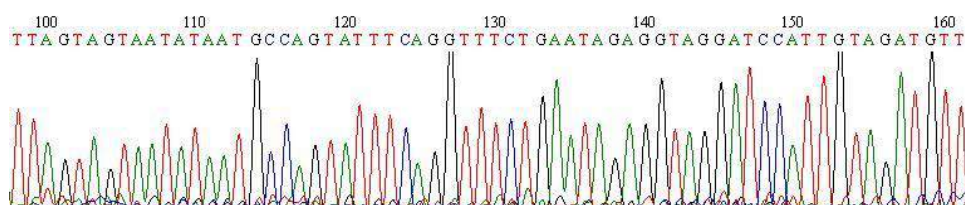
ตัวอย่างที่รับมา	ลำดับของตัวอย่าง	รหัสย่อของตัวอย่าง
พระพุทธรูป(1)	ตัวอย่างที่ 1	1
พระพิฆเนศ	ตัวอย่างที่ 2	2
พระพุทธรูป(2)	ตัวอย่างที่ 3	3
สร้อยคอ	ตัวอย่างที่ 4	4
กำไลข้อมือ	ตัวอย่างที่ 5	5
ไม้กางเขน(1)	ตัวอย่างที่ 6	6.1
ไม้กางเขน(2)	ตัวอย่างที่ 7	6.2

ผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนไมโทคอนเดรีย คือ cytochrome b ,control region และ ND5 พบว่า ในยีน control region และ ND5 มี species specific variable site น้อยกว่าในยีน cytochrome b Changtragoon and Singthong (2010b) และ Changtragoon (2012) จึงเลือกใช้ยีน cytochrome b ในการวิเคราะห์ผล และพบว่า จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์งาช้าง 7 ตัวอย่าง และ รกช้างจาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ ดังแสดงในภาพที่ 25.7 ได้แสดงรหัสพันธุกรรมของงาช้างที่ศึกษา โดยพบว่า 5 ตัวอย่างเป็นงาช้างเอเชีย (*Elephas Maximus*) ซึ่ง 5 ตัวอย่างประกอบไปด้วยพระพุทธรูป 1, 2 พระพิฆเนศ สร้อยคอ กำไลข้อมือและ รกช้าง และ 2 ตัวอย่าง คือ ไม้กางเขน 1,2 เป็นงาช้างแอฟริกัน (*Loxodonta cyclotis*) และมี species specific variable site ของช้างเอเชียมีทั้งหมด 15 ตำแหน่ง species specific variable site ของช้างแอฟริกา (Forest elephant) *Loxodonta africana* 14 ตำแหน่ง species specific variable site มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบ point mutation ในรูปแบบ transitions คือมีการแทนที่เบส purine ด้วย เบส purine หรือ แทนที่เบส pyrimidine ด้วยเบส pyrimidine เช่น A ↔ G และ C ↔ T รายละเอียดสามารถศึกษาได้จาก (Changtragoon, 2012)



ภาพที่ 25.5 PCR product ขนาด 500 bp ของยีน Cytochrome b โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 25.6 ตัวอย่าง Electropherogram จากการหาลำดับเบสจาก PCR product ใน Cytochrome B

	10	20	30	40	
<i>Loxodonta cyclotis</i> isolate C9	C G C C T C C C T C	C C T A A T C A C C	C T T C T T A A C C	C C T C C T A T T G	A
6					
7					
<i>Loxodonta cyclotis</i> isolate C3					
<i>Loxodonta cyclotis</i> isolate C6					
<i>Loxodonta africana</i> elephant2	T . T C T T . T	. G	T . . . C C . G T	 C .	G
<i>Loxodonta africana</i> elephant1	T . T C T T . T	. G	T . . . C C . G T	 C .	G
<i>Mammuthus primigenius</i> isolate		T . . . C T	. C C T . T . .	. . A A T . G C	
<i>Mammuthus primigenius</i> isolate		T . . . C T	. C C T . T . .	Y . A A T . G C	
<i>Elephas maximus</i> indicus countr	. A T T C	. T . C G G . . . T T	 T T T . .	. C . . . A	
<i>Elephas maximus</i> indicus countr	. A T T C	. T . C G G . . . T T	 N T T T . .	. C . . . A	N
<i>Elephas maximus</i> indicus countr	. A T T C	. T . C G G . . . T T	 N N . . .	. C . . . A	N
<i>Elephas maximus</i> indicus countr	. A T T C	. T . C G G . . . T T	 T T T . .	. C . . . A	
2	. A T T C	. T . C G G . . . T T	 T T T . .	. C . . . A	
4	. A T T C	. T . C G G . . . T T	 T T T . .	. C . . . A	
<i>Elephas maximus</i> indicus countr	. A T T C	. T . C G G . . . T T	 T T T . .	. C . . . A	
1	. A T T C	. T . C G G . . . T T	 T T T . .	. C . . . A	
3	. A T T C	. T . C G G . . . T T	 T T T . .	. C . . . A	
5	. A T T C	. T . C G G . . . T T	 T T T . .	. C . . . A	

ช้างแอฟริกา (*Loxodonta cyclotis*)ช้างแอฟริกา (*Loxodonta africana*)แมมมอธ (*Mammuthus primigenius*)ช้างเอเชีย (*Elephas maximus*)

ภาพที่ 25.7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น variable site ของผลิตภัณฑ์ทั้งช้างเอเชีย 15 ตำแหน่ง
เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ช้างแอฟริกา

สรุปผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

ผลจากการศึกษาโดยวิธีถอดรหัสพันธุกรรม จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ช้างแอฟริกา 7 ตัวอย่าง พบว่า 5 ตัวอย่างคือ พระพุทธรูป (1) พระพิฆเนศ, พระพุทธรูป (2) สร้อยคอและกำไลข้อมือเป็นช้างเอเชีย *Elephas Maximus* (Asiatic elephant) และอีก 2 ตัวอย่างคือ ไม้กางเขน 1 และ 2 เป็นช้างแอฟริกา *Loxodonta cyclotis* (forest elephant) (Changtragoon and Singthong 2010b; Changtragoon, 2012)

กรณีศึกษาที่ 4: การจำแนกชนิดพันธุ์ของตัวอย่างชิ้นเนื้อโดยการถอดรหัสพันธุกรรม

บทนำ

ด้วยกองคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าตามอนุสัญญา ที่ ทส 0902.3/1199 เรื่อง ขอความ
อนุเคราะห์ตรวจพิสูจน์ทางพันธุกรรมชิ้นเนื้อสัตว์ป่าจากประเทศกัมพูชา ซึ่งได้รับการประสานจากสำนักงาน
เครือข่ายการป้องกันและปราบปรามการค้าสัตว์ป่าและพืชป่าที่ผิดกฎหมายในภูมิภาคอาเซียน (ASEAN-
WEN) ขอความอนุเคราะห์ตรวจชิ้นเนื้อสัตว์ป่าต้องสงสัยที่ Management Authority of Cambodia ส่ง
มายังสำนักงาน ASEAN-WEN ว่าเป็นชิ้นเนื้อของสัตว์ป่าชนิดพันธุ์ใด และเพื่อความสัมพันธ์อันดีและเป็น
ความร่วมมือในการบังคับใช้กฎหมายระหว่างประเทศในการดำเนินการให้เป็นไปตามพันธกรณีแห่ง
อนุสัญญา CITES จึงได้ทำการส่งตัวอย่างชิ้นเนื้อสัตว์ป่าต้องสงสัย คือ ชิ้นเนื้อ 1 ตัวอย่างดังแสดงในภาพที่
25.8 มาให้สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช เพื่อตรวจหารหัสพันธุกรรมนั้น ในการนี้สำนักวิจัยการ

อนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืชได้มอบหมายให้ โดยข้าพเจ้าทำหน้าที่หัวหน้ากลุ่มงานพันธุ์กรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพในขณะนั้น ทำการศึกษาวิจัยพันธุ์กรรมของตัวอย่างดังกล่าว ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์โดยถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนใน ไมโทคอนเดรีย คือ cytochrome b ขนาด 650 bp และ D-loop ขนาด 320 bp ในตัวอย่างชิ้นเนื้อได้สำเร็จ แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับ นิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล gene bank อยู่ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสปีชีส์ของสัตว์แต่ละชนิดโดยผ่านโปรแกรม Bioedit, DnaSP4.0 และ Mega 3.1 ผลการศึกษาสามารถสรุปการศึกษาได้ดังนี้ ชิ้นเนื้อ 1 ตัวอย่าง เป็นควาย Water buffalo (*Bubalus bubalis*)



ภาพที่ 25.8 แสดงตัวอย่างชิ้นเนื้อสัตว์ป่าต้องสงสัย

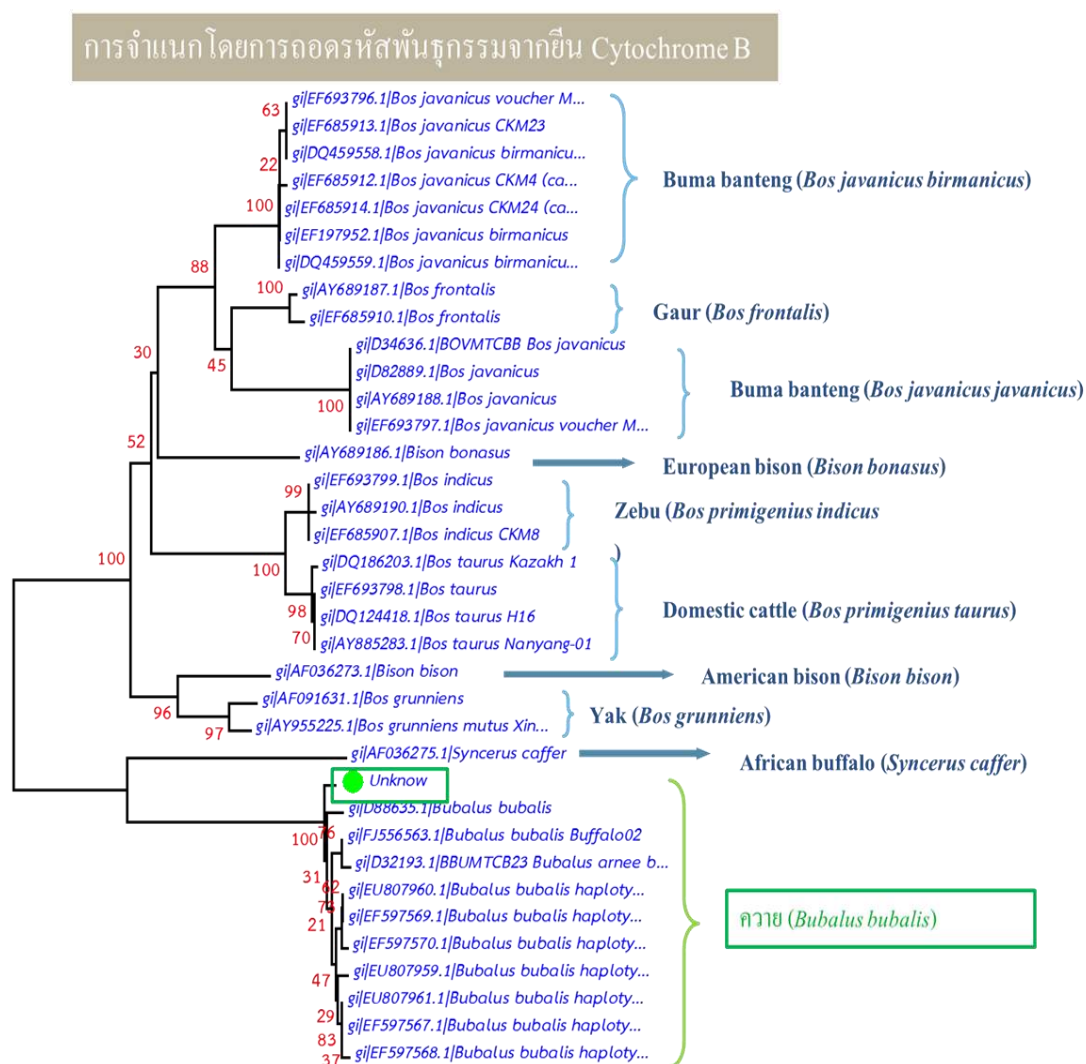
วิธีการวินิจฉัยพันธุ์กรรม

สกัด DNA จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ป่า ด้วยชุดสกัด DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ ซึ่งเป็นยีนในไมโทคอนเดรีย ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษา จากหลักการของวิธี Chain termination method ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) โดยทำพีซีอาร์ซึ่งจะติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ ไป ทำให้บริสุทธิ์ และนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับ นิวคลีโอไทด์ กับฐานข้อมูล gene bank ของโลกที่มีอยู่ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

ผลการวินิจฉัยพันธุ์กรรม

จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการ DNA กลุ่มงาน พันธุ์กรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืชสามารถสกัด DNA และถอดรหัสพันธุกรรมจากตัวอย่างหนังสัตว์ป่าได้เป็นผลสำเร็จ ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสามารถ

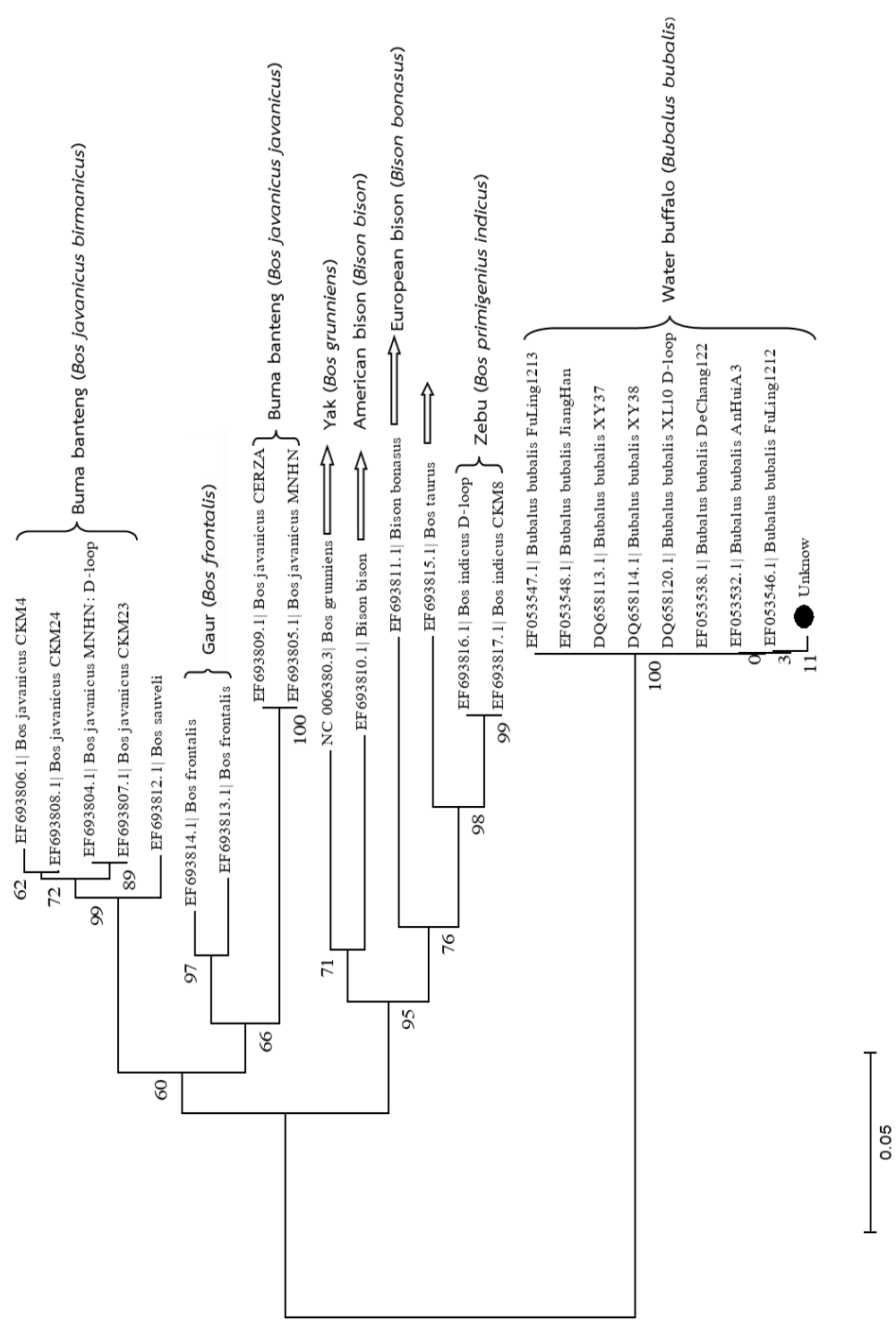
นำไปศึกษาในการจำแนกชนิดของสัตว์ป่าที่ศึกษา และจากผลการศึกษาพบว่าจากการวิเคราะห์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนในไมโทคอนเดรีย คือ cytochrome b ขนาด 650 bp และ D-loop ขนาด 320 bp พบว่าจากตัวอย่างชิ้นเนื้อสัตว์ป่าต้องสงสัย 1 ตัวอย่าง เป็น ควาย Water buffalo (*Bubalus bubalis*) รายละเอียดแสดงดังภาพที่ 25.9 และ 25.11 และพบว่า species specific variable nucleotide site ของควาย Water buffalo (*Bubalus bubalis*) ในยีน cytochrome b มีทั้งหมด 14 ตำแหน่งแสดงดังภาพที่ 25.10 และ D-loop มี species specific variable nucleotide site ของควาย Water buffalo (*Bubalus bubalis*) ทั้งหมด 28 ตำแหน่ง แสดงดังภาพที่ 25.12 species specific variable site มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบ point mutation ในรูปแบบ transitions คือมีการแทนที่เบส purine ด้วยเบส purine หรือแทนที่เบส pyrimidine ด้วยเบส pyrimidine เช่น $A \leftrightarrow G$ และ $C \leftrightarrow T$ และมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบ point mutation ในรูปแบบ transversion คือมีการแทนที่เบส purine ด้วยเบส pyrimidine หรือแทนที่เบส pyrimidine ด้วยเบส purine เช่น $A \leftrightarrow T$, $C \leftrightarrow G$, $A \leftrightarrow C$ และ $T \leftrightarrow G$



ภาพที่ 25.9 แสดงการจำแนกโดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีน Cytochrome B ในตัวอย่างของกลางและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับควายและควายป่าจากฐานข้อมูล NCBI โดยวิธี Neighbor-joining (NJ) tree และ Bootstrap test

<i>Bos javanicus_voucher_M...</i>	A	T	A	A	A	C	A	C	A	A	A	C	A	A	T	C	C	A	C	C	A	A	A	A	C	C	G	C	C	C
<i>Bos javanicus_birmanicu...</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Bos javanicus_CKM23</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Bos javanicus_CKM4_(ca...</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Bos javanicus_birmanicu...</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Bos javanicus_birmanicus</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Bos javanicus_CKM24_(ca...</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Bos sauveli</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Bos frontalis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.
<i>Bos frontalis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.
<i>Bos javanicus</i>	.	.	.	G	.	.	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.
<i>Bos javanicus_voucher_M...</i>	.	.	.	G	.	.	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.
<i>Bos javanicus</i>	.	.	.	G	.	.	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.
<i>Bos javanicus</i>	.	.	.	G	.	.	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.
<i>Bison bonasus</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	G	.	T	.	.	.	.	T	T
<i>Bos indicus</i>	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Bos indicus</i>	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Bos indicus_CKM8</i>	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Bos taurus_Kazakh_1</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
<i>Bos taurus_H16</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
<i>Bos taurus_Nanyang-01</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
<i>Bos taurus</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
<i>Bison bison</i>	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Bos grunniens</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	GG	.	.	.
<i>Bos grunniens</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	GG	.	.	.
<i>Syncerus caffer</i>	.	C	.	.	.	T	.	T	.	T	.	G	.	.	T	.	.	T	T	.	T	.	T	.	.	.	.	A	.	.
<i>Unknow</i>	.	C	.	T	.	T	.	G	C	.	.	.	GT	.	.	G	.	.	.	.	T	.	TGGT	.	.	T	.	.	.	.
<i>Bubalus bubalis_Buffalo02</i>	.	C	.	T	.	T	.	G	C	.	.	.	GT	.	.	G	.	.	.	.	T	.	TGGT	.	.	T	.	.	.	.
<i>Bubalus arnee_h.</i>	.	C	.	T	.	T	.	G	C	.	.	.	GT	.	.	G	.	.	.	.	T	.	TGGT	.	.	T	.	.	.	.
<i>Bubalus bubalis</i>	.	C	.	T	.	T	.	G	C	.	.	.	GT	.	.	G	.	.	.	.	T	.	TGGT	.	.	T	.	.	.	.
<i>Bubalus bubalis_haplo...</i>	.	C	.	T	.	T	.	G	C	.	.	.	GT	.	.	G	.	.	.	.	T	.	TGGT	.	.	T	.	.	.	.
<i>Bubalus bubalis_haplo...</i>	.	C	.	T	.	T	.	G	C	.	.	.	GT	.	.	G	.	.	.	.	T	.	TGGT	.	.	T	.	.	.	.
<i>Bubalus bubalis_haplo...</i>	.	C	.	T	.	T	.	G	C	.	.	.	GT	.	.	G	.	.	.	.	T	.	TGGT	.	.	T	.	.	.	.
<i>Bubalus bubalis_haplo...</i>	.	C	.	T	.	T	.	G	C	.	.	.	GT	.	.	G	.	.	.	.	T	.	TGGT	.	.	T	.	.	.	.
<i>Bubalus bubalis_haplo...</i>	.	C	.	T	.	T	.	G	C	.	.	.	GT	.	.	G	.	.	.	.	T	.	TGGT	.	.	T	.	.	.	.
<i>Bubalus bubalis_haplo...</i>	.	C	.	T	.	T	.	G	C	.	.	.	GT	.	.	G	.	.	.	.	T	.	TGGT	.	.	T	.	.	.	.
<i>Bubalus bubalis_haplo...</i>	.	C	.	T	.	T	.	G	C	.	.	.	GT	.	.	G	.	.	.	.	T	.	TGGT	.	.	T	.	.	.	.

ภาพที่ 25.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เป็น species specific variable nucleotide site ของควาย ในยีน cytochrome B 14 ตำแหน่ง (กรอบสีเขียว)



ภาพที่ 25.11 แสดงการจำแนกโดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีน D-loop ในตัวอย่างของกลาง มาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับควายและควายป่าจากฐานข้อมูล NCBI

EF693806.1 <i>Bos javanicus</i> CKM4	TCTCAGTATT	ACCCCTTAAC	ACAAAGATAA	GATAAAATAAT	TTATATATAC	CTCAA
EF693808.1 <i>Bos javanicus</i> CKM2						
EF693804.1 <i>Bos javanicus</i> MNH						
EF693807.1 <i>Bos javanicus</i> CKM						
EF693812.1 <i>Bos sauveli</i>						
EF693814.1 <i>Bos frontalis</i>				G.....	A.....	
EF693813.1 <i>Bos frontalis</i>				G.....	A.....	
EF693809.1 <i>Bos javanicus</i> CERZ				C.....	C C.....	A.....
EF693805.1 <i>Bos javanicus</i> MNH				C.....	C C.....	A.....
NC_006380.3 <i>Bos grunniens</i>					C.....	
EF693810.1 <i>Bison bison</i>		C G.....	G.....	T.....	A.....	T.....
EF693811.1 <i>Bison bonasus</i>	TC.....	C.....	T.....	G.....	T.....	G.....
EF693815.1 <i>Bos taurus</i>					C.....	GT T.....
EF693816.1 <i>Bos indicus</i> D-loop				A.....	G.....	
EF693817.1 <i>Bos indicus</i> CKM8				A.....	G.....	
DQ658120.1 <i>Bubalus bubalis</i> X	C...TTA.GC.	GTAAACCT..	AG.C.GG.G	...GGC.C.	...G...G...	C.GG
DQ658114.1 <i>Bubalus bubalis</i> XY	C...TTA.GC.	GTAAACCT..	AG.C.GG.G	...GGC.C.	...G...G...	C.GG
DQ658113.1 <i>Bubalus bubalis</i> X	C...TTA.GC.	GTAAACCT..	AG.C.GG.G	...GGC.C.	...G...G...	C.GG
EF053546.1 <i>Bubalus bubalis</i> F	C...TTA.GC.	GTAAACCT..	AG.C.GG.G	...GGC.C.	...G...G...	C.GG
EF053538.1 <i>Bubalus bubalis</i> D	C...TTA.GC.	GTAAACCT..	AG.C.GG.G	...GGC.C.	...G...G...	C.GG
EF053532.1 <i>Bubalus bubalis</i> A	C...TTA.GC.	GTAAACCT..	AG.C.GG.G	...GGC.C.	...G...G...	C.GG
EF053548.1 <i>Bubalus bubalis</i> J	C...TTA.GC.	GTAAACCT..	AG.C.GG.G	...GGC.C.	...G...G...	C.GG
EF053547.1 <i>Bubalus bubalis</i> F	C...TTA.GC.	GTAAACCT..	AG.C.GG.G	...GGC.C.	...G...G...	C.GG
Unknow	C...TTA.GC.	GTAAACCT..	AG.C.GG.G	...GGC.C.	...G...G...	C.GG

ภาพที่ 25.12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เป็น species specific variable nucleotide site ของควาย
ในยีน D-loop

สรุปผลการวินิจฉัยพันธุกรรม

ผลจากการศึกษา วิเคราะห์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนไมโทคอนเดรีย คือ cytochrome b ขนาด 650 bp และ D-loop ขนาด 320 bp ในตัวอย่างชิ้นเนื้อได้สำเร็จ แล้วจึงวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับ นิวคลีโอไทด์ กับฐานข้อมูล gene bank อยู่ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในสัตว์แต่ละชนิดโดยผ่านโปรแกรม Bioedit , DnaSP4.0 และ Mega 3.1 ผลการศึกษาทั้ง 2 ยีนสามารถสรุปการศึกษาได้ดังนี้

ชิ้นเนื้อ 1 ตัวอย่าง เป็น ควาย Water buffalo (*Bubalus bubalis*) ไม่ใช่ควายป่าหรือสัตว์ป่า จะเห็นได้ว่า ค่านิยมการบริโภคสัตว์ป่ายังมีอยู่ในแต่ละประเทศ จึงนำเอาควายมาขายมั่วสืและทำรูปลักษณะให้เหมือนเนื้อสัตว์ป่า ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นสามารถนำไปเป็นแนวทางและขยายผลในการดำเนินการคุ้มครอง และอนุรักษ์สัตว์ป่าโดยกองคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าตามอนุสัญญา และสำนักอนุรักษ์สัตว์ป่าต่อไป

บทที่ 26

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะแนวทางในการอนุรักษ์ทรัพยากร ทางพันธุกรรมป่าไม้ การฟื้นฟูป่าและปลูกป่า และนิติวิทยาศาสตร์ป่าไม้และสัตว์ป่า

สรุปผลการศึกษาวิจัยและข้อเสนอแนะ

ความหลากหลายทางพันธุกรรม เป็นองค์ประกอบหนึ่งของความหลากหลายทางชีวภาพที่มีความสำคัญต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นในการอนุรักษ์ทรัพยากรทางชีวภาพด้านป่าไม้ที่มีประสิทธิภาพ จึงควรจะต้องมีข้อมูลสถานภาพทรัพยากรทางพันธุกรรมป่าไม้ ซึ่งสามารถสำรวจและประเมินได้โดยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดไม้ป่าและพืชป่าแต่ละชนิดเป็นองค์ประกอบสำคัญ ซึ่งเป็นพื้นฐานที่จะทำให้เกิดการวิวัฒนาการและมีโอกาสในการอยู่รอดและปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่หลากหลายและผันแปร ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงเป็นหัวใจหลักหนึ่งในการพัฒนากลยุทธ์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่น่าไปใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์ทรัพยากรทางชีวภาพด้านป่าไม้ให้มีประสิทธิภาพ

จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในไม้ป่าและพืชป่าที่เป็นตัวแทนสังคมป่าในระบบนิเวศที่หลากหลายโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและไอโซเอนไซม์ ยีน ดังได้กล่าวในบทก่อนหน้านี้ สามารถสรุปให้เห็นเป็นภาพรวมในตารางที่ 26.1 จากข้อมูลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และระบบการสืบพันธุ์ของไม้ป่า และพืชป่าบางชนิด ดังกล่าวข้างต้นจะสามารถนำมาเป็นแนวทางในการวางแผนการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมไม้ป่าและพืชป่าที่อยู่ตามระบบนิเวศของป่าชนิดต่างๆได้แตกต่างกันไป กล่าวคือหากแหล่ง (ประชากร) ใดของชนิดพันธุ์ที่ศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ก็มีความเหมาะสมที่จะถูกคัดเลือกให้เป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมในถิ่นกำเนิด เป็นต้นซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปผลการประเมินสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมในไม้ป่าและพืชป่าเพื่อเป็นข้อเสนอแนะแนวทางในการอนุรักษ์และฟื้นฟูแหล่งพันธุกรรมไม้ป่าและพืชป่าที่ศึกษาดังนี้

1. ไม้สนสองใบ (*Pinus merkusii*) จากพื้นฐานผลจากการศึกษาวิจัยดังกล่าวข้างต้น จึงได้เสนอแนะให้มีการอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุกรรมของไม้สนสองใบ (*P. merkusii*) อย่างมีประสิทธิภาพในการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิด (*In situ* conservation) ที่แหล่ง (ประชากร) ห้วยทา เนื่องจากมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งอื่น และควรคัดเลือกแหล่งสำหรับการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิดสำหรับภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงลดลงมาเช่น ที่แหล่ง(ประชากร) หมู่บ้านหนองคู จังหวัดสุรินทร์และ อำเภอโขงเจียมจังหวัดอุบลราชธานีและแหล่ง (ประชากร) ที่อยู่ทางภาคเหนือเช่น หมู่บ้านบ้านวัดจันทร์ จังหวัดเชียงใหม่

นอกจากการอนุรักษ์พันธุกรรมในถิ่นกำเนิดควรมีการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดด้วย ข้อดีในการดำเนินการดังกล่าวนี้ เนื่องจากการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดจะทำให้บริหารจัดการง่ายและช่วยทำให้มีการปลูกป่าไม้สนสองใบนอกถิ่นกำเนิดที่มีอายุใกล้เคียงกันและความหนาแน่นของต้นสูง จึงทำให้เพิ่มโอกาสที่

ตารางที่ 26.1 สรุปผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของไม้ป่า และพืชป่าบางชนิดในประเทศไทย

ชนิด (Species)	ชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ศึกษา*		ความหลากหลายทางพันธุกรรม	Genetic differentiation ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร	อัตราการผสมข้าม** (Tm)	เอกสารอ้างอิง
	เครื่องหมาย ไอโซเอนไซม์	เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ				
ไม้ป่า (<i>Bamboosa bambos</i>)		SSR (Microsatellite)	0.369	0.243		รังสัน และสุจิตรา, 2548
กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (<i>Paphiopedilum exul</i>)		AFLP	0.301	0.082		จักรพันธ์ และสุจิตรา, 2548
ไม้สนสองใบ (<i>Pinus merkusii</i>)	/		0.058	0.104	0.017-0.843	Changtragoon and Finkeldey, 1995b
ไม้สัก (<i>Tectona grandis</i>)	/	RAPD	0.310	0.217	0.872-0.995	Changtragoon and Szmidt, 1999; Changtragoon and Szmidt, 2000
ไม้โกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>)	/	AFLP	0.316	0.250	0.241-0.978	สุจิตรา, 2550
ไม้โกงกางใบใหญ่ (<i>Rhizophora mucronata</i>)		AFLP	0.385	0.212		สุจิตรา, 2550
ไม้ยางนา (<i>Dipterocarpus alatus</i>)	/		0.0924	0.182***		สุจิตราและบุญชูบ, 2542
ไม้พะยุง (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>)	/	SSR (Microsatellite)	0.39	0.128		Changtragoon, 2001b
ไม้ชิงชัน (<i>Dalbergia oliveri</i>)		SSR (Microsatellite)	0.77	0.18		สุจิตราและคณะ, 2561
				0.13		สุจิตราและคณะ, 2564

หมายเหตุ: * = เหตุที่ไม่ป่าและพืชป่าบางชนิดใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาไม่เหมือนกันนั้น เนื่องจากในวงการศึกษาพันธุศาสตร์ป่าไม้ระดับโมเลกุล เครื่องหมายโมเลกุลมีการพัฒนาให้ก้าวหน้าอยู่เสมอ ดังนั้นการศึกษาวินิจฉัยจึงมีการพัฒนาไปตามวิทยาการของโลก เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ดียิ่งขึ้นเท่าที่จะทำได้ตามช่วงเวลาในการศึกษานี้

** = ในการศึกษาอัตราการผสมข้ามกันนี้ไม้ป่าและพืชป่าบางชนิดไม่สามารถทำการศึกษาได้ เนื่องจากมีข้อจำกัดเกี่ยวกับตัวอย่างที่เก็บ ซึ่งไม่สามารถเก็บเมล็ดได้ หรือบางชนิด แม้มีตัวอย่างเมล็ดและกล้าไม้ แต่ทางเทคนิควิธีการบางอย่างไม่สามารถวิเคราะห์ได้

*** = ศึกษาทั้งป่าปลูกและป่าธรรมชาติ

ทำให้มีการออกดอกพร้อมกัน ซึ่งจะให้อัตราการผสมตัวเองลดลงกว่าในพื้นที่ธรรมชาติดั้งเดิมที่มีอายุมากแล้ว ดังนั้นจึงขอแนะนำดังนี้คือ ควรจัดทำแปลงอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด 3-6 แปลง อย่างน้อยควรมีหนึ่งแปลงในแต่ละภูมิภาคที่มีการกระจายพันธุ์ธรรมชาติของสนสองใบขึ้น กล่าวคือในภาคเหนือ ภาคกลางและตะวันออกเฉียงเหนือในการเก็บเมล็ดไม้สนสองใบนั้นควรเก็บจากประมาณ 20 ต้นจาก 3 แหล่ง (ประชากร) ที่อยู่ในภูมิภาคเดียวกัน เนื่องจากไม้สนสองใบมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจำนวนที่กล่าวจึงเพียงพอที่จะมีข้อมูลและฐานทางพันธุกรรมที่เพียงพอสำหรับการอนุรักษ์ไม้สนสองใบนอกถิ่นกำเนิดในประเทศไทย ซึ่งเมล็ดจากภูมิภาคเดียวกันควรเก็บโดยผู้ที่เป็นตัวแทนของภูมิภาคและนำมารวมกันอย่างทั่วถึง (Bulked) และปลูกเป็นแปลงปลูกนอกถิ่นกำเนิดที่มีขนาดแต่ละแปลง 6.25 ไร่ (1 เฮกเตอร์) ซึ่งควรทำ 2 แห่ง ที่ง่ายต่อการปกป้องดูแลในแต่ละภูมิภาค ดังนั้นเมื่อรวมทุกภูมิภาคแล้วควรปลูก (Changtragoon and Finkeldey, 1995a)

2. ไม้สัก (*Tectona grandis*) จากพื้นฐานข้อมูลการศึกษาวิจัยดังกล่าวข้างต้นโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (RAPD) ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าการใช้ไอโซเอนไซม์ยีนศึกษานั้น จะเห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้สักมีค่อนข้างสูง และความแตกต่างระหว่างแหล่งก็มีค่อนข้างสูงเช่นกัน ดังนั้นควรคัดเลือกสนับสนุนให้อุทยานแห่งชาติและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าที่เป็นพื้นที่อนุรักษ์และมีไม้สักขึ้นอยู่ตามธรรมชาติอยู่แล้วทุกแห่งเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมในถิ่นกำเนิดของไม้สัก จากผลการศึกษาดังกล่าวนั้นจะเห็นว่าไม้สักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ซึ่งมีสถานภาพเป็นแหล่งทรัพยากรทางพันธุกรรมของไม้สักของประเทศไทยที่หลากหลาย ดังนั้นควรที่จะมีอย่างน้อย 1 แหล่ง (ประชากร) ในแต่ละจังหวัดที่เป็นพื้นที่อนุรักษ์อยู่แล้ว ให้เป็นแหล่งอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิด โดยเฉพาะภาคเหนือ อย่างไรก็ตาม จังหวัดลำปางที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงจึงควรเลือกมากกว่า 1 แหล่ง (ประชากร) เช่น อุทยานแห่งชาติถ้ำผาไท จังหวัดลำปาง และอีกแหล่งที่อยู่นอกพื้นที่อนุรักษ์ แต่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด คือ หมู่บ้านบ้านใหม่ อำเภอมะเทะ จังหวัดลำปาง และจังหวัดอื่นๆ เช่น อำเภเทพนิมิต จังหวัดอุดรดิตถ์ อุทยานแห่งชาติลานสาง จังหวัดตาก อำเภอสอด จังหวัดเชียงใหม่ อุทยานแห่งชาติแม่ยม จังหวัดแพร่ และอำเภอมะเสเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน ในกรณีของอุทยานแห่งชาติแม่ยม จังหวัดแพร่ นั้นสมควรที่จะเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมในถิ่นกำเนิดของไม้สักในประเทศไทยด้วย ถ้าจะมีการพิจารณาสร้างเขื่อนบริเวณดังกล่าวก็ควรไต่ตรองให้รอบคอบ หากเป็นนโยบายของประเทศที่ให้ดำเนินและหลีกเลี่ยงไม่ได้ ก็ควรเก็บเมล็ดและท่อนพันธุ์จากพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่ยม โดยควรเก็บอย่างน้อย 100 ต้นขึ้นไป ที่สามารถเป็นตัวแทนฐานพันธุกรรมของแหล่ง (ประชากร) ดังกล่าวได้ และนำมาอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดโดยปลูกทั้งแบบธนาคารยีน (Gene bank) และเพาะกล้าไม้แบบแยกต้น (Families) ก่อนการคัดเลือกต้นกล้าที่เป็นตัวแทนของแต่ละต้นเพื่อเป็นตัวแทนของแหล่งดังกล่าว ในที่เหมาะสมและปลอดภัยต่อการถูกคุกคาม

อย่างไรก็ตามหากแหล่งใดล่อแหลมต่อการบุกรุกทำลายป่าก็สมควรที่จะนำมาอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดด้วย จากพื้นฐานข้อมูลการประเมินอัตราการผสมข้ามที่พบในไม้สัก พบว่ามีอัตราการผสมข้ามสูง แต่ก็ยังมีบางต้นที่มีอัตราการผสมตัวเองสูงเช่นกัน ดังนั้นในการเก็บเมล็ดไม้สักเพื่อนำมาปลูกเพื่อการอนุรักษ์ ควรเก็บแบบแยกต้นและแยกแหล่ง (ประชากร) และควรระบุปีที่เก็บด้วย เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกเมล็ด

ก่อนการปลูกรากนอกถิ่นกำเนิดเพราะเมล็ดที่มีอัตราการผสมตัวเอง หรือในหมู่เครือญาติจะทำให้โอกาสการรอดตายมีต่ำและมีความต้านทานต่อโรคและแมลงต่ำกว่าเมล็ดไม้ที่มีอัตราการผสมข้ามสูง และควรคัดเลือกเมล็ดไม้ที่มีอัตราการผสมข้ามสูงเท่านั้นไปปลูกเป็นแหล่งพันธุกรรมของไม้สักของแหล่ง (ประชากร) นั้นๆ ส่วนในไม้สักที่อยู่นอกพื้นที่อนุรักษ์ เช่น บริเวณหมู่บ้านแก่งประหลอม และหมู่บ้านวังน้ำวน จัง หวัดกาญจนบุรี ที่อยู่นอกพื้นที่อนุรักษ์ มีอยู่ปะปนกับชุมชน หมู่บ้าน และยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าที่อื่น ควรเก็บเมล็ดและท่อนพันธุ์ที่เป็นตัวแทนของแหล่งดังกล่าว แหล่ง (ประชากร) ของจังหวัดกาญจนบุรี มาปลูกเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมนอกถิ่นกำเนิดที่สามารถดูแลได้ง่าย และปลอดภัยต่อการบุกรุกทำลาย (Changtragoon and Szmidt, 1999; Changtragoon 2001a)

3. ไม้ยางนา (*Dipterocarpus alatus*) จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น จึงได้ข้อมูลเป็นแนวทางได้ว่าไม้ยางนาแต่ละแหล่ง (ประชากร) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมแตกต่างกัน แม้ลักษณะภายนอกของไม้ยางนาโดยทั่วไปไม่แตกต่างกันนักโดยมีความสูงเปลาตรง หากดูเผินๆ แล้วคิดว่าแต่ละแหล่ง (ประชากร) ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรให้ความสำคัญแหล่งพันธุกรรมของไม้ยางนาในแต่ละภูมิภาค โดยควรจัดให้มีการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิดทุกภูมิภาค และให้ความสำคัญในการอนุรักษ์แหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าค่าเฉลี่ย เช่น หมู่บ้านดงฟ้าห่วน จังหวัดอุบลราชธานี ตำบลห้วยเขย่ง อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และอำเภอคลอง จังหวัดแพร่ เป็นต้น

อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความผันแปรในแต่ละตำแหน่งสูง เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite markers: SSR) ในอนาคตเพื่อจะได้ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมมากขึ้น (สุจิตรา และบุญชูบ, 2542)

4. ไม้โก่งกาง

4.1. ไม้โก่งกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) จากผลการศึกษาข้างต้นมีข้อเสนอแนะดังนี้

1) ควรจัดทำแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมในถิ่นกำเนิดในแหล่ง (ประชากร) ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมีอัตราผสมข้ามสูงและเป็นตัวแทนของฝั่งอันดามันและฝั่งอ่าวไทย โดยใช้การกระจายไปตามระดับลองติจูด ดังนั้นในไม้โก่งกางใบเล็กควรอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมที่ จังหวัดสงขลา, อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง, อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี เกาะภูเก็ต หมู่บ้านสลักคอก เกาะช้าง และอ่าวคู้กระเบน จังหวัดจันทบุรี

2) แหล่ง (ประชากร) ของไม้โก่งกางใบเล็กที่ควรฟื้นฟูป่า คือหมู่บ้านคลองพร้าว เกาะช้าง จังหวัดตราด อำเภอเมือง จังหวัดระนอง อำเภอเมือง จังหวัดสตูล หมู่บ้านเสมชัย จังหวัดเพชรบุรี และอำเภอสวี จังหวัดชุมพร เพราะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำกว่าค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเฉลี่ย

3) ควรมีการจัดทำฐานข้อมูลการเก็บฝักไม้โก่งกางใบเล็กกว่าเก็บมาจากที่ใด เมื่อใด ปลูกเมื่อใดและมีป้ายปักอย่างชัดเจนที่ระบุรายละเอียดดังกล่าวข้างต้น

4) การเก็บฝักไม้โก่งกางใบเล็กเพื่อการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด หรือการปลูกฟื้นฟูป่า หรือปลูกป่า ควรมีการประเมินอัตราผสมข้ามของฝักไม้โก่งกางใบเล็กก่อนนำไปปลูก โดยควรเก็บแบบแยกต้นกันโดยให้

เป็นตัวแทนของแหล่ง (ประชากร) นั้นๆ และนำมาเพาะกล้าแบบแยกต้น แยกแหล่งแล้วนำตัวอย่างใบมาทำการวิเคราะห์ประเมินอัตราผสมข้าม โดยใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ที่กล่าวมาข้างต้นหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ว่าต้นใด แหล่งใด มีอัตราการผสมข้ามเท่าไร และควรเลือกฝักที่มาจากต้นและแหล่งที่มีอัตราผสมข้ามสูงเพื่อเพิ่มโอกาสในการรอดตายและการเจริญเติบโตที่ดี เมื่อคัดเลือกแล้วจึงนำกล้าไม้ที่คัดเลือกจากแหล่ง (ประชากร) มาละกันแบบสุ่มให้ทั่วถึงโดยให้อัตราส่วนของแต่ละต้นเท่าๆ กันซึ่งควรเก็บ 30 ต้นต่อแหล่งและจำนวนกล้าไม้ขึ้นอยู่กับความต้องการที่จะปลูกในพื้นที่

5) การเก็บฝักในการปลูกฟื้นฟูป่าไม้โกงกางใบเล็กควรเก็บหลายๆ ต้น อย่างน้อย 30 ต้นต่อแหล่ง โดยให้จำนวนฝักจากแต่ละต้นมีจำนวนพอๆ กัน และควรเอาฝักที่ได้จากแหล่งเดียวกันมาปลูกในพื้นที่ป่าเดียวกันไม่ควรเอาฝักจากแหล่งอื่นมาปลูกปะปนกันโดยเฉพาะไม่ควรเก็บข้ามฝั่งทะเล (ฝั่งอันดามันและฝั่งอ่าวไทย) เพราะไม้โกงกางแต่ละพื้นที่จะมีการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมเฉพาะมาเป็นเวลานานไม่ว่าจะเป็นสภาพการขึ้นลงของน้ำทะเล ความเค็มของน้ำทะเล ความลึกของดินเลน เป็นต้น หากไม่สามารถประเมินอัตราการผสมข้ามได้ตามข้อ 4 ควรเก็บฝักไม้โกงกางใบเล็กแยกต้นและเพาะกล้าไม้แยกกัน และสังเกตดูว่าฝักและต้นกล้าจากต้นใดมีลักษณะด้อย เช่น มีฝักสีขาวหรือสีเหลือง กล้าไม่มีสีขาวหรือสีเหลือง ถ้าพบไม่ควรเอากล้าไม้จากต้นนั้นไปปลูก เพราะมีลักษณะด้อย อันเกิดจากการผสมกันเองในหมู่เครือญาติและกล้าไม้กล้าอื่นแม้เป็นสีเขียวก็มีแนวโน้มที่จะมียืนด้อยสูงเพราะมาจากต้นแม่ต้นเดียวกัน

6) เนื่องจากผลการศึกษาพบว่ามีการทำให้ป่าไม้โกงกางใบเล็กเสื่อมโทรมโดยการบุกรุกพื้นที่ป่า เช่นกรณีที่หมู่บ้านคลองพร้าว เกาะช้าง จังหวัดตราดดังกล่าวข้างต้น มีผลทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง ดังนั้นควรเร่งปลูกจิตสำนึกให้ประชาชนเห็นประโยชน์ของการอนุรักษ์และบริหารจัดการไม่ให้มีการปลูกสร้างโรงแรม รีสอร์ทและการทำนาเกลือในบริเวณพื้นที่ป่าชายเลน

4.2 ไม้โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora macunata*)

1) ควรอนุรักษ์พันธุกรรมในถิ่นกำเนิดของไม้โกงกางใบใหญ่ก็ใช้ข้อพิจารณาเช่นเดียวกับไม้โกงกางใบเล็ก จากพื้นฐานข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้โกงกางใบใหญ่ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง และเหมาะสมต่อการอนุรักษ์คือ อำเภอเมือง จังหวัดตราด อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง จังหวัดภูเก็ต หมู่บ้านสลักคอก เกาะช้าง จังหวัดตราด อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง

2) พื้นที่ป่าที่ควรฟื้นฟู คือพื้นที่หมู่บ้านแสมชัย จังหวัดเพชรบุรี เพราะเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำกว่าที่อื่น แนวทางการจัดการเก็บฝักเพื่อการฟื้นฟูป่าควรดำเนินการตามขั้นตอนที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อไม้โกงกางใบเล็ก

3) ส่วนแนวทางในการดำเนินการเก็บฝักไม้โกงกางใบใหญ่เพื่อการฟื้นฟูป่า ปลูกป่า ทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับได้เสนอแนะในไม้โกงกางใบเล็กที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น (สุจิตรา, 2550)

5. ไม้ป่า (*Bambusa bambos*) จากพื้นฐานการศึกษาดังกล่าวข้างต้นมีข้อเสนอแนะ ดังนี้

1) ควรจัดตั้งแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่าในถิ่นกำเนิดทุกภาคของประเทศไทยโดยเฉพาะแหล่ง (ประชากร) ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงในพื้นที่ที่มีอยู่ในพื้นที่อนุรักษ์ เช่น จังหวัด สระแก้ว จังหวัดลำปาง และ จังหวัดกาญจนบุรี

2) ควรจัดตั้งแหล่งพันธุกรรมไผ่ป่านอกถิ่นกำเนิดในแหล่ง (ประชากร) ที่มีอยู่ใกล้ชุมชนและที่ล่อแหลมต่อการบุกรุกทำลาย เช่น ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี

3) ควรจัดตั้งแปลงปลูกไผ่ป่าเพื่อเป็นธนาคารอาหารชุมชน (Food bank) เพื่อลดความกดดันในการเข้าไปตัดเอาหน่อและกล้าไผ่ป่าอย่างเกินกำลังไผ่ป่าตามธรรมชาติ (รังสัน และสุจิตรา, 2548)

6. กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilu exul*) การศึกษาดังกล่าวข้างต้นทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับสถานภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีแหล่งต่างๆ โดยแหล่งอำเภอบลายพระยา จังหวัดกระบี่ และแหล่งเกาะน้อย อำเภอบ้านนาเมือง จังหวัดกระบี่ เป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จึงควรใช้พื้นที่ดังกล่าวเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ในถิ่นกำเนิด และควรให้มีการฟื้นฟูความหลากหลายทางพันธุกรรมในพื้นที่อื่นๆ ที่มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ เช่น แหล่งเกาะนก อำเภอบ้านนาเมือง จังหวัดกระบี่ อย่างไรก็ตามการพิจารณาการอนุรักษ์พันธุกรรมนอกถิ่นกำเนิด ควรมีการดำเนินการขึ้นด้วย หากแหล่งกระจายพันธุ์ทางธรรมชาติล่อแหลมต่อการบุกรุกและลักลอบใช้ประโยชน์ในทางมิชอบ (จักรพันธ์ และสุจิตรา, 2548)

7. ไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*)

7.1 การศึกษาวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) สามารถนำผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมมาใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิดและนอกถิ่นกำเนิด โดยการคัดเลือกแหล่งของประชากรที่เหมาะสม ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า ไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) จากหน่วยป้องกันรักษาป่าที่ สบ.1 (ท่ามะปราง) จ.สระบุรี มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด กล่าวคือ มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ($H_e = 0.63$) ในขณะที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) จากอุทยานแห่งชาติภูพานจังหวัดสกลนคร มีค่าต่ำกว่าแหล่งอื่นโดยมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ($H_e = 0.29$) โดยที่ค่าเฉลี่ยของความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ทั้ง 12 แหล่งมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ($H_e = 0.39$) และความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง (F_{st}) ของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) พบว่ามีค่า $F_{st} = 0.18$ เมื่อพิจารณาจากประชากรของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ทั้ง 12 ประชากร พบว่าประชากรของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) จากหน่วยป้องกันรักษาป่าที่ สบ. 1 (ท่ามะปราง) จังหวัดสระบุรี (ภาคกลาง) มีความเหมาะสมในการเลือกเป็นตัวแทนสำหรับการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิด (In situ gene Conservation) เนื่องจากมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าค่าเฉลี่ยและสูงกว่าประชากรไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) จากแหล่งอื่นๆ ไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) จากอุทยานแห่งชาติภูจองนายอย จังหวัดอุบลราชธานี (ภาคอีสานตอนบน) อุทยานแห่งชาติตาโตน จังหวัดชัยภูมิ (ภาคอีสานตอนบน) และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ จังหวัดบุรีรัมย์ (ภาคอีสานตอนล่าง) ควรได้รับการพิจารณาเป็นแหล่งอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิดเช่นกัน เนื่องจากมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าค่าเฉลี่ยของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ที่ศึกษา โดยมีค่า $H_e = 0.46, 0.40$ และ 0.49 ตามลำดับ ผลการศึกษาวินิจฉัยครั้งนี้จึงมีข้อเสนอแนะให้จัดทำแหล่งอนุรักษ์ไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ในถิ่นกำเนิดในพื้นที่ภาคกลาง 1 แหล่ง ภาคอีสานตอนบน 2 แหล่ง และภาคอีสานตอนล่าง 1 แหล่ง ตามแหล่งดังกล่าวข้างต้นตามลำดับ นอกจากนี้

ไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ที่มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าค่าเฉลี่ยควรมีการพิจารณาการจัดการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดและมีการฟื้นฟูป่าไม้ในอุทยานดังกล่าว (สุจิตรา และคณะ, 2561)

7.2 การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแหล่งที่มาของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*)

พบว่าได้ว่ารูปแบบดีเอ็นเอที่พบในไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ในแหล่งธรรมชาติของภาคกลางมีรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากรูปแบบดีเอ็นเอของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ในภาคอีสานอย่างสิ้นเชิง และพบว่ามีรูปแบบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะถิ่นคือ รูปแบบดีเอ็นเอที่ 4 พบเฉพาะจังหวัดในภาคอีสานตอนบน รูปแบบดีเอ็นเอที่ 9 พบเฉพาะที่จังหวัดอุบลราชธานี รูปแบบดีเอ็นเอที่ 7 และ 12 พบเฉพาะที่จังหวัดบุรีรัมย์ รูปแบบดีเอ็นเอที่ 11 พบเฉพาะที่จังหวัดชัยภูมิ รูปแบบดีเอ็นเอที่ 3 พบเฉพาะจังหวัดสระบุรี และรูปแบบดีเอ็นเอที่ 2 10 และ 8 พบเฉพาะที่จังหวัดมหาสารคาม ผลของรูปแบบดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถใช้แยกแหล่งที่มาของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ได้นอกจากนี้รูปแบบของดีเอ็นเอของป่าปลูกในจังหวัดกำแพงเพชรเหมือนกับรูปแบบดีเอ็นเอในจังหวัดอุบลราชธานีและรูปแบบดีเอ็นเอของป่าปลูกในจังหวัดตรังมีรูปแบบดีเอ็นเอเหมือนกับป่าในจังหวัด บุรีรัมย์ มหาสารคาม ขอนแก่นและบึงกาฬ ผลการศึกษานี้รองรับการพิสูจน์แหล่งที่มาของไม้พะยุง (*D. cochinchinensis*) ที่ถูกลักลอบตัดที่ผิดกฎหมายได้ในอนาคต และกำลังจะดำเนินการขยายผลในการศึกษาในระดับภูมิภาคเพื่อการระบุแหล่งที่มาของไม้ที่ผิดกฎหมายในภูมิภาค (สุจิตรา และคณะ, 2562)

8. ไม้ชิงชัน (*D. oliveri*)

8.1 การศึกษาวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ชิงชัน (*D. oliveri*) จากผลการศึกษาพบว่า ไม้ชิงชันจากพื้นที่อุทยานแห่งชาติภูแลนคา จังหวัดชัยภูมิ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด กล่าวคือมีค่า $H_e = 0.84$ โดยที่ค่าเฉลี่ยของความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ชิงชันทั้ง 12 ประชากรมีค่า $H_e = 0.77$ ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งของไม้ชิงชัน พบว่ามีค่า $F_{st} = 0.13$ เมื่อพิจารณาจากประชากรของไม้ชิงชันทั้ง 12 ประชากร พบว่าประชากรของไม้ชิงชันจากอุทยานแห่งชาติภูแลนคา จังหวัดชัยภูมิ มีความเหมาะสมในการเลือกเป็นตัวแทนสำหรับการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิด (*In situ* gene conservation) เนื่องจากมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าค่าเฉลี่ยและสูงกว่าประชากรไม้ชิงชันจากแหล่งอื่นๆ อย่างไรก็ตามจะต้องมีการพิจารณาข้อมูลด้านอื่นร่วมด้วย (สุจิตรา และคณะ, 2564)

8.2 การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแหล่งที่มาของไม้ชิงชัน (*D. oliveri*) ตัวอย่างใน 15 ประชากร 4 ภูมิภาค พบรูปแบบดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์จีโนมรวม 32 รูปแบบ พบรูปแบบดีเอ็นเอมีการปรากฏในสัดส่วนที่ต่างกัน รูปแบบดีเอ็นเอที่พบมากที่สุดได้แก่ H25 ซึ่งพบใน 4 ประชากรจากทั้งหมด 15 ประชากร โดยคิดเป็น 27.03 % และมีรูปแบบดีเอ็นเอ 29 รูปแบบ ที่พบเฉพาะประชากรใดประชากรหนึ่ง โดยรูปแบบดีเอ็นเอของประชากรของไม้ชิงชันใน 4 ภูมิภาคมีความแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง นอกจากนี้ยังพบรูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะในแต่ละกลุ่มประชากรทำให้สามารถแยกจังหวัดและกลุ่มประชากรได้ยกเว้น 4 ประชากรในภาคเหนือคือ จ.ลำปาง และ จ.เชียงใหม่ ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านการบ่งชี้แหล่งกำเนิดได้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ ขยายผล งานปกป้องคุ้มครองพันธุ์ไม้ป่าและนิเวศวิทยาาสตร์ป่าไม้ (สุจิตรา และกิตติยา, 2564)

ส่วนการจำแนกชนิดพันธุ์โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดและการถอดรหัสพันธุกรรมสรุปได้ดังนี้

1. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากพันธุ์ไม้ป่าหวงห้ามและไม้ป่าในบัญชี CITES ในประเทศไทย โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบและเปลือกของพันธุ์ไม้แต่ละชนิด จำนวน 579 ตัวอย่าง และถอดรหัสพันธุกรรมของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์จีโนม 3 ตำแหน่ง คือ Maturase K, rbcL (Ribulose Biphosphate Carboxylase large chain) และ trnH-psbA (intergenic spacer) พบว่าสามารถจำแนกได้ 65 วงศ์ (Family) 140 สกุล (Genus) และ 240 ชนิด (Species) ซึ่งสอดคล้องกับการจำแนกทางอนุกรมวิธาน

2. การจำแนกไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis*) ออกจากไม้ที่มีลักษณะเนื้อไม้ใกล้เคียงกัน สามารถทำได้โดยการศึกษาค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ พบว่าไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากไม้ประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus*) ไม้ชิงชัน (*D. oliveri*) กระพี้เขาควาย (*D. cultrata*) และเก็ดดำ (*D. assamica*) ถึง 41 ตำแหน่ง โดยไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก ชิงชัน (*D. oliveri*) 19 ตำแหน่ง, กระพี้เขาควาย (*D. cultrata*) 19 ตำแหน่ง, เก็ดดำ (*D. assamica*) 16 ตำแหน่ง และประดู่ (*P. macrocarpus*) 49 ตำแหน่งกับไม้แต่ละชนิดสามารถนำเสนอให้ ไซเตส: อนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้จะสูญพันธุ์ ควบคุมการค้าระหว่างประเทศของผลิตภัณฑ์ของไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) เพราะสามารถจำแนกไม้พะยูน (*D. cochinchinensis*) ออกจากไม้ชนิดอื่นๆจากผลิตภัณฑ์ไม้จากการวิเคราะห์ทางดีเอ็นเอ (Changtragoon and Singthong, 2016)

3. การจำแนกพันธุ์กรรมของไม้สะเดาไทย (*Azadirachta indica* var *siamensis*) และ สะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica*) พบว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ 10 ตำแหน่งอย่างชัดเจนจึงควรผลักดันให้มีการเปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์ของไม้สะเดาไทยเป็น *Azadirachta siamensis* แทน *Azadirachta indica* var *siamensis* ซึ่งประเทศไทยควรจัดการอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุกรรมของไม้ชนิดนี้ทั้งในถิ่นและนอกถิ่นกำเนิดเนื่องจากมีความจำเพาะทางพันธุกรรมกับประเทศไทย และควรอนุรักษ์แหล่งกำเนิดและเพื่อนำไปขยายผลพัฒนาต่อยอดด้านการใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืนในอนาคต (สุจิตรา, 2554)

4. การพิสูจน์ไม้โกงกางว่าเป็นลูกผสมหรือไม่และเกิดจากการผสมของไม้โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) กับไม้โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) หรือไม้นั้นพิสูจน์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมโดยยีนในนิวเคลียส 3 ยีน พบว่าไม้โกงกางลูกผสมดังกล่าวมียีนที่จำเพาะของทั้งไม้โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) และไม้โกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) จึงสรุปได้ว่าไม้โกงกางลูกผสมเป็นลูกผสมระหว่างไม้โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) และไม้โกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) จริง และการพิสูจน์ว่าไม้โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) หรือใบใหญ่เป็นต้นแม่ของไม้โกงกางลูกผสมดังกล่าวทำได้โดยการถอดรหัสพันธุกรรมในคลอโรพลาสต์ยีนในไม้โกงกางลูกผสมดังกล่าว โดยเปรียบเทียบระหว่างไม้โกงกาง

ใบเล็ก (*R. apiculata*) และไม้โก้งกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) พบว่าไม้โก้งกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) เป็นต้นแม่และยีนที่จำเพาะถูกถ่ายทอดโดยไม้โก้งกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) (Changtragoon *et al.*, 2016)

คดีนิติวิทยาศาสตร์ป่าไม้โดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและการถอดรหัสพันธุกรรม

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ได้แสดงภาพลักษณ์ให้เห็นว่าเป็นหน่วยงานของชาติที่ช่วยเหลือผู้บริสุทธิ์ และขณะเดียวกันก็สามารถทำให้ผู้กระทำผิดกรณีลักลอบตัดไม้ได้รับโทษตามกฎหมาย ไม่ว่าจะเป็นอยู่ในกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช หรือนอกพื้นที่กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช เช่น วัด สวนป่า เตาที่ผ่านมาตำรวจได้ให้ความไว้วางใจและขอความอนุเคราะห์และขอความร่วมมือให้กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ช่วยตรวจสอบพันธุ์กรรมของ ไม้เลื้อยไม้ ขึ้นไม้ และต้นไม้ที่ต้องสงสัยอย่างต่อเนื่องจะเห็นได้ว่าการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสามารถนำมาใช้ในการระบุชนิดพันธุ์ของต้นไม้ได้ดังกรณีศึกษาของคดีนิติวิทยาศาสตร์ 7 คดี กล่าวคือ

1. ไม้เลื้อยของกลางไม่ได้มาจากขึ้นไม้กฤษณา (*Aquilaria crassna*) (สุจิตรา, 2560)
2. ในกรณีของไม้มะม่วง (*Mangifera* sp) ของกลางสามารถพิสูจน์ได้โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอได้ว่ามาจากมะม่วงพันธุ์พื้นเมือง (มะม่วงบ้าน) ไม่ใช่ไม้มะม่วงป่า (*Mangifera* sp) ซึ่งเป็นไม้หวงห้าม Changtragoon *et al.* (2017)
3. ผลการศึกษาวิจัยตัวอย่างเนื้อไม้ของกลางการวิเคราะห์ลักษณะทางกายวิภาคของไม้ และจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน trnH-psbA spacer region พบว่าลักษณะทางกายภาพและดีเอ็นเอของขึ้นไม้ของกลางเหมือนกับไม้บุนนาค/นากบุด (*Mesua ferrea*)
4. ในกรณีการพิสูจน์ว่าไม้สัก (*Tectona grandis*) ของกลางที่ถูกจับกุมเป็นไม้สักที่ถูกตัดมาจากสวนป่าหรือไม่นั้นพบว่าท่อนไม้สักที่ถูกลักลอบตัดมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับไม้สักที่ถูกตัดในสวนป่า
5. ในกรณีการพิสูจน์ขึ้นไม้ของกลาง 142 ชิ้นพบว่าไม้ขึ้นไม้ของกลาง 2 ชิ้นมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับไม้พะยูนต้นหนึ่งที่ถูกลักลอบตัดจากอุทยานแห่งชาติ (สุจิตรา, 2560)
6. กิ่งและเนื้อไม้พะยูนต้องสงสัยมีลักษณะทางพันธุกรรมไม่เหมือนกับต้นพะยูนที่ถูกลักขุดยกเอาไป
7. วัดอุทยานไม้ของกลางเป็นไม้พะยูนและมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับต้นพะยูนที่ถูกลักลอบตัดภายในวัดที่เกิดเหตุ รายละเอียดวิธีการศึกษาและผลการศึกษาได้แสดงสรุปผลสังเขปไว้ดังตารางที่ 26.2

ตารางที่ 26.2 บทสรุปของคตินิวัตินิเทศศาสตร์ป่าไม้และผลการวิจัย

บทที่	วิธีการศึกษา	ผลที่ได้
คตินิวัตินิเทศศาสตร์โดยใช้เครื่องมือ คดีที่ 1: การพิสูจน์ว่าไม้ที่เหลือของกลางและไม้ของกลางในที่เกิดเหตุเป็นชนิดเดียวกัน และเป็นไม้หวงห้ามหรือไม่	การถอดรหัสพันธุกรรม	ไม้ที่เหลือของกลางไม่ได้มาจากจีนไม้กฤษณา (<i>Aquilaria crassna</i>)
คตินิวัตินิเทศศาสตร์โดยใช้เครื่องมือ คดีที่ 2: การพิสูจน์ว่าไม้มะม่วง (<i>Mangifera</i> sp.) ของกลางมาจากมะม่วงป่า (<i>Mangifera</i> sp.) ซึ่งเป็นไม้หวงห้าม	การถอดรหัสพันธุกรรม	ไม้มะม่วง (<i>Mangifera</i> sp.) ของกลางได้ว่ามาจากมะม่วงพันธุ์พื้นเมือง (มะม่วงบ้าน) ไม่ใช่ไม้มะม่วงป่า (<i>Mangifera</i> sp.) ซึ่งเป็นไม้หวงห้าม
คตินิวัตินิเทศศาสตร์โดยใช้เครื่องมือ คดีที่ 3: การพิสูจน์ว่าไม้ของกลางเป็นไม้พะยูน (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>) หรือไม้บุนนาค/นากบุด (<i>Mesua ferrea</i>) โดยใช้วิธีพิสูจน์ลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องสเตอริโอ ไมโครสโคป (Stereo Microscope) และถอดรหัสพันธุกรรม	พิสูจน์ลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องสเตอริโอ ไมโครสโคป (Stereo Microscope) และถอดรหัสพันธุกรรม	ตัวอย่างไม้ของกลางมีลักษณะทางกายภาพและ ดีเอ็นเอของจีนไม้ของกลางเหมือนกับไม้บุนนาค/นากบุด (<i>Mesua ferrea</i>)
คตินิวัตินิเทศศาสตร์โดยใช้เครื่องมือ คดีที่ 4: การพิสูจน์ว่าไม้สัก (<i>Tectona grandis</i>) ของกลางที่ถูกจับกุมเป็นไม้สัก (<i>T. grandis</i>) ที่ถูกตัดมาจากสวนป่าหรือไม่	การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ไมโครแซทเทลไลต์มาร์คเกอร์)	ท่อนไม้สัก (<i>T. grandis</i>) ที่ถูกลักลอบตัดมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับไม้สักที่ถูกตัดในสวนป่า
คตินิวัตินิเทศศาสตร์โดยใช้เครื่องมือ คดีที่ 5: การวินิจฉัยว่าจีนไม้ของกลาง 142 ชิ้นว่ามาจากต้นใดต้นหนึ่งของไม้พะยูนที่ถูกลักลอบตัดหรือไม่	การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ไมโครแซทเทลไลต์มาร์คเกอร์)	จีนไม้ของกลาง 2 จีนมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับไม้พะยูนต้นหนึ่งที่ถูกลักลอบตัดจากอุทยานแห่งชาติ
คตินิวัตินิเทศศาสตร์โดยใช้เครื่องมือ คดีที่ 6: กิ่งไม้พะยูนของต้นพะยูนต้องสงสัยมีพันธุกรรมตรงกับราก กิ่งที่งอกของไม้พะยูนที่คาดว่าถูกลักลอบเลื่อมต้นไปปลูกอีกหรือไม่	การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ไมโครแซทเทลไลต์มาร์คเกอร์)	กิ่งและเนื้อไม้พะยูนต้องสงสัยมีลักษณะทางพันธุกรรมไม่เหมือนกับต้นพะยูนที่ถูกลักลอบขุดเอาไป
คตินิวัตินิเทศศาสตร์โดยใช้เครื่องมือ คดีที่ 7: การพิสูจน์ว่าไม้ของกลางเป็นไม้พะยูนหรือไม่ และขี้เลื่อยและเศษไม้ของกลางมีพันธุกรรมตรงกับไม้ที่ถูกตัดจากวัดหรือไม่	การถอดรหัสพันธุกรรมและการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ไมโครแซทเทลไลต์มาร์คเกอร์)	วัดอุทยานไม้ของกลางเป็นไม้พะยูนและวัตถุพยานตามหมายเลขของลำดับที่ 1.3, 2.2 และ 3.1 พบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน

คดีนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและการถอดรหัสพันธุกรรม

กรณีศึกษาที่ 1: อูรังอุตัง (*Pongo pygmacus*) อูรังอุตังได้ถูกลักลอบเข้าประเทศอย่างผิดกฎหมาย ประเทศไทยได้มีความต้องการที่จะส่งอูรังอุตังกลับคืนถิ่นเดิม ผลการศึกษาดังกล่าวพบว่า อูรังอุตัง 53 ตัว เป็นสายพันธุ์บอร์เนียว (*P. pygmacus*) อูรังอุตัง 50 ตัว มีความเป็นไปได้ว่ามาจากตะวันตกเฉียงใต้และตอนกลางของกาลิมันตัน บนเกาะบอร์เนียว ส่วนอีก 3 ตัว มีความเป็นไปได้ว่า มาจากตะวันออกกลางของกาลิมันตัน เกาะบอร์เนียว ประเทศอินโดนีเซีย ผลการศึกษามีประโยชน์ต่อหน่วยงานบังคับใช้กฎหมายและหน่วยงานไซเตสของประเทศไทยที่สามารถดำเนินส่งอูรังอุตังกลับสู่แหล่งกำเนิดเดิมได้ (Changtragoon, 2010; Changtragoon, 2012)

กรณีศึกษาที่ 2: เสือ (*Panthera spp.*) เสือที่ได้ถูกวินิจัยครั้งนี้เกิดจากการการลักลอบล่าและนำส่งไปตามเส้นทางชายแดนภาคเหนือของไทย สำหรับการค้าที่ผิดกฎหมายและได้ถูกจับกุมโดยหน่วยงานไซเตสของประเทศไทย ดังนี้ ชิ้นเนื้อของกลางเสือ 17 ชิ้น และมีหนังสือของกลาง 6 ชิ้น ผลการศึกษพบว่า จากตัวอย่างชิ้นเนื้อของกลาง 17 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเสือโคร่ง (*P. tigris*) 12 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 3 สายพันธุ์ ดังนี้ สายพันธุ์ Indochinese tiger (*P. t. corbetti*) Amur tiger (*P. t. altaica*) และ Malayan tiger (*P. t. jacksoni*) ส่วนอีก 3 ตัวอย่างนั้นเป็นเสือดาว (*P. pardus*) 1 ตัวอย่าง และเสี้อยาเมฆ (*Neofelis nebulosa*) 2 ตัวอย่าง ส่วนหนึ่งอีก 6 ชิ้นนั้นพบว่า 3 ตัวอย่างเป็นเสือ Indochinese (*P. t. corbetti*) และอีก 3 ชิ้นเป็นเสือดาว (*P. pardus*) ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการบังคับใช้กฎหมายและการป้องกันและอนุรักษ์พันธุ์เสือ สามารถจับกุมผู้กระทำความผิดโดยต้องเสียเงินค่าปรับ จำนวน 8,640,000 ล้านบาท และถูกจำคุก ทั้งนี้ผู้กระทำความผิดยอมรับสารภาพจึงลดโทษให้กึ่งหนึ่ง นับว่าเป็นคดีที่ถูกปรับโดยทางขบวนการค้าสัตว์ป่าที่ผิดกฎหมายที่สูงที่สุดในประเทศไทย (Changtragoon and Singthong, 2012; Changtragoon, 2012; Changtragoon and Maklang, 2010)

กรณีศึกษาที่ 3: งาช้าง ผลจากการศึกษาการถอดรหัสพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย พบว่ามีตำแหน่งที่จำเพาะนิวคลีโอไทด์กับช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) 15 ตำแหน่ง และมี 14 ตำแหน่งที่จำเพาะกับช้างแอฟริกา (*Loxodonta africana cyclotis*) ผลการศึกษพบว่า 5 ผลิตภัณฑ์งาช้างมาจากช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) และอีก 2 ผลิตภัณฑ์งาช้างมาจากช้างแอฟริกาที่มาจากป่า (*Loxodonta africana cyclotis*) สามารถนำมาขยายผลจับกุมผู้ที่ทำการค้าผลิตภัณฑ์งาช้างแอฟริกันได้ทั้งในประเทศไทยและสหรัฐอเมริกา (Changtragoon and Singthong, 2010b; Changtragoon, 2012)

กรณีศึกษาที่ 4: เนื้อของกลางที่ต้องสงสัย ได้ถูกส่งมาจากหน่วยปฏิบัติการของเครือข่ายการบังคับใช้กฎหมายสัตว์ป่าและพันธุ์พืชแห่งภูมิภาคอาเซียน (ASEAN-Wildlife Enforcement Network: ASEAN-WEN) และ ไซเตสของประเทศไทยกับกัมพูชาได้ให้ประเทศไทยช่วยวินิจัยว่าเป็นเนื้อของวัวแดงหรือไม่ ผลจากการศึกษาวินิจัยรหัสพันธุกรรมของ ไมโทคอนเดรียพบว่า ชิ้นเนื้อดังกล่าว เป็นเนื้อของควาย Water buffalo (*Bubalus bubalis*) เนื่องจากควายไม่ได้อยู่ในบัญชีไซเตสและไม่ได้ขัดต่อกฎหมายไซเตส

จึงได้รายงานให้หน่วยปฏิบัติการในประเทศกัมพูชาดำเนินการต่อไป จากการนำเสนอกรณีศึกษาทั้ง 4 ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าวิธีการวินิจฉัยสัตว์ป่าแต่ละชนิดไม่ว่าจำแนกชนิด สายพันธุ์ หรือแหล่งที่มาขึ้นต้องอาศัยฐานข้อมูล Genbank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าข้อมูลพันธุกรรมของการศึกษาระดับนานาชาติที่รวบรวมอย่างเป็นระบบเพื่อใช้ในฐานะข้อมูลกลางมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการดำเนินการทางนิติวิทยาศาสตร์ที่ต้องการความรวดเร็วเพื่อนำไปใช้ในการบังคับใช้กฎหมายได้ทันต่อเหตุการณ์รายละเอียดวิธีการศึกษาและผลการศึกษาได้แสดงสรุปผลส่งเขปไว้ดังตารางที่ดังตารางที่ 26.3

ตารางที่ 26.3 สรุปคดีนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า

กรณีศึกษา	เครื่องมือทางพันธุกรรม	ผลลัพธ์	การนำสู่ปฏิบัติและการบังคับใช้กฎหมาย (CITES)
1. อูรังอุตัง	Mt DNA sequences at Control region	50 ตัวอย่าง มาจากตะวันตกเฉียงใต้และตอนกลางของกาลิมันตันบนเกาะบอร์เนียว 3 ตัวอย่างมาจากตะวันออกของเกาะลิมันเกาะบอร์เนียว ประเทศอินโดนีเซีย	อูรังอุตังของกลางถูกส่งกลับไปยังอินโดนีเซีย
2. เสือ	Mt DNA sequences at cytochrome b gene และ microsatellite	- จากชิ้นเนื้อ 17 ตัวอย่าง พบว่า 12 ตัวอย่างเป็นเสือโคร่ง (<i>Panthera tigris</i>) ซึ่งประกอบด้วย 3 สายพันธุ์ (subspecies) คือ Indochinese tiger (<i>P. t. corbetti</i>), Amur tiger (<i>P. t. altaica</i>) และ Malayan tiger (<i>P. t. jacksoni</i>) ส่วนที่เหลืออีก 5 ตัวอย่างพบว่าเป็นเสือดาว (<i>P. pardus</i>) 3 ตัวอย่าง และเสือลายเมฆ (<i>Neofelis nebulosa</i>) 2 ตัวอย่าง - ตัวอย่างหนังเสือ 6 ตัวอย่างพบว่าเป็นเสือโคร่ง (<i>Panthera tigris</i>) และอีก 3 ตัวอย่างคือเสือดาว (<i>P. pardus</i>)	ผลการศึกษาที่สามารถจับกุมผู้กระทำความผิดโดยต้องเสียเงินค่าปรับ จำนวน 8,640,000 ล้านบาท และถูกจำคุก ทั้งนี้ผู้กระทำความผิดยอมรับสารภาพจึงลดโทษให้กึ่งหนึ่ง นับว่าเป็นคดีที่ถูกปรับโดยทางขบวนการค้าสัตว์ป่าที่ผิดกฎหมายที่สูงที่สุดในประเทศไทย
3. งาช้าง	Mt DNA sequences at cytochrome b gene	ผลิตภัณฑ์งาช้าง 5 ตัวอย่างพบว่ามีมาจากช้างเอเชีย (<i>Elephas maximus</i>) และ 2 ตัวอย่างมาจากช้างป่าแอฟริกัน (<i>Loxodonta africana cyclotis</i>)	ผลการศึกษาที่สามารถนำมาขยายผลจับกุมผู้ทำการค้าผลิตภัณฑ์งาช้างแอฟริกัน ได้ทั้งในประเทศไทยและสหรัฐอเมริกา
4. เนื้อวัวแดงที่ต้องสงสัย	Mt DNA sequences at cytochrome b gene	เนื้อสัตว์ป่าที่ต้องสงสัยมาจากควาย (<i>Bulalus bubalis</i>) ไม่ได้มาจากวัวแดง (<i>Bos javanicus</i>)	ผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถคุ้มครองผู้ไม่กระทำความผิดในการลักลอบค้าสัตว์ป่า

ข้อเสนอแนะในการบริหารจัดการตัวอย่างของกลางในระดับพื้นที่และงานในห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ

• การบริหารจัดการในระดับพื้นที่

1. ควรมีคำสั่งแต่งตั้งคณะทำงาน ทุกภาคส่วนผู้ที่มีส่วนได้ส่วนเสียในระดับพื้นที่ ลงพื้นที่ที่เกิดเหตุเพื่อเก็บตัวอย่างของกลาง (ไม่ควรเก็บตัวอย่างโดยพลการ ตามลำพัง โดยไม่มีการมอบหมายเป็นทางการ)
2. ตั้งโจทย์ประเด็นปัญหาที่จะเก็บตัวอย่างว่า ต้องเก็บตัวอย่างตรงไหน อย่างไร ก็ตัวอย่างเพื่อตอบโจทย์ปัญหาที่ต้องการพิสูจน์ลักษณะพันธุกรรมดังนี้

2.1 เป็นชนิดอะไร

2.2 ชิ้นส่วนของกลางต้องสงสัยมาจากต้นไม้อะไรที่คาดว่าอาจถูกลักลอบตัดหรือไม่

2.3 มาจากแหล่งไหน

3. ควรมีการถ่ายภาพ และบันทึกวิดีโอหลักฐานการเก็บตัวอย่าง สภาพ สถานที่ ทำแผนที่ประกอบ (layout) ตารางจัดบันทึกรายละเอียดของของกลาง วันเวลา ผู้จัดบันทึก ผู้เก็บตัวอย่าง

4. การเก็บตัวอย่าง

4.1 ไม้ป่า

■ เพราะมีเงื่อนไขของเวลา งบประมาณ และบุคลากรที่ดำเนินการ หากไม่สามารถดำเนินการพิสูจน์คดีทางกายวิภาคและเทียบวงปีและหน้าตัดของไม้ที่ถูกตัดได้ ควรเก็บเนื้อไม้ในส่วนของไม้ท่อนและจากต่อไม้ โดยเก็บเนื้อส่วนเปลือกเข้าไปในกระพี้ มีความหนาอย่างน้อย 1 นิ้ว กว้าง 3 นิ้ว ยาว 5 นิ้ว

■ ส่วนชิ้นไม้อื่นๆ ควรเก็บตัวอย่างตามขนาดดังกล่าวข้างต้นหรือตามความเหมาะสม ส่วนชิ้นที่เล็กลงนั้น ควรมีปริมาณประมาณ 5-10 กรัม โดยนำใส่ถุงพลาสติกที่รูดซิปลิดและมีสารดูดความชื้น เขียนสถานที่เก็บหมายเลขและวันที่เก็บตัวอย่างให้ชัดเจนพร้อมรูปถ่าย และบันทึกวิดีโอหลักฐานการเก็บตัวอย่าง โดยระบุรายละเอียด รหัสหมายเลขตัวอย่างที่เก็บ วันเวลา สถานที่ ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

4.2 สัตว์ป่า

■ การเก็บเลือดจากสัตว์ที่มีชีวิต ควรมีสัตว์แพทย์เป็นผู้เก็บตัวอย่างมีหลอดบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

■ ตัวอย่างเนื้อ ควรใส่ถุงพลาสติกที่แช่น้ำแข็งหรือที่เก็บความเย็น

■ ควรมี cotton bud ไว้เก็บตัวอย่างคราบเลือดด้วย หากต้องการใช้ในการวิเคราะห์ตามรูปคดี

■ ใส่ถุงมือยางที่ใช้แล้วทิ้ง ในการเก็บตัวอย่างของกลางเพื่อป้องกันการปนเปื้อนและโรคที่มาจากสัตว์ และใส่หน้ากากอนามัยหากจำเป็น จึงต้องมีวัสดุดังกล่าวพร้อมที่จะปฏิบัติงานในพื้นที่

-ระบุรายละเอียด รหัสหมายเลขตัวอย่างที่เก็บ วันเวลา สถานที่ ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

5. การนำส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ

■ มีหนังสือขอความร่วมมือว่าต้องการให้พิสูจน์พันธุกรรมของของกลางระดับใด ตั้งโจทย์ประเด็นคำถามพร้อมขอคำแนะนำการเก็บตัวอย่าง

■ มีหนังสือนำส่งอย่างเป็นทางการที่มีรายละเอียดพร้อมตัวอย่างของกลาง

■ มอบหมายให้เจ้าหน้าที่มานำส่งตัวอย่างของกลางเป็นทางการ

● การบริหารจัดการในระดับห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ

1. ลงทะเบียนเก็บวัตถุดิบให้เรียบร้อยเป็นระบบ
2. ตัวอย่างของกลางไม่เพียงพอ ต้องรีบแจ้งเจ้าของคดีผู้นำส่งให้ส่งตัวอย่างเพิ่มเติมโดยทันทีหรือต้องการตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบ
3. วิเคราะห์ว่าจะนำวิธีการทางเครื่องหมายโมเลกุลชนิดใดมาตอบโจทย์ ประเด็นปัญหาที่ต้องการวินิจฉัยพันธุกรรม

3.1 พิสูจน์ว่าเป็นชนิดพันธุ์ใด

พืช/ไม้ป่า: ถอดรหัสพันธุกรรมในคลอโรพลาสต์จีโนม

สัตว์ป่า: ถอดรหัสพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียจีโนม

3.2 พิสูจน์อัตลักษณ์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือจำนวนตัวด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

3.3 แหล่งที่มา

พืช/ไม้ป่า: ศึกษา haplotype diversity ในคลอโรพลาสต์จีโนม (ขณะนี้ทำได้เฉพาะไม้พุ่มและไม้ชิงชัน) เทียบกับฐานข้อมูลรูปแบบของ SNPs ในคลอโรพลาสต์จีโนม

สัตว์ป่า: ถอดรหัสพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียจีโนม (เช่น control region และ cytochrome B) และเทียบ variable nucleotide site กับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI

4. การเขียนรายงาน

ควรเขียนรายงานผลการวินิจฉัยพันธุกรรมที่สั้นๆ ง่ายต่อความเข้าใจแม้ไม่มีพื้นฐานความรู้ด้านพันธุศาสตร์ก็สามารถเข้าใจได้ชัดเจนว่าใช้วิธีการอะไรในการวินิจฉัยพันธุกรรม แจ้งผลการวินิจฉัยพันธุกรรมโดยตอบประเด็นคำถามเป็นข้อๆตามโจทย์ที่ตั้งคำถามมา ตามหลักฐานทางวิชาการ ชัดเจน แบบตรงไปตรงมา

- ไม่เขียนอะไรที่นอกเหนือจากที่ตั้งคำถาม
- ไม่สรุปขึ้นโดยใช้ความคิดของตน ต้องแสดงความเป็นกลาง
- ใช้ผลการศึกษาและวินิจฉัยพันธุกรรมเป็นคำตอบและแสดงผล
- ควรมีรูปผลการวินิจฉัยพันธุกรรมประกอบเพื่อให้เข้าใจง่าย
- ควรมีรายงานผลทางวิชาการวินิจฉัยพันธุกรรมโดยละเอียดแนบท้ายไปด้วย

หมายเหตุ: จากการปฏิบัติงานด้านวินิจฉัยพันธุกรรมในงานนิติวิทยาศาสตร์ป่าและสัตว์ป่ามากกว่า 10 ปี ไม่เคยถูกเรียกตัวโดยร้องขอให้ไปเป็นพยานในศาลเพื่อชี้แจงผลการวินิจฉัยพันธุกรรมไม้ป่าและสัตว์ป่าของกลาง

5. ทำหนังสือนำเสนอรายงานผลการวินิจฉัยพันธุกรรมอย่างเป็นทางการผ่านระดับสายงานราชการ

6) หากถูกเรียกตัวให้เป็นพยานในศาล

6.1 ควรร้องขอให้ไปศาลแบบ Teleconference เพื่อหลีกเลี่ยงการเผชิญหน้าโดยตรงกับผู้ต้องหา (จำเลย) และทนายฝ่ายจำเลย หากศาลไม่สามารถจัดทำได้ก็ต้องไปเป็นพยานในศาล เป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้และไม่สนใจไม่ได้

6.2 เตรียมข้อมูลให้พร้อมและคาดการณ์ล่วงหน้าว่าจะถูกถามประเด็นอะไร

6.3 อาจถามอัยการล่วงหน้าว่าประเด็นปัญหาที่ต้องการให้เป็นพยานในศาลคืออะไรเพื่อเตรียมข้อมูลให้พร้อม

6.4 แสดงความเป็นกลางและยึดหลักความรู้และผลการตรวจพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์ และทางวิชาการเป็นหลักไม่ใช้ความรู้สึกส่วนตัว ไม่คาดคะเนล่วงหน้า และไม่ชี้นำผลของรูปคดี

ข้อเสนอแนะโดยภาพรวม

ดังนั้นโดยภาพรวมแล้วในระหว่างแหล่ง (ประชากร) ของชนิดพันธุ์ไม้ป่าและพืชป่าที่ได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมแหล่งใดที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ควรที่จะได้รับการเลือกเป็นลำดับแรกในการอนุรักษ์ เนื่องจากไม้ป่าและพืชป่าบางชนิดมีอายุที่ยืนยาว ซึ่งไม่เหมือนกับพืชล้มลุกและพืชอายุสั้น เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงและมีการอัตราการผสมข้ามสูงจะช่วยประกันโอกาสในการให้พันธุ์ไม้ป่านั้นมีโอกาสรอดตายสูงขึ้นอยู่รอดได้มีอายุที่ยืนยาวและมีความต้านทานต่อโรคและแมลงทั้งในปัจจุบันและในอนาคต ซึ่งมีสิ่งแวดล้อมผันแปรตลอดเวลาและไม่สามารถคาดการณ์ได้ (Changtragoon and Szmidt, 1997) หากพบแหล่ง (ประชากร) ใดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ก็ควรจะต้องมีการดำเนินการฟื้นฟูฐานพันธุกรรม โดยการฟื้นฟูป่าและปลูกป่า และหากหล่อหลอมต่อการอนุรักษ์ทำลายก็ควรดำเนินการจัดทำ การอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด ที่สามารถดูแลให้ปลอดภัย

ทั้งนี้การเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมนั้น ควรใช้ชนิดที่สามารถศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการปรับตัวร่วมกับข้อมูลทางนิเวศวิทยาจะทำให้โครงการอนุรักษ์ไม้ป่าในแต่ละชนิดที่อยู่ในป่าชนิดต่างๆ ประสบความสำเร็จมากยิ่งขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดลักษณะด้อย อันเนื่องมาจากการผสมในหมู่เครือญาติ (Inbreeding depression) ในแหล่งเมล็ดไม้ที่เก็บเพื่อใช้ในการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดและฟื้นฟูป่าตลอดจนปลูกป่านั้น ควรมีการคัดกรองและตรวจสอบก่อนโดยการประเมินอัตราผสมข้ามโดยใช้เครื่องหมายไอโซเอนไซม์หรือไมโครแซทเทลไลท์ หากไม่สามารถกระทำได้ ก็ควรที่จะเก็บเมล็ดไม้แบบแยกต้นโดยมีการบันทึกแบบแยกต้น เพื่อนำเมล็ดไม้มาเพาะและทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตเพื่อคัดเลือกในการปลูกต่อไป ในการปลูกโดยใช้ท่อนพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศควรระวังหลีกเลี่ยงการขยายพันธุ์แบบติดตาหรือเสียบยอด เพราะจะเพิ่มโอกาสที่ได้ต้นพันธุ์ที่ผิด เนื่องจากตาอาจจะมีเชื้อจากเหง้า (Rootstock) ไม่ใช่มาจากตาจากต้นพันธุ์ที่คัดเลือกไว้จึงควรขยายพันธุ์โดยวิธีปักชำ อย่างไรก็ตามหากไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ก็สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ หรือไอโซเอนไซม์ตรวจสอบความถูกต้องได้

อย่างไรก็ตามการดำเนินการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมป่าไม้ จะประสบความสำเร็จจะต้องให้ความรู้ความเข้าใจแก่ประชาชน ในคุณค่าของทรัพยากรป่าไม้ และเสริมสร้างความตระหนัก ความร่วมมือ ทั้งนี้การแก้ปัญหาความยากจนให้แก่ประชาชนที่อยู่ในและรอบพื้นที่ป่า โดยการสร้างแรงจูงใจเชิงบวก เพื่อให้ช่วยกันดูแลรักษาป่าที่ชาวบ้านพึ่งพิงทรัพยากรอยู่ ก็จะเป็นอีกหนทางหนึ่ง จะทำให้การอนุรักษ์ป่าไม้เป็นไปอย่างยั่งยืนและประสบความสำเร็จ (Changtragoon, 2003b)

ผลการพิสูจน์จากกระบวนการวิทยาศาสตร์ดังกล่าว สามารถนำมาใช้ในการบังคับใช้กฎหมาย ซึ่งเป็นที่ยอมรับในชั้นศาล โดยผู้ต้องหาที่ยอมจำนนต่อหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ นอกจากนี้ยังช่วยให้ผู้บริสุทธิ์

พ้นจากโทษ ขณะเดียวกันก็ทำให้ผู้กระทำผิดต้องรับโทษตามกฎหมาย จึงควรจะต้องมีการศึกษาวิจัย จัดทำฐานข้อมูลพันธุ์กรรมไม้ป่าและไม้ป่าหวงห้าม รวมถึงบัญชี CITES เพื่อนำไปใช้ระบุชนิดพันธุ์ พิสูจน์เอกลักษณ์และแหล่งที่มาของไม้ของกลางและไม้ที่ถูกลักลอบตัดในประเทศไทยในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ควรสนับสนุนงบวิจัย การประเมินสถานภาพแหล่งพันธุ์กรรมของไม้หวงห้ามอย่างต่อเนื่องและยั่งยืนเพื่อเป็นฐานข้อมูลเปรียบเทียบกับไม้ที่ถูกลักลอบตัดได้

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ควรสนับสนุนให้งานนิติวิทยาศาสตร์ป่าไม้เพื่อช่วยในการบังคับใช้กฎหมายโดยเฉพาะเพื่อรองรับคดีนิติวิทยาศาสตร์ป่าไม้ที่ต้องการพิสูจน์ทางพันธุ์กรรมที่มีมาอย่างต่อเนื่องจึงควรสนับสนุนทั้งงบประมาณและบุคลากรให้สามารถดำเนินงานบริการด้านวิชาการแก่หน่วยงานภายในและภายนอกได้อย่างต่อเนื่อง เพียงพอ มีประสิทธิภาพและยั่งยืน

การที่หน่วยงานทั้งภายในและภายนอกสังกัดกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช จะส่งตัวอย่างซีเลื่อย เนื้อไม้ และท่อนไม้ ให้สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ตรวจสอบและวินิจฉัยพันธุ์กรรมนั้น ควรแต่งตั้งกรรมการในการเก็บตัวอย่าง เพื่อให้การเก็บตัวอย่างเป็นไปอย่างโปร่งใส และเป็นข้อปฏิบัติที่ดี ในการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวินิจฉัยนั้น ควรพิจารณาก่อนว่าสามารถใช้เทคนิคทางกายวิภาคป่าไม้และการดูเทียบวงปีของต้นไม้ในระดับพื้นที่ได้หรือไม่ก่อนตัดสินใจส่งตัวอย่างของกลางมาขอความช่วยเหลือทางวิชาการเพราะมีเงื่อนไขของเวลา งบประมาณ และ บุคลากรที่ดำเนินการ หากไม่สามารถดำเนินการตามวิธีการทางกายวิภาคได้และดูเทียบวงปีในระดับพื้นที่ได้ ควรเก็บเนื้อไม้ในส่วนท่อนและต่อไม้โดยเก็บเนื้อส่วนเปลือกเข้าไปในกระพี้ มีความหนาอย่างน้อย 1 นิ้ว กว้าง 3 นิ้ว ยาว 5 นิ้ว ส่วนชิ้นไม้อื่นๆ ควรเก็บตัวอย่างตามขนาดดังกล่าวข้างต้นหรือตามความเหมาะสม ส่วนซีเลื่อยนั้นควรมีปริมาณประมาณ 5-10 กรัม โดยนำใส่ถุงพลาสติกที่รูดซิปได้และมีสารดูดความชื้น เขียนชื่อผู้เก็บ สถานที่เก็บ หมายเลขและวันที่เก็บตัวอย่างให้ชัดเจนพร้อมรูปถ่าย หนังสือนำเสนอเพื่อขอความช่วยเหลือ ควรเขียนให้ชัดเจนว่าต้องการให้พิสูจน์พันธุ์กรรมระดับใด (ชนิด หรือพิสูจน์เอกลักษณ์ต้นไม้) มีกี่ตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบกัตัวอย่าง มีงบประมาณที่จะใช้ดำเนินการพิสูจน์หรือไม่

กรณีคดีนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่านั้นภายหลังได้มีการเสริมศักยภาพให้สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า ดำเนินงานโดยตรงจึงไม่ขอกล่าวข้อเสนอแนะในรายละเอียดแต่ทุกคดีไม่ว่านิติวิทยาศาสตร์ป่าไม้หรือสัตว์ป่า ผู้ปฏิบัติงานวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุ์กรรมในห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอไม่ควรไปเก็บตัวอย่างในที่เกิดเหตุเองแต่ควรแต่งตั้งคณะกรรมการในระดับพื้นที่ทุกภาคส่วนในการเก็บตัวอย่างให้ เพื่อความโปร่งใสและธรรมาภิบาล และความเป็นกลาง โดยจะต้องมีการฝึกอบรมเจ้าหน้าที่ในระดับพื้นที่รองรับไว้ให้ทราบว่าจะเก็บตัวอย่างอย่างไรให้ถูกต้องรัดกุมและมีหนังสือนำเสนอให้วิเคราะห์พันธุ์กรรมอย่างเป็นทางการ พร้อมกับเจ้าหน้าที่ที่ได้รับมอบหมายนำส่งตัวอย่างของกลางอย่างเป็นทางการ ไม่ควรนำส่งของกลางทางไปรษณีย์

เอกสารอ้างอิง

- กนกกร ศรีม่วง และศุภลักษณ์ ภูมิคง. 2562. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยไม้รองเท้านารี หนวดฤๅษี จากพื้นที่สองจังหวัดภาคเหนืออาศัยเทคนิคเอเอฟแอลพี. *Naresuan Phayao Journal*. 12(2): 41-45.
- กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 2563. **ข้อมูลสถิติอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.** กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช. 110 หน้า.
- กระทรวงพาณิชย์. 2549. **การส่งออกสินค้าแยกตามรายประเทศ.** สถิติการพาณิชย์ กระทรวงพาณิชย์, กรุงเทพฯ.
- จักรพันธ์ วนิชกุล และ สุจิตรา จางตระกูล. 2548. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่โดยใช้เอเอฟแอลพีมาร์กเกอร์, น. 352-367. ใน **รายงานการประชุมความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้และสัตว์ป่า: ความก้าวหน้าของผลงานวิจัยและกิจกรรมปี 2548** 21-24 สิงหาคม 2548. โรงแรมริเจนต์, เพชรบุรี.
- จันทร์เพ็ญ บุญทอง และ สุจิตรา จางตระกูล. 2550. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์มาร์กเกอร์ในไม้สะเดา (*Azadirachta* spp.), น. 158-167. ใน **การประชุมสัมมนาความหลากหลายทางชีวภาพป่าไม้และสัตว์ป่าแบบบูรณาการ ประจำปี 2550.** กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, กรุงเทพฯ.
- ธนาคารกสิกรไทย. 2528. **ไม้เอนกประสงค์.** เอกสารวิชาการ ปีที่ 6 ฉบับที่ 1.
- ธิตี วิสารตัน, สมบูรณ์ กิรติประยูร และบัณฑิต หงส์ทอง. 2536. **ยางนา เอกสารส่งเสริมการปลูกป่า,** ฝ่ายวนวัฒนวิจัย กองบำรุง กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 80-94 หน้า.
- น้ำชาติ ประชาชื่น. 2551. **รู้ไปไม้อัด.** ข่าวสด 18 (6362): 24.
- พยงค์ ฉัตรวิรุฬห์. 2550. **กฎหมายว่าด้วยการป่าไม้.** สำนักพิมพ์นิติบรรณาการ. กรุงเทพฯ.
- พระราชกฤษฎีกา กำหนดไม้หวงห้าม พ.ศ. 2530. **ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 104 ตอนที่ 220.** หน้า 13
- ระพี สาคริก. 2535. **กล้วยไม้รองเท้านารี วิธีปลูกเลี้ยงและปัญหาการอนุรักษ์ธรรมชาติ.** สำนักพิมพ์ โอเดียน สโตร์, กรุงเทพฯ.
- รุ่งนภา พัฒนวิบูลย์, บุญฤทธิ์ ภริยากร และ วลัยพร สถิตวิบูลย์. 2544. **ไม้ไผ่ในประเทศไทย.** สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.
- รังสัน หล้าพรหม และ สุจิตรา จางตระกูล. 2548. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่บางชนิด ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์และเอเอฟแอลพี, น. 368-374. ใน **รายงานการประชุมความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้และสัตว์ป่า: ความก้าวหน้าของผลงานวิจัย และกิจกรรมปี 2548** 21-24 สิงหาคม 2548. โรงแรมริเจนต์, เพชรบุรี.
- วุฒิพงศ์ มหาคำ. 2554. DNA barcodes ของพืช: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. **วารสารพฤกษศาสตร์ไทย.** 3 (1): 1-30.

สารานุกรมสำหรับเยาวชนไทยโดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เล่ม 5. 2523. พันธุ์ป่าไม้.

แหล่งที่มา: <http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK5/chapter8/t5-8-l1.htm>, 3 กันยายน 2556.

สำนักแผนงานและสารสนเทศ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 2560. ข้อมูลสถิติป่าไม้ 2560.

125 หน้า.

สำนักอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2555. พันธุ์ไม้ป่าชายเลนในประเทศไทย (ฉบับเพิ่มเติม). โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

สุจิตรา จางตระกูล. 2535. การประยุกต์ใช้ isoenzyme gene markers และ DNA markers เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์ยีนไม้สนสองใบ ตอนที่ 1: การวินิจฉัย isoenzyme gene Loci, น. 29-36. ใน เอกสารการประชุมวิชาการป่าไม้ ประจำปี 2535. ระหว่างวันที่ 16-20 พฤศจิกายน 2535. โรงแรมลิตเติ้ลดิก, เชียงราย.

สุจิตรา จางตระกูล. 2536ก. เทคนิคใหม่ในการวิจัยทางด้านปรับปรุงพันธุ์ไม้โตเร็วเอนกประสงค์ ทิศทางการวิจัยและพัฒนาทางด้านพันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพของไม้โตเร็วเอนกประสงค์, น. 62-72. ใน โครงการสหวิทยาการบัณฑิตศึกษา. สาขาพันธุ์วิศวกรรมทางการเกษตรและอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุจิตรา จางตระกูล. 2536ข. การประยุกต์ใช้ molecular genetics เพื่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและอนุรักษ์ยีนไม้ป่าชายเลน: ตอนที่ 1 ผลการศึกษาเบื้องต้น, น. 1-12. ใน การสัมมนาแบบนิเวศป่าชายเลนแห่งชาติครั้งที่ 8: การจัดการทรัพยากรป่าชายเลนแบบยั่งยืน เล่มที่ 1 (2II-5). ระหว่างวันที่ 25-28 สิงหาคม 2536. โรงแรมวังใต้, สุราษฎร์ธานี.

สุจิตรา จางตระกูล. 2536ค. การหาแนวทางประยุกต์ใช้ molecular genetic markers เพื่อการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์ไม้ป่า: ตอนที่ 1 ผลการศึกษาเบื้องต้น, น. 156-161. ใน เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 8 เรื่อง พันธุศาสตร์ยุคใหม่. ระหว่างวันที่ 29 มีนาคม-1 เมษายน 2536. มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา, นครปฐม.

สุจิตรา จางตระกูล. 2537. ความสำคัญของข้อมูลทางพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ป่าต่อการพิจารณาวางแผนการปลูกป่าเอกสารทางวิชาการ, น. 67-78. ใน รายงานการประชุมวิชาการป่าไม้ปี 2537. ณ โรงแรมวังใต้ จ. สุราษฎร์ธานี ระหว่างวันที่ 21-25 พฤศจิกายน 2537.

สุจิตรา จางตระกูล. 2540. เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ในการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์ไม้ป่า, น. 39-47. ใน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 10 เรื่อง พันธุศาสตร์เพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมไทย. ระหว่างวันที่ 19-21 มีนาคม 2540. ตึกอบรมวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- สุจิตรา จางตระกูล. 2543. พันธุศาสตร์ป่าไม้ บทความปริทัศน์งานวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย. Review of Biodiversity Research in Thailand. น. 345-360.
- สุจิตรา จางตระกูล. 2550. การประเมินสถานภาพแหล่งพันธุกรรมของไม้โก่งกางใบเล็กและไม้โก่งกางใบใหญ่ในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและไอโซเอนไซม์ ยีน เพื่อเป็นแนวทางในการอนุรักษ์และฟื้นฟูป่า, น. 201-210. ใน การประชุมวิชาการระบบนิเวศป่าชายเลนแห่งชาติ “ป่าชายเลนรากฐานเศรษฐกิจพอเพียงของชุมชนชายฝั่ง”. ระหว่างวันที่ 12-14 กันยายน 2550. โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์บีชชะอำ, เพชรบุรี.
- สุจิตรา จางตระกูล. 2552. การจำแนกแหล่งพันธุกรรมของไม้ยมหินโดยการใช้ยีน phosphoglucose isomerase. น. 67-70, ใน การประชุมพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 16 เรื่อง “พันธุศาสตร์แก้วิกฤตพลังงานชาติ”. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี.
- สุจิตรา จางตระกูล. 2554. การจำแนกไม้สะเดาไทยและไม้สะเดาอินเดียโดยยีน Maturase K ในคลอโรพลาสต์จีโนม. เอกสารประกอบการบรรยายการประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 9 หน้า.
- สุจิตรา จางตระกูล. 2560. นิติวิทยาศาสตร์โดยใช้ดีเอ็นเอเทคโนโลยีในการวินิจฉัยชนิดพันธุ์และเอกลักษณ์ของไม้และชีเลื้อยของกลางเพื่อการบังคับใช้กฎหมายในประเทศไทย. เอกสารประกอบการบรรยายการประชุมวิชาการป่าไม้ ประจำปี 2560 ครั้งที่ 21. มิราเคิลแกรนด์คอนเวนชัน, กรุงเทพฯ. 12 หน้า.
- สุจิตรา จางตระกูล และ กิตติยา สิงห์ทอง. 2552. การจำแนกชนิดพันธุ์และสายพันธุ์ของเสื่อจากตัวอย่างชิ้นเนื้อและหนังสือที่เป็นของกลางโดยการถอดรหัสพันธุกรรม, น. 5 ใน การประชุมพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 16 เรื่อง “พันธุศาสตร์ แก้วิกฤตพลังงานชาติ”. ณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม 2552.
- สุจิตรา จางตระกูล และ กิตติยา สิงห์ทอง. 2564. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแหล่งพันธุกรรมของไม้ชิงชันในประเทศไทย, น. 98 ใน รายงานการประชุมการป่าไม้ ประจำปี พ.ศ. 2564 “84 ปีวิชาการป่าไม้ไทยเพื่อปวงชน”. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 28-30 เมษายน 2564.
- สุจิตรา จางตระกูล และ บุญชู บุญทวี. 2542. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไม้ยางนาโดยใช้ไอโซเอนไซม์ ยีนมาร์คเกอร์, น. 107-114. ใน การประชุมสัมมนาไม้ยางนาและไม้วงศ์ยาง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุจิตรา จางตระกูล และ พิษณุกร มะกลาง. 2552. การวินิจฉัยจำนวนตัวของเสื่อจากตัวอย่างชิ้นเนื้อและหนังสือที่เป็นของกลางโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์, น. 5 ใน การประชุมพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 16 เรื่อง “พันธุศาสตร์ แก้วิกฤตพลังงานชาติ”. ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม 2552. ณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี

- สุจิตรา จางตระกูล, กิตติยา สิงห์ทอง และ ชุลินนา ลาภส่งผล. 2552. ความก้าวหน้าในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในไม้พะยูน. น. 287-291. ใน **การประชุมพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16 เรื่อง “พันธุศาสตร์แก้วิกฤตพลังงานชาติ”**. ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม 2552. ณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี.
- สุจิตรา จางตระกูล, บุญชู บุญทวี และ A. E. Szmidt. 2536. การประยุกต์ใช้ isoenzyme gene markers เพื่อการวินิจฉัย clones จาก plus trees ใน grafted clone bank ของไม้สะเดาไทย, น. 20-30. ใน **รายงานการประชุมวิชาการป่าไม้ ประจำปี 2536**. ระหว่างวันที่ 20-24 ธันวาคม 2536. โรงแรมมารวย การ์เด็น, กรุงเทพฯ.
- สุจิตรา จางตระกูล, พนิดา รุ่งรัตนกุล และ กิตติยา สิงห์ทอง. 2562. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแหล่งที่มาของไม้พะยูนในประเทศไทย, น. 349-350. ใน **รายงานการประชุมการป่าไม้ ประจำปี พ.ศ. 2562 “การป่าไม้ก้าวไกล ขับเคลื่อนเศรษฐกิจไทยก้าวหน้า”**. ระหว่างวันที่ 19-21 สิงหาคม 2562. สถาบันคชบาลแห่งชาติ ในพระอุปถัมภ์ฯ องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง.
- สุจิตรา จางตระกูล, พนิดา รุ่งรัตนกุล และ นาริรัตน์ ทองบุญส่ง. 2561. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์. ใน **รายงานการประชุมการป่าไม้ ประจำปี พ.ศ. 2561 “การปฏิรูปป่าไม้แห่งชาติ”**. ระหว่างวันที่ 22-24 สิงหาคม 2561. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.
- สุจิตรา จางตระกูล, พนิดา รุ่งรัตนกุล และ นาริรัตน์ ทองบุญส่ง. 2564. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ชิงชันในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์, น. 48-56 ใน **รายงานการประชุมการป่าไม้ ประจำปี พ.ศ. 2564 “84 ปีวิชาการป่าไม้ไทยเพื่อปวงชน”**. ระหว่างวันที่ 28-30 เมษายน 2564. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.
- สุทัศน์ เดชวิสิทธิ์. 2544. **การปลูกไม้ไผ่**. พิมพ์ครั้งที่ 2. เกษตรสาส์น, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชติณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อบฉันท ไทยทอง. 2543. **กล้วยไม้ไทย**. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.
- อุทาร์ตน์ ภูไพบูลย์, บางรักษ์ เชษฐสิงห์, วัลยุท เพื่องวิวัฒน์ และ วิเชียร ปิยาจารประเสริฐ. 2559. **คุณลักษณะของไม้ไทย**. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ส. มงคลการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- อุไร จิรมงคลการ. 2545. **กล้วยไม้รองเท้านารี**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.
- Abe, H., U. Watanabe, K. Yoshida, K. Kuroda and C. Zhang. 2011. Changes in organelle and DNA quality, quantity, and distribution in the wood of *Cryptomeria japonica* over long-term storage. *IAWA Journal*. 32 (2): 263–272.

- Amaral, W. 2001. Characterization, evaluation and conservation of forest genetic resources. The Potential and limitation of new biotechnology tools, Pp. 115-125. *In* R. Uma Shaanker, K.N. Ganeshaiah and Kamaljit S. Bawa, eds. **Forest Genetic Resources: Status, Threats and Conservation Strategies**. Oxford & IBH Publishing, New Delhi/Calcutta.
- Arnaud-Haond, S., C. M. Duarte, S. Teixeira, S. I. Massa, J. Terrados, N. H. Tri, P. N. Hong and E. A. Serrão. 2009. Genetic recolonization of mangrove: genetic diversity still increasing in the Mekong Delta 30 years after Agent Orange. **MEPS**. 390: 129-135.
- Bergman, F. and H. H. Hattermer. 1998. Isozymes in forest genetics research, Pp. 227-238. *In* A.K. Mandal, L. Andg and Gibson, eds. **Forest genetics and tree breeding**. CBS Publishers, New Delhi.
- Bhargava, M. and A. Sharma. 2013. DNA Barcoding in Plants: Evolution and Applications of In Silico Approaches and Resources. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 67(3): 631-641.
- Blakesley, D., G. Pakkad, C. James, F. Torre and S. Elliott. 2004. Genetic diversity of *Castanopsis acuminatissima* (Bl.) A. DC. in northern Thailand and the selection of seed trees for forest restoration. **New Forests**. 27: 89–100.
- Bon, M.-C., B. Basri, H. Aliand and H. Joly. 1995. Isozyme variability of two rattan species from isozyme markers, Pp. 219-225. *In* T.J.B. Boyle and B. Boontawee, eds. **Measuring and monitoring biodiversity in Tropical and temperate forests**. Proc. IUFRO Symposium.
- Boontong, C., M. Pandey, S. Changtragoon. 2009. Isolation and characterization of microsatellite markers in Indian neem (*Azadirachta indica* var. *indica* A.Juss) and cross-amplification in Thai neem (*A. indica* var. *siamensis* Valenton). **Conserv Genet**. 10: 669-671.
- Bowcock, A. M., A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, J. R. Kidd and L. L. Cavalli- Sforza. 1994. High Resolution of Human Evolution with Polymorphic Microsatellites. **Nature**. 368: 455-457.
- Brown, A. H. D. 1978. Isoenzymes, plant population genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**. (52): 145-157.
- Byrne, M., G.F. Moran and J. Murrell. 1992. Progress on a genetic linkage map in Eucalypts. *In* **Proc. Third Australasian Gene Mapping Workshop**. July 1992. Univ. of Queensland, Brisbane.
- Cbol Plant Working Group. 2009. **A DNA Barcode for Land Plants**. Proceeding of the National Academy of Sciences 106(31): 12794-12797.
- Cerón-Souza, I., E. Rivera-Ocasio, E. Medina, J. A. Jimenez, W. O. Mcmillan and E. Bermingham. 2010. Hybridization and Introgression in New World Red Mangroves, *Rhizophora* (RHIZOPHORACEAE). **Am J Bot**. 97(6): 945-957.

- Changtragoon, S. 1984. **Variation in Growth, Seed and Pollen Characteristics of *Pinus Merkusii* jungh. and de Vriese**. M.S. Thesis, Kasetsart University.
- Changtragoon, S. 1996. Clonal identification of forest tree species by isoenzyme gene markers, Pp. 66-67. *In* **FORTROP'96: Tropical Forestry in the 21st Century**. 25-28 November 1996. Kasetsart University, Bangkok.
- Changtragoon, S. 1997. Isoenzyme analysis of the breeding population of *Acacia auriculiformis*, Pp. 216-219. *In* **The Third International Acacia Workshop**. 26-30 October 1997. Hanoi, Vietnam.
- Changtragoon, S. 1998. "Application of Molecular Markers in Forest trees for developing countries", Pp. 111-114. *In* **The 7th Annual international conference of BIOREFOR**. 3 - 5 November 1998. Manila, Phillipins.
- Changtragoon, S. 2000. Application of isoenzyme gene markers in the identification of *Acacia auriculiformis* elite trees and hybrids, Pp.241-245. *In* **Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees Proceedings of QFRI/CRC-SPF Symposium**. 9-14 April 2000. Noosa, Queensland, Australia.
- Changtragoon, S. 2001a. Forest genetic resources of Thailand: Status and conservation, Pp. 141-151. *In* Uma Shaanker, R., Ganesaiah, K.N. and Kamaljit S. Bawa, eds. **Forest Genetic Resources: Status, Threats and Conservation Strategies**. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.
- Changtragoon, S. 2001b. Evaluation of genetic diversity of *Dipterocarpus alatus* genetic resources in Thailand using isozyme gene markers, Pp. 351-356. *In* **"ex situ and in situ Conservation of Commercial Tropical Trees: the Contribution of Genetic Resource Conservation to Tree Breeding, Biotechnology, and Future Commercial Plantation Programs"**. 11-13 June 2001. Yogyakarta, Indonesia.
- Changtragoon, S. 2003a. The Potential for Using Molecular Markers to Facilitate Gene Management and the *in situ* and *ex situ* Conservation of Tropical Forest Trees, Pp. 305-315. *In* **Proceedings of the Asia Pacific Forest Genetic Resources Programme (APFORGEN) Inception Workshop**. 15-18 July 2003. Kepong, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Changtragoon, S. 2003b. Opportunities in using the conservation of biodiversity to alleviate poverty in Thailand, Pp. 167-172. *In* **Proceeding of the workshop Forest for Poverty Reduction: Opportunities with clean development mechanism environmental services and biodiversity**. 27-29 August 2003. Seoul, Korea.

- Changtragoon, S. 2005. The molecular genetic approach to forest genetic conservation and plantation management, Pp. 206-221. *In* **International Seminar on Plantation Forest Research and Development**. 21-22 November 2005. Yogyakarta, Indonesia.
- Changtragoon, S. 2010. Identification of Origin of Confiscated Oranutans by using DNA sequencing, Pp.37. *In* **Inaugural meeting on Society for Wildlife Forensic Science**. 18-23 April 2010. Historic Ashland Spring Hotel, Ashland, Oregon. USA.
- Changtragoon, S. 2011. DNA Barcoding of Wild Plants in Thailand Using matK Gene, Pp. 39. *In* **15th Floral of Thailand Meeting**. 7-11 November 2011. Chiang Mai, Thailand.
- Changtragoon, S. 2012. Wildlife Forensics in Thailand; Utilization of Mitochondrial DNA Sequences. Pp.327-342. *In* Jane E. Huffman and John R. Wallace. Wiley-Balckwell, A John Wiley & Sons, eds. **Wildlife Forensics Methods and Application**. Ltd., Publication.
- Changtragoon S. and B. Boontawee. 1999. The study of genetic diversity of *Dipterocarpus alatus* by isoenzyme gene markers, Pp 107-114. *In* **Seminars on Dipterocarpus alatus and DIPTEROCAPACEAE**. 17-18 November 1999. Kasetsart University, Bangkok, Thailand
- Changtragoon, S. and R. Finkeldey. 1995a. Patterns of genetic variation and characterization of the mating system of *Pinus merkusii* in Thailand. **Forest Genetics**. 2 (2): 87-97.
- Changtragoon, S. and R. Finkeldey. 1995b. Genetic variation of *Pinus merkusii* in Thailand. I: Genetic analysis of isozyme phenotypes. **Journal of Tropical Forest Science**. 8 (2): 167-177.
- Changtragoon, S. and R. Finkeldey. 2000. Der Nutzen von Genmarkern fuer die Erhaltung forstgenetischer Ressourcen in Thailand. **For. Snow Landsc. Res.** 75 (1/2): 153-162.
- Changtragoon, S. and P. Maklang. 2010. Identification of the number of individuals from confiscated tiger samples by using microsatellite markers, Pp. 47. *In* **Inaugral meeting on Society for Wildlife Forensic Science**. 18-23 April 2010. Historic Ashland Spring Hotel, Ashland, Oregon.
- Changtragoon, S. and K. Singthong. 2010a. Identification of species and subspecies of tiger from confiscated tiger samples by using mtDNA sequencing, Pp. 47-48. *In* **Inaugral meeting on Society for Wildlife Forensic Science**. 18-23 April 2010. Historic Ashland Spring Hotel, Ashland, Oregon. USA.
- Changtragoon, S. and K. Singthong. 2010b. Identification of *elephant* species from ivory products using mt DNA sequence of Cytochrome b gene, Pp. 34. *In* **Inaugral meeting on Society for Wildlife Forensic Science**. 18-23 April 2010. Historic Ashland Spring Hotel, Ashland, Oregon.

- Changtragoon, S. and K. Singthong. 2012. Identification of Subspecies and number of individuals from confiscated tigers (*Panthera tigris*) meat samples from wildlife check points in Thailand by using mitochondrial DNA sequencing and microsatellites markers. *In The 2012 Society for Wildlife Forensic Science Jackson Meeting*. Jackson lake lodge, Jackson, USA. (Abstract)
- Changtragoon, S. and K. Singthong. 2016. Identification of *Dalbergia cochinchinensis* from other *Dalbergia* spp. using SNPs in maturase K gene. *In Proceedings of the International Conference on Climate Change, Biodiversity and Ecosystem Services for the Sustainable Development Goals (SDGs): Policy and Practice*. 27-29 June 2016. Cha-am, Phetchaburi, Thailand. (Poster)
- Changtragoon, S. and A. E. Szmidt. 1993. An integrated population genetic approach to conserve forest tree diversity in Thailand, Pp. 9. *In ASEAN Seminar on management and conservation of biodiversity*. Session III.
- Changtragoon, S. and A. E. Szmidt. 1997. The evaluation of genetic diversity and resources of tropical forest trees in Thailand by using molecular markers, Pp. 169-171. *In The 6th Annual International Workshop of BIO-REFOR*. 2-9 December 1997. The University of Queensland, Brisbane.
- Changtragoon, S. and A. E. Szmidt. 1999. Genetic diversity of Teak by means isoenzyme gene markers, Pp. 13. *In International Teak Conference: Teak Beyond Year 2000*. 23-25 August 1999. Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand.
- Changtragoon, S. and A. E. Szmidt. 2000. Genetic diversity of teak (*Tectona grandis* Linn. F.) in Thailand revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Pp. 82-83. *In IUFRO Working Party 2.08.01 Tropical Species Breeding and Genetic Resources: Forest Genetics for the Next Millennium*. International Conferences Centre. 8-13 October 2000. Durban, South Africa.
- Changtragoon, S. and K. C. Woo. 1996. Application of isoenzyme gene markers in the breeding of *Acacia auriculiformis* hybrid, Pp 189-190. *In* Dieters MJ, Matheson AC, Nikles DG, Harwood CE and Walker SM, eds. *Tree Improvement for Sustainable Tropical Forestry*, QFRI-IUFRO Conference. 27 Oct-1 Nov 1996. QFRI Publication. Caloundra, Queensland.
- Changtragoon, S., S. Havanond and K. Singthong 2016. Identification of a natural mangrove hybrid of *Rhizophora* in Thailand using SNPs in nuclear and chloroplast regions. Pp. 52-57. *In Proceedings of the International Conference on Climate Change, Biodiversity and Ecosystem Services for the Sustainable*.

- Changtragoon, S., R. Jalonen and A. J. Lowe. 2017. Use of Molecular Markers in the Conservation Management of Tropical Trees, Pp. 155-195. *In* M.R. Ahuja and S. Mohan Jain, eds. **Biodiversity and Conservation of Woody Plants, Sustainable Development and Biodiversity**. Springer International Publishing, Switzerland.
- Changtragoon, S., A. E. Szmidt and B. Boontawee. 1996a. The study of genetic diversity of *Azadirachta* spp. by using isoenzyme analysis, Pp. 353-360. *In* **The Proceedings of the third Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology**. 10-15 November, Melia Hotel, Hau Hin, Thailand.
- Changtragoon, S., A. E. Szmidt and R. V. Roa. 2001. Evaluating genetic diversity of rattan (*Calamus palustris*) genetic resources by using isoenzyme gene markers, Pp. 173-175. *In* **10th International Workshop of BIO-REFOR: Sustainable Forest Management System and Biodiversity**. 9-11 October 2001. Tokyo, Japan.
- Changtragoon, S., A. E. Szmidt and X-R. Wang. 1995. Genetic diversity of rattan in Thailand: I- Preliminary results, Pp. 39-43. *In* **IPGRI Workshop: Molecular Techniques in Plant Genetic Resources**. 9-11 October, Rome.
- Changtragoon, S., A. E. Szmidt and X-Ru Wang. 1996b. Genetic diversity of rattan in Thailand by means of RAPD analysis: Preliminary results, *In* **IUFRO'96 conferences on Diversity and adaptation in forest ecosystems in a changing world**. 5-9 August, 1996. University of British Columbia, Vancouver, Canada. (Poster Abstract)
- Changtragoon, S., P. Roongrattanakul, V. Luangviriyasaeng and K. C. Woo. 1998. The identification of hybrid genotypes from *Acacia auriculiformis* elite trees by using isoenzyme gene markers, Pp. 327-329. *In* **The 4th ASIA-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology**. 13-16 July 1998, Darwin, Australia. Development Goals (SDGs): Policy and Practice. 27-29 June 2016, Cha-am, Phetchaburi, Thailand.
- Chokchaichamnankit, P., W. Chulalaksananukul, C. Phengklai and K. Anamthawat-Jónsson. 2008. Species and genetic diversity of FAGACEAE in northern Thailand based on ISSR markers. **Journal of Tropical Forest Science**. 20(1): 8-18.
- Chong, D. K. X., R.-C. Yang and F. C. Yeh. 1994. Nucleotide divergence between populations of trembling aspen (*Populus tremuloides*) estimated with RAPDs. **Current Genetics**. 26: 374-376.
- Conkel, M. T., P. D. Hodgskiss, L. B. Nunnally, and S. C. Hunter. 1982. **Starch gel electrophoresis of conifer seeds: A laboratory manual. General technical report PSW-64**. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Berkeley, California. p. 18.

- Cooling, E. N. G. 1968. *Pinus merkusii*. Fast Growing Timber Trees of Lowland Tropics, No.4. Commonwealth Forestry Institute, Oxford.
- Cowan, R. S., M. W. Chase, W. J. Kress and V. Savolainen. 2006. 300,000 Species to Identify: Problems, Progress, and Prospects in DNA Barcoding of Land Plants. **TAXON**. 55(3): 611-616.
- Cracraft, J., J. Feinstein, J. Vaughn and K. Helm-Bychowski. 1998. Sorting out tigers (*Panthera tigris*): mitochondrial sequences, nuclear inserts, systematics, and conservation genetics. **Animal Conservation**. 1:139-150.
- CTSP. 2004. **Cambodian tree species**. Monographs. Cambodia: Cambodia Tree Seed Project, FA, and DANIDA, Denmark.
- Cuenoud, P., V. Savolainen, L.W. Chatrou, M. Powell, R.J. Grayer and M.W. Chase. 2002. Molecular Phylogenetics of *Caryophyllales* Based on Nuclear 18S rDNA And Plastid *rbcl*, *atpB*, and *matK* DNA Sequences. **American Journal Botany**. 89(1): 132-144.
- Dale, G., C. Gates, H. Voge, F. Daggard and R. Teasdale. 1993. Mapping of the interspecific hybrid between *Pinus cribaea* and *Pinus elliottii* using RAPD markers, Pp. 223-224. In IMRIE, C.C., eds. **Focused plant improvement: towards responsible and sustainable agriculture, The 10th Australian Plant Breeding Conference Organising Committee**. Brisbane.
- Degen, B., A. Höltsken and M. Rogge. 2010. Use of DNA-Fingerprints to Control the Origin of Forest Reproductive Material. **Silvae Genetica**. 59(6): 268-273.
- Degen, B., S. E. Ward, M. R. Lemes, C. Navarro, S. Cavers and A. M. Sebbenn. 2013. Verifying the geographic origin of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) with DNA-fingerprints. Forensic Science International: **Genetics**. 7: 55–62.
- Deguilloux, M. F., M. H. Pemonge and R. J. Petit. 2014. Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. **Proc Biol Sci**. 22; 269(1495): 1039-46.
- Demesure, B., N. Sodji and R. J. Petit. 1995. A Set of Universal Primers for Amplification of Polymorphic Non-Coding Regions of Mitochondrial and Chloroplast DNA in Plants. **Mol. Ecol**. 4:129–131.
- Deshwal, R. P., R. Singh, K. Malik and G. J. Randhawa. 2005. Assessment of Genetic Diversity and Genetic Relationships among 29 Populations of *Azadirachta Indica* A. Juss. Using RAPD Markers. **Genetic Resources and Crop Ecolution**. 52(3): 285-292.
- Dhillon, R. S., T. Mohapatra, S. Singh, K. S. Boora and K. Singh. 2007. Assessment of Genetic Diversity in *Azadirachta Indica* Based on DNA Fingerprinting. **Indian Journal of Biotechnology**. 6(4): 519-524.

- Diallo, B. O., H. I. Joly, D. McKey, M. Hosaert-McKey and M. H. Chevallier. 2007. Genetic diversity of *Tamarindus indica* populations: Any clues on the origin from its current distribution?. **African Journal of Biotechnology**. 6(7): 853-860.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. **Focus**. 12: 13-15.
- Dransfield, S. and E. A. Widjaja. 1995. **Plant Resource of South East Asia (PROSEA) No.7**, Bamboos. Bogor, Indonesia.
- Duke, N. C. and X. J. Ge. 2011. *Bruguiera* (RHIZOPHORACEAE) In the Indo-West Pacific: A Morphometric Assessment of Hybridization within Single-Flowered Taxa. **Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants**. 56(1): 36-48.
- Edwards, A., A. Civitello, H. A. Hammond and C. T. Caskey. 1991. DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats. **American Journal of Human Genetics**. 49: 746-756.
- Edwards, A., H. A. Hammond, L. Jin, C. T. Caskey and R. Chakraborty. 1992. Genetic Variation at Five Trimeric and Tetrameric Tandem Repeat Loci in Four Human Population Groups. **Genomics**. 12: 241-253.
- Eriksson, G., B. Schelander and V. Akebrand. 1973. Inbreeding depression in an old experimental plantation of *Picea abies*. **Hereditas**. 73: 185-193.
- FAO. 2001. **Forest genomics for conserving adaptive genetic diversity**. Forest Genetic Resources Working Papers, Working Paper FGR/3 (July 2001), Forest Resources Development Service, Forest Resources Division, FAO, Rome.
- FAO/UNDP. 1968. **Thailand-Paper and Pulp Material Survey**, final report. UNDP/SF Report 46/tha/11. Vol.1 p. 25-30.
- Farrelly, D. 1984. **The Book of Bamboo: A comprehensive guide to this plant, its uses and its history**. Sierra Club, San Francisco, CA, United States of America. p. 340.
- Fatima, T., A. Srivastava, P. V. Somashekar, V. S. Hanur and M. S. Rao. 2019. Development of DNA-Based Species Identification and Barcoding of Three Important Timbers. **The National Research Centre**. 43:76.
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the Comparative Method. **The American Naturalist**. 125(1): 1-15.
- Filppula, S., A. E. Szmidt and O. Mäona. 1992. Genetic comparison between *Pinus sylvestris* L. and *P. mugo* Turra using allozymes and chloroplast DNA. **Nordic Journal of Botany**. 12: 381-386.

- Finkeldey, R. 1992. The hybrid origin of *Paulownia taiwaniana* Hu and Chang-evidence from isozyme gene markers. **Silvae Genetica**. 41: 4-5.
- Finkeldey, R. 1998. **An Introduction to Tropical Forest Genetics**. Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August-University Goettingen, Germany. (Lecture Notes).
- Finkeldey, R. and H. H. Hattemer. 1993. Gene resources and gene conservation with emphasis on Tropical Forests. **FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter**. 94(95): 5-10.
- Finkeldey, R., N. D. Guzman and S. Changtragoon. 1998. Inheritance of isozyme phenotypes in *Pterocarpus indicus* Willd. **Forest Genetics**. 5(3): 165-170.
- Finkeldey, R., N. D. Guzman and S. Changtragoon. 1999. The mating system of *Pterocarpus Indicus* Willd. at Mt. Makiling, Philippines. **Biotropica**. 31(3): 525-530.
- Fischer, D. and K. Bachmann. 1998. Microsatellite Enrichment in Organisms with Large Genomes (*Allium Cepa* L.). **Biotechniques**. 24: 796-802.
- Fofana, I. J., D. Ofori, M. Poitel and D. Verhaegen, 2009. Diversity and genetic structure of teak (*Tectona grandis* Lf) in its natural range using DNA microsatellite markers. **New forests**. 37(2): 175-195.
- Fofana, I. J., Y. J. Lidah, N. Diarrassouba, S. P. A. N'guetta, A. Sangare and D. Verhaegen. 2008. Genetic structure and conservation of Teak (*Tectona grandis*) plantations in Côte d'Ivoire, revealed by site specific recombinase (SSR). **Tropical Conservation Science**. 1(3): 279-292.
- Forbes, S. H., J. T. Hogg, F. C. Buchanan, A. M. Crawford and F. W. Allendorf. 1995. Microsatellite Evolution in Congeneric Mammals: Domestic and Bighorn Sheep. **Molecular Biology and Evolution**. 12: 1106-1113.
- Forster, P. and G. Moser. 2000. **Status Report on Global Neem Usage**. Universum Verlagsanstalt, Germany.
- Furman, B., J. D. Grattapaglia, W. S. Dvorak and D. M. Omalley. 1997. Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. **Molecular Ecology**. 6: 321-331.
- Gardner S., P. Sidisunthorn and V. Anusamsunthorn. 2000. **A Field Guide to Forest Trees of Northern Thailand**. Kobfai Publishing Project, Bangkok.
- Ge, X. J. and M. Sun. 2001. Population genetic structure of *Ceriops tagal* (RHIZOPHORACEAE) in Thailand and China. **Wetl Ecol Manag**. 9: 213-219.
- Gillet, E. 1994. **GSED. Genetic Structures from Electrophoresis Data**. Version 1.0. User's Manual. Department of Forest Genetic. Göttingen, Germany, p. 49.

- Gregorius, H. R. and J. H. Roberds. 1986. Measurement of genetical differentiation among subpopulations. **Theor. Appl. Genet.** 71: 828-834.
- Guo, L. 1989. Medical value of bamboo. *Bamboo*. **Arbst.** 2(2): 44-45.
- Haines, R. 1994. Biotechnology in forest tree improvement. *FAO Forestry Paper*. 118: 230.
- Hamrick, J. L., M. J. W. Godt and S. L. Sherman-broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**. 6: 95-124.
- Hamrick, J. L., M. J. W. Godt, D. A. Murawski and M. D. Loveless. 1991. Correlations between species Traits and allozyme diversity: implications for conservation biology, Pp. 75-86. *In* Falk, D. A.; K. E. Holsinger, eds. **Genetics and Conservation of Rare Plants**. Oxford, New York.
- Hancock, J. M. 1995. The Contribution of Slippage-Like Processes to Genome Evolution. **Journal of Molecular Evolution**. 41: 1038-1047.
- Hancock, J. M. 1999. Microsatellites and Other Simple Sequence: Genomic Context and Mutational Mechanism. Pp. 1-23. *In* D. B. Goldstein and C. Schlotterer, eds. **Microsatellites Evolution and Applications**. Oxford University Press, UK.
- Hansen, O. K., S. Changtragoon, B. Ponoy, E. D. Kjær, R. Finkeldey, K. B. Nielsen and L. Gaudal. 2015. Genetic resources of teak (*Tectona grandis* Linn. f.) strong genetic structure among natural populations. **Tree Genetics & Genomes**. 11(1): 1-16.
- Hassold, S., P. P. Lowry, M. R. Bauert, A. Razafintsalama, L. Ramamonjisoa and A. Widmer. 2016. DNA Barcoding of Malagasy Rosewoods: Towards a Molecular Identification of CITES-Listed *Dalbergia* Species. **PLoS ONE**. 11(6): e0157881.
- Hattermer, H. H. 1995. Concepts and requirements in the conservation of forest genetic resources. **Forest Genetics**. (2): 125-134.
- Hattermer. H. H. and F. Bergmann. 1987. **Einführung in die Genetik für Studierende der Forstwissenschaft**. J. D. Sauerlander's Verlag Frankfurt am Main. p. 268.
- Hattermer, H., F. Bergmann and M. Ziehe. 1993. **Einführung in die Genetik für Studierende der Forstwissenschaft**. J.D. Sauerlaender Verlag, Frankfurt am Main. p. 492.
- Harith, J. M., A. Retno and I. Aziz. 2013. Determination of phylogenetic and molecular characteristics of three Malaysian ginger cultivars (*Zingiber officinale* roscoe) using microsatellite DNA. **Tropical Life Sciences Research**. 24(2): 65-76.
- Harry, D. E., B. Temesgen and D. B. Neale. 1998. Codominant PCR-based marker for *Pinus taeda* developed from mapped cDNA clones. **Theor. Appl. Genet.** (97): 327-336.

- Hartvig, I., M. Czako, E. D. Kjaer, L. R. Nielsen and I. Theilade. 2015. The Use of DNA Barcoding in Identification and Conservation of Rosewood (*Dalbergia* spp.). **PLoS ONE**. 10(9): e0138231.
- Hartvig, I., T. So, S. Changtragoon, H. T. Tran, S. Bouamanivong, I. Theilade, E. D. Kjaer and L. R. Nielsen. 2017. Population Genetic Structure of The Endemic Rosewoods *Dalbergia cochinchinensis* and *D. Oliveri* at a Regional Scale Reflects the Indochinese Landscape and Life-History Traits. **Ecology and Evolution**. 8(1): 530-545.
- Hedrick, P. W. 2001. Conservation genetics: where are we now?. **Trends in Ecology & Evolution**. 16(11): 629-636.
- Hollingsworth, P. M., S. W. Graham and D. P. Little. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. **Plos One**. 6(5): 19254.
- Hong, Y., B. Ponoy and J. E. Carlson. 1992. DNA fingerprinting of conifer genomes using RAPD markers. In **Proc. Of Sixth Meeting of the International Conifer Biotechnology Working Group**, April 1992. Raleigh, North Carolina, N.C. State University.
- Inomata N., X. R. Wang, S. Changtragoon and A. E. Szmidt. 2009. Levels and Patterns of DNA Variation in Two Sympatric Mangrove Species, *Rhizophora Apiculata* and *R. Mucronata* from Thailand. **Genes and Genetic Systems**. 84(4): 277-286.
- International Tropical Timber Organization. 2005. **Status of tropical forest management 2005**: Summary Report. Tropical Timber Organization. p. 35.
- Isabel, N., J. Beaulieu and J. Bousquet. 1995. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92: 6369-6373.
- IUCN. 2006. **Red List of Threatened Species**. Available Source: www.iucnredlist.org.
- Janczewski, D. N., D. Goldman and S. J. O'Brien. 1990. Molecular genetic divergence of orangutan *Pongo pygmaeus* subspecies based on isozyme and two-dimensional gel electrophoresis. **Journal of Heredity**. 81(5): 375-387.
- Jiao, L., Y. Yin, Y. Cheng and X. Jiang. 2013. DNA barcoding for identification of the endangered species *Aquilaria sinensis*: comparison of data from heated or aged wood samples. **Holzforschung**. 68(4): 487-494.
- Jiao, L., Y. Yin, F. Xiao, Q. Sun, K. Song and X. Jiang. 2012. Comparative analysis of two DNA extraction protocols from fresh and dried wood of *cunninghamia lanceolata* (TAXODIACEAE). **IAWA Journal**. 33(4): 441-456.

- Jiao, L., M. Yu, A. C. Wiedenhoef, T. He, J. Li, B. Liu, X. Jiang and Y. Yin. 2018. DNA Barcode Authentication and Library Development for the Wood of Six Commercial *Pterocarpus* Species: The Critical Role of Xylarium Specimens. **Scientific Reports**. 8:1945.
- Jolivet, C. and B. Degen. 2012. Use of DNA fingerprints to control the origin of sapelli timber (*Entandrophragma cylindricum*) at the forest concession level in Cameroon. **Forensic Science International**. 6(4): 487-493.
- Jones, M. L. 1969. The geographical races of orangutan. Proc. 2nd Int. Cong. **Primat**. 2: 217–223.
- Kanthaswamy, S. and D.G. Smith. 2002. Population subdivision and gene flow among wild Orangutans. **Primates**. 43(4): 315-327.
- Kaosa-ard, A. 1986. **Teak (*Tectona grandis* Linn.f.) in ASAEN: A Survey Report**. ASAEN/CANADA Forest Tree Seed Centre. p. 60.
- Kaosa-ard, A. 1991. Teak (*Tectona grandis* Linn. F.) in Thailand. In **China/ESCAP/FAO Regional Seminar on Research and Development of Teak**. Country Report, Guangzhou, China.
- Karesh, W., H. Frazier, D. Sajuthi, M. Andau, F. Gombek, L. Zhi D. Janczewski and S. J. O'Brien. 1997. Orangutan genetic diversity, Pp. 123-126. In Sodaro C., ed. **Orangutan species survival plan husbandry manual**. Chicago: Chicago Zoological Park.
- Karp, A., O. Seberg and M. Buiatti. 1996. Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. **Annals of Botany**. (78): 143-149.
- Karp, A., S. Kresovich, K. V. Bhat, W. G. Ayad and T. Hodgkin. 1997. **Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies**, IPGRI Technical Bulletin No. 2. p. 47.
- Kathleen, J. C., D. O. Jeffrey and V. A. Mary. 2007. Application of plant DNA markers in forensic botany: Genetic comparison of *Quercus* evidence leaves to crime scene trees using microsatellites. **Forensic Science International**. 165(1): 64-70
- 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.
- Kenta, T., Y. Isagi, M. Nakagawa, M. Yamashita and T. Nakashizuka. 2004. Variation in pollen dispersal between years with different pollination conditions in a tropical emergent tree. **Molecular Ecology**. 13: 3575–3584.
- Kertardikara, A. W. S. and D. Prat. 1995. Isoenzyme variation among teak provenances. **Theor. Appl. Genet**. 90(6): 803-810.

- Kevin, K., S. NG, S. L. Lee and C. L. Koh. 2004. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**. 10.1046: 1365-294X.
- Kiel, M. and A. R. Griffin. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the Discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. **Theor. Appl. Genet.** 89: 442-450.
- Kitamura, K. and M. Y. B. A. Rahman. 1992. Genetic diversity among natural populations of *Agathis borneensis* (ARAUCARIACEAE), a tropical rain forest conifer from Brunei Darussalam, Borneo, Southeast Asia. **Canadian Journal of Botany**. 70: 1945-1949.
- Kjaer, E. D., and H. R. Seigismund. 1996. Allozyme diversity in two Tanzanian and two Nicaraguan landraces of teak (*Tectona grandis* L.). **Forest Genetics**. 3: 45-52.
- Kjaer, E. D. and V. Suangtho, 1995. **Outcrossing rate of teak (*Tectona grandis* (L.))**. *Silvae Genetica*. 44: 175-177.
- Kjaer, E. D., H. R. Siegismund and V. Suangtho. 1996. **A Multivariate study on genetic variation in teak (*Tectona grandis* (L.))**. *Silvae Genetica*. 45(5-6): 361-368.
- Kremer, A., R. Petit, A. Zanetto, V. Fougere, A. Ducouso, D. Wagne and C. Chauvin. 1991. Nuclear and organelle gene diversity in *Quercus robur* and *Q. petraea*. Pp. 141-166. In Muller-Starck, G. and M. Ziehe, eds. **Genetic variation in European populations of forest trees**. Sauerlander's Verlag, Frankfurt am Main.
- Kress, W. J. 2017. Plant DNA Barcodes: Applications Today and In the Future. **Systematics and Evolution**. 55(4): 291-307.
- 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(23): 8369-8374.
- Kristensen, V. N., D. Kelefiotis, T. Kristensen and A.-L. Borrensens-Dale. 2001. High-throughput methods for detection of genetics variation. **Bio. Techniques**. (30): 318-332.
- Krutovskii, K. V. and D. B Neale. 2001. Forest genomics for conserving adaptive genetic diversity. **Forest Genetic Resources**. (29): 7-9.
- Kulkarni, M. and U. Deshpande. 2006. RAPD Based Fingerprinting of Tomato Genotypes for Identification of Mutant and Wild Cherry Specific Markers. **Journal of Plant Sciences**. 1: 192-200.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**. 5: 150-163.

- Lagercrantz, U., H. Ellegren and L. Andersson. 1993. Abundance of Various Polymorphic Microsatellite Motifs Differs Between Plants and Vertebrates. **Nucleic Acids Research**. 21: 1111-1115.
- Langlet, O. 1940. Om utvecklingen av granar ur fröe efter självbefruktning och efter frivindpollinering. **Medd. Statens Skogsfoersoeksanst.** 32: 1-22.
- Lebonah, D., A. Dileep, K. Chandrasekhar, S. Sreevani, B. Sreedevi and J. PramodaKumari. 2014. DNA barcoding on bacteria: a review. **Adv. Biol.** 1–9.
- Lee, C. T., S. L. Lee, Q. Z. Faridah, S. S. Siraj, K. K. S. Ng, B. Norlia and M. N. MAT-ISA. 2006. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Koompassia malaccensis* (LEGUMINOSAE), an important tropical timber species. **Molecular Ecology Notes**. 6: 1198-1201.
- Lee, S. L., M. C. Ang and M. Norwati. 2000. Genetic diversity of *Dryobalanops aromatica* gaertn. f. (DIPTEROCARPACEAE) in peninsular Malaysia and its pertinence to genetic conservation and tree improvement. **Forest Genetics**. 7(3): 211-219.
- Lee, S. Y., D. U. Lamasudin and R. Mohamed. 2019. Rapid detection of several endangered agarwood-producing *Aquilaria* species and their potential adulterants using plant DNA barcodes coupled with high-resolution melting (Bar-HRM) analysis. **Holzforschung**. Previously published online xx.
- Lee, S. Y., W. L. Ng and R. Mohamed. 2016. Rapid species identification of highly degraded agarwood products from *Aquilaria* using real-time PCR. **Conservation Genet Resour.** 8(4): 581-585.
- Lee, S. Y., J. Weber and R. Mohamed. 2011. Genetic variation and molecular authentication of selected *Aquilaria* species from natural populations in Malaysia using RAPD and SCAR markers. **Asian Journal of Plant Sciences**. 10(3): 202-211.
- Lee, S. L., N. Tani, K. K. S. Ng and Y. Tsumura. 2004a. Characterization of 15 polymorphic microsatellite loci in an endangered tropical tree *Hopea bilitonensis* (DIPTEROCARPACEAE) in Peninsular Malaysia. **Molecular Ecology Notes**. 4(2): 147-149.
- Lee, S. L., N. Tani, K. K. S. Ng and Y. Tsumura. 2004b. Isolation and characterization of 20 microsatellite loci for an important tropical tree *Shorea leprosula* (DIPTEROCARPACEAE) and their applicability to *S. parvifolia*. **Molecular Ecology Notes**. 4(2): 222-225.
- Levinson, G. and G. A. Gutman. 1987. High Frequency of Short Frame Shifts in Poly-Ca/Gt Tandem Repeats Borne by Bacteria phage M13 In *E. Coli* K-12. **Nucleic Acid Research**. 15: 5323-5338.

- Li, C. H., M. Y. Hidayat, Y. K. Fong and Y. Hong. 2010. Isolation and Characterization of 18 Polymorphic Microsatellite Loci for *Pterocarpus Indicus* (LEGUMINOSAE). **Molecular Ecology Resources**. 10: 1098–1105.
- Li, Q., J. Wu, Y. Wang, X. Lian, F. Wu, L. Zhou, Z. Huang and S. Zhu. 2017. The Phylogenetic Analysis of *Dalbergia* (FABACEAE: PAPILIONACEAE) Based on Different DNA Barcodes. **Holzforschung**. 71(12): 939–949.
- Liengsiri, C., F. C. Yeh and T. J. B. Boyle. 1995. Isozyme analysis of a tropical forest tree, *Pterocarpus marcocarpus* Kurz. in Thailand. **Forest Ecology and Management**. 74: 13-22.
- Lindgren, D. 1993. The population biology of clonal development, Pp. 35-49. *In* Ahuja, M.R. and Libby, W.J., eds. **Clonal Forestry I, Genetics and Biotechnology**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Litt, M. and J. A. Luty. 1989. A Hypervariable Microsatellite Revealed By In Vitro Amplification of Dinucleotide Repeat with in the Cardiac Muscle Actin Gene. **Amer. J. Hum. Genet.** 44: 388-396.
- Liu, Z., and G. R. Furnier. 1993. Comparison of allozyme RFLP and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. **Theor. Appl. Genet.** 87: 97-105.
- Lou, S., J. Kim, W. E. Johnson, J. Walt, J. Martenson, N. Yuhki, D. G. Miquelle, O. Uphyrkina, J. M. Goodrich, H.B. Quigley, R. Tilson, G. Brady, P. Martelli, V. Subramaniam, C. McDougal, S. Hean, S. Huang, W. Pan, U. K. Karanth, M. Sunkuist, J. L. D. Smith and S. J. O'Brien. 2004. Phylogeography and genetic ancestry of tigers (*Panthera tigris*). **PLoS Biol.** 2(12): e442. www.plosbiology.org p. 2275-2293.
- Loveless, M. D. 1992. Isoenzyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. **New Forests**. 6: 67-94.
- Lu, M.-Z., A. E. Szmidt and X.-R. Wang. 1995. Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris* (L.). **Heredity**. 74: 582-589.
- Lynch, M. and B. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**. 3: 91-99.
- McClure, F. A. 1966. **The Bamboos: A Fresh Perspective**. Harvard University Press, Cambridge.
- Menotti-Raymond, M., V. A. David, L. A. Lyons, A. A. Schaffer, J. F. Tomlin, M. K. Hutton and S. J. O'Brien. 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). **Geonomics**. 57:9-23.

- Miller, M.P. 1997. **Tool for Population Genetic Analysis (TFPGA) Version 1.3**. Department of **Biology Science**. North Arizona University, Arizona.
- Miller, M.P. 1998. **Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA)**, Department of **Biological Sciences**, Northern Arizona University, U.S.A.
- Mohamed, R., H. Y. Tan and C. H. Siah. 2012. A real-time PCR method for the detection of trnL-trnF sequence in agarwood and products from *Aquilaria* (THYMELAEACEAE). **Conservation genetics resources**. 4(3): 803-806.
- Monkheang, P., R. Sudmoon, T. Tanee, K. Noikotr, N. Bletter and A. Chaveerach. 2011. Species diversity, usages, molecular markers and barcode of medicinal *Senna* species (FABACEAE, CAESALPINIOIDEAE) in Thailand. **Journal of Medicinal Plants Research**. 5(26): 6173-6181.
- Moran, G. F. 1992. Patterns of genetic diversity in Australian tree species. **New Forests**. 6: 49-66.
- Moreau, F., A. Kremer, P. Moreau and R. Petit. 1992. **Intra-and interspecific variation of random amplified DNA fragments in European oaks**. In **Proc. of IUFRO Working Party S2.04.06 Workshop "Molecular Biology of Forest Trees"** Carcans-Maubuisson, France, June 1992. INRA, Bordeaux.
- Muellner, A. N., R. Samuel, S. A. Johnson, M. Cheek, T. D. Pennington and M. W. Chase. 2003. Molecular Phylogenetics of MELIACEAE (SAPINDACEAE) Based on Nuclear and Plastid DNA Sequences. **American Journal of Botany**. 90(3): 471-480.
- Mueller-Starck, G., P. Baradat and F. Bergmann. 1992. Genetic variation within European tree species. **New Forests**. 6: 23-47.
- Murawski, D. A. and K. S. Bawa. 1994. Genetic structure and mating system of *Stemonoporus oblongifolius* (DIPTEROCARPACEAE) in Sri Lanka. **American Journal Botany**. 81: 155-160.
- Murawski, D. A., B. Dayanandan and K. S. Bawa. 1994. Outcrossing rate of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forests. **Biotropica**. (26): 23-29.
- Nagamitsu, T., S. Ichikawa, M. Ozawa, R. Shimamura, N. Kachi, Y. Tsumura and N. Muhammadk. 2001. Microsatellite analysis of the breeding system and seed dispersal in *shorea leprosula* (DIPTEROCARPACEAE). **Int. J. Plant Sci.** 162(1): 155-159.
- Naito, Y., M. Kanzaki, H. Iwata, K. Obayashi, S. L. Lee, N. Muhammad, T. Okuda and Y. Tsumura. 2008. Density-dependent selfing and its effects on seed performance in a tropical canopy tree species, *Shorea acuminata* (DIPTEROCARPACEAE). **Forest Ecology and Management**. 256: 375-383.

- Nanami, S., S. Ikeda, N. Tani, S. Tan, B. Diway, K. Harada, Y. Tsumura, A. Itoh and T. Yamakura. 2007. Development of microsatellite markers for *Dryobalanops aromatic* (DIPTEROCARPACEAE), a tropical emergent tree in Southeast Asia. **Molecular Ecology Notes**. 7: 623–625.
- Neale, D. B., C. G. Tauer, D. M. Gorzo and K. D. Jermstad. 1989. Restriction fragment length polymorphism mapping of loblolly pine: methods, applications and limitations, Pp. 363-372. *In* **Proceedings of the 20th Southern Tree Improvement Conference**. 26-30 June. Charleston, South Carolina.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *In* **Proceedings of the National Academy of Science**. USA. 70: 3321-3323.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**. 89: 583-590.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of Restriction endonucleases. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. 76: 5269-5273.
- Ng, C. H., K. K. S. Ng, S. L. Lee, L. H. Tnah, C. T. Lee and N-F Zakaria. 2020. A geographical traceability system for Merbau (*Intsia palembanica* Miq.), an important timber species from peninsular Malaysia. *Forensic Science International: Genetics*. 44: 102188.
- Ng, C. H., S. L. Lee, L. H. Tnah, K. K. S. Ng, C. T. Lee, B. Diway and E. Khoo. 2017. Geographic origin and individual assignment of *Shorea platyclados* (DIPTEROCARPACEAE) for forensic identification. **PloS one**. 12(4): 1-18.
- Ng, K. K. S., S. L. Lee, C. H. Ng, L. H. Tnah, C. T. Lee and N. Tani. 2009. Microsatellite markers of *Gonystylus bancanus* (THYMELAEACEAE) for population genetic studies and DNA fingerprinting. **Conservation Genet Resour**. 1: 153-157.
- Ng, K. K. S., S. L. Lee, L. H. Tnah, Z. Nurul-Farhanah, C. H. Ng, C. T. Lee, N. Tani, B. Diway, P. S. Lai and E. Khoo. 2016. Forensic timber identification: a case study of a CITES listed species, *Gonystylus bancanus* (THYMELAEACEAE). *Forensic Science International: Genetics*. 23: 197-209.
- Ng, W. L., T. Chan and A. E. Szmidt. 2013. Molecular Identification of Natural Mangrove Hybrids of *Rhizophora* in Peninsular Malaysia. **Tree Genetics & Genomes**. 9(5): 1151-1160.
- Ng, W. L., Y. Onishi, N. Inomata, K. M. Teshima, H. T. Chan, S. Baba, S. Changtragoon, I. Z. Siregar and A. E. Szmidt. 2015. Closely Related and Sympatric but Not All the Same: Genetic Variation of Indo-West Pacific *Rhizophora* Mangroves across the Malay Peninsula. **Conservation Genetics**. 16(1): 137–150.

- Niyomdham, C. 2002. An Account of *Dalbergia* (LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDAE) In Thailand. **Thai Forest Bull. Bot.** 30: 124-166.
- Obayashi, K., Y. Tsumura, T. Ihara-Ujino, K. Niiyama, H. Tanouchi, Y. Suyama, I. Washitani, C. T. Lee, S. L. Lee and N. Muhammad. 2002. Genetic diversity and outcrossing rate between undisturbed and selectively logged forests of *shorea curtisii* (DIPTEROCARPACEAE) using microsatellite DNA analysis. **Int. J. Plant Sci.** 163(1): 151–158.
- Ogden, R., H. N. McGough, R. S. Cowan, L. Chua, M. Groves and R. McEwing. 2008. SNP-based method for the genetic identification of ramin *Gonystylus* spp. timber and products: applied research meeting CITES enforcement needs. **Endangered Species Research.** 9(3): 255-261.
- Pakkad, G., S. Ueno and H. Yoshimaru. 2008. Genetic diversity and differentiation of *Quercus semiserrata* Roxb. in northern Thailand revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. **Forest Ecology and Management.** 255(3-4): 1067-1077.
- Pakkad, G., C. James, F. Torre, S. Elliott and D. Blakesley. 2003. Genetic variation of *Prunus cerasoides* D. Don, a framework tree species in northern Thailand. **New Forest.** 27: 189–200.
- Pandey, M. 2005. **Development of Microsatellite in Sycamore Maple (*Acer Pseudoplatanus* L.) and Their Application in Population Genetics.** Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding Faculty of Forest Sciences and Forest Ecology. Georg-August University of Göttingen, Germany.
- Pandey, M., and S. Changtragoon. 2012. Isolation and characterization of microsatellites in a medicinal plant, *Phyllanthus emblica* (EUPHORBIACEAE). **American Journal of Botany.** 99(12): 468–469.
- Pandotra, P., M. K. Husain, G. Ram, S. Gupta and A. P. Gupta. 2013. Retrotransposon based genetic status of North-West Himalayan *Zingiber officinale* revealed high heterogeneity. **J. Plant Biochem. Biotechnol.** 23(2): 211-216.
- Pausajja, R., J. J. Granhof and H. Wellendorf. 1988. Estimation of needs of a pine plantation programme in Thailand and feasibility of further improvement of four major pine species, Pp. 283-290. *In* Gibson, G. L.; R. R. Griffin and A. C. Matheson, eds. **Breeding tropical trees: seedling forestry. Proc. IUFRO conference.** November 1988. Pattaya, Thailand.
- Pennisi, E. 2007. Wanted: A Barcode for Plants Quick-And-Easy DNA Identification of Animals Is Under Way, But Plants are Proving Harder to Pigeonhole. **Science.** 318: 190-191.
- Perron, M., A. G. Gordon and J. Bousquet. 1995. Species-specific RAPD fingerprints for the closely related *Picea mariana* and *P. rubens*. **Theor. Appl. Genet.** 91: 142-149.

- Prathepha, P. 2000. Detection of RAPD variation in a forest tree species, *Melientha suavis* Pierre (OPIACEAE) from Thailand. **Science Asia**. 26: 213–218.
- Ratnam, W. 1989. Use of isozyme analysis in a proposed *Acacia mangium* X *Acacia auriculiformis* hybrid seed production orchard. **Journal of Tropical Forest Science**. 2: 157-164.
- Ratnam, W. 2001. Use of molecular markers to quantify genetic diversity parameters of forest trees, Pp. 127-139. In R. Uma Shaanker, K. N. Ganeshaiah and Kamaljit S. Bawa, eds. **Forest Genetic Resources: Status, Threats and Conservation Strategies**. Oxford & IBH Publishing, New Delhi/Calcutta.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. **Evolution**. 49: 1280-1283.
- Reynolds, M. M. and C. G. Williams. 2004. Extracting DNA from submerged pine wood. **Genome**. 47(5): 994-997.
- Ritland, K. 1990. A Series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **Heredity**. 81: 235-237.
- Ritland, K. and S. Jain. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent gene loci. **Heredity**. 47: 35-52.
- Rohlf, H. J. 1993. **NTSYS pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. Applied Biostatistic Inc, New York.
- Roy, A. N. Frascaria, J. Mackay and J. Bousquet. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNA's (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. In **Proc. of IUFRO Working Party S2.04.06 Workshop "Molecular Biology of Forest Trees"**. Carcans-Maubuisson, France, June 1992. INRA, Bordeaux.
- Rozas, J., J. C. Sanchez-Delbarrio, X. Messeguer and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**. 19: 2496-2497.
- Rozen, S. and H. Skaletsky. 2000. Primer 3 on the WWW for General Users and For Biologist Programmers, Pp. 365-386. In Krawetz, S., Misener, S., eds. **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Human Press, Totowa, Nj, USA.
- Rudin, D. 1977. **The isozyme technique-a shot-cut to the genes of our forest trees?** Ph. D. Thesis. Department of Genetics University of Umeao, Sweden.
- Sa-ardavut, P, T. Chairuangsirikul and S. Chanpaisaeng. 1988. *In situ* gene conservation in northeast Thailand, Pp. 291-297. In G.L. Gibson, A.R. Griffin and A.C. Mathesson, eds. **Breeding Tropical Trees: Population Structure and Genetic Improvement Strategies in Clonal and Seedling Forestry**. Oxford, U.K. and Arlington, U.S.A.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 545 p.
- Schlötterer, C. and D. Tautz. 1992. Slippage Synthesis of Simple Sequence DNA. **Nucleic Acid Research**. 20:211-215.
- Schug, M. D., T. F. C. Mackay and C. F. Aquadro. 1997. Low Mutation Rates of Microsatellite Loci in *Drosophila Melanogaster*. **Nature Genetics**. 15: 99-102.
- Senakun, C., S. Changtragoon, P. Pramual, and P. Prathepha 2011. Genetic structure and diversity of *Shorea obtusa* (DIPTEROCARPACEAE) in Thailand. **Journal of Systematics and Evolution**. 49(2), 120-125.
- Sharma, I. K., D. L. Jones and C. J. French. 2003. Unusually high genetic variability revealed through allozymic polymorphism of an endemic and endangered Australian orchid, *Pterostylis* aff. *picta* (ORCHIDACEAE). **Biochemical Systematics Ecology**. 31: 513-526.
- Shiraishi, S., N. H. Latiff, S. Miyatake, Y. Ochiai and T. Furukoshi. 1994. Population genetical studies on *Dryobalanops* (Kapur) species, Pp. 107-114. In **Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute** 366. Tsukuba, Ibaraki, Japan.
- Singh, A., A. Chaudhury, P.S. Srivastava and M. Lakshmikumar. 2002. Comparison of AFLP and Simple Markers for Assessment of Intra-Population Genetic Variation in *Azadirachta indica* Juss. **Plant Science**. 162(1): 17-25.
- Singh, A., M. S. Negi, J. Rajagopal, S. Bhatia, U. K. Tomar, P. S. Srivastava and M. Lakshmikumar. 1999. Assessment of genetic diversity in *Azadirachta indica* using AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**. 99(1): 272-279.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco.
- Sombatsiri, K., K. Ermel and H. Schmutterer. 1995. Other Meliaceae Plants Containing Ingredients for Integrated Pest Management and Further Purposes. *Azadirachta* Spp. The Thai Neem Tree: *Azadirachta Siamensis* (Val.), Pp. 585-597. In Schmutterer, ed. **The Neem Tree (*Azadirachta indica* A.Juss.) and Other Meliaceae Plants: Sources of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes**. VCH Publishers Inc., Weinheim, Germany.
- Soonhuay, P., T. J. B. Boyle, T. and F. C. Yeh. 1995. The population genetics of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre and implications for genetic conservation. In **Proceedings of the IUFRO Symposium "Population genetics and gene conservation of forest trees"**. Carcans Maubuisson, France.
- Spalding M., M. Kainuma and L. Collins. 2010. **World Atlas of Mangroves**. Routledge, London.

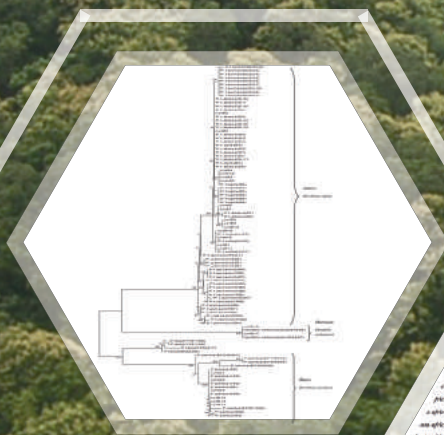
- Stacy, E. A., S. Dayanandan, B. P. Dancik and P. D. Khasa. 2001. Microsatellite DNA markers for the Sri Lankan rainforest tree species, *Shorea cordifolia* (DIPTEROCARPACEAE), and cross-species amplification in *S. megistophylla*. **Molecular Ecology Notes**. 1: 53–54.
- Stoney, C. 1997. **Azadirachta Indica** Neem, a Versatile for the Tropics and Subtropics. A Quick Guide to Multipurpose Tree from Around the World. Available Source: <http://www.winrock.org/fnrm/factnet/factpub/factsh/neem.htm>, December 29, 2010.
- Strauss, S., Y. P. Hong and V. Hipkins. 1992. Chloroplast and mitochondrial DNA subdivision in the California closed-cone pines. In **Proc. of IUFRO Working Party S2.04.06 Workshop “Molecular Biology of Forest Trees”**. Carcans-Maubuisson, France, June 1992. INRA, Bordeaux.
- Swofford, D. L. and R. B. Selander. 1981. BIOSYS-1: A Fortran program for The comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetics and systematics. **Heredity**. 72: 281-283.
- Szmidt, A. E. 1984. **Genetic studies of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) domestication by means of isozyme analysis**. Ph. D. Thesis. The Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Umeao ISBN 91-576-2123-3.
- Szmidt, A. E. 1995. Molecular population genetics and evolution: Two mission elements in studies of biodiversity, Pp. 177-193. In T. J. Boyle and B. Boontawee, eds. **Measuring and Monitoring Biodiversity in Tropical and Temperate Forest**. CIFOP, Bogor, Indonesia.
- Szmidt, A. E. and X-R Wang. 1991. DNA markers in forest genetics, Pp. 79-94. In Mueller-Starck, G. and M. Ziehe, eds. **Genetic variation in forest tree populations in Europe**. Sauerlaender's Verlag, Frankfurt am Main.
- Szmidt, A. E. and X-R Wang. 1993. Molecular systematics and genetic differentiation of *Pinus sylvestris* (L.) and *P. densiflora* (Sieb. et Zucc.). **Theor. Appl. Genet.** 86: 159-165.
- Szmidt, A. E. and X.-R. Wang. 2000. Genetics markers in forest genetics and breeding - the tunnel remains dark, Pp. 31-48. In C. Matyas, ed. **Forest Genetics and Sustainability**, Volume 63. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Szmidt, A. E., T. Alden and J. E. Hællgren. 1987. Paternal inheritance of chloroplast DNA in *Larix*. **Plant Molec. Biol.** 9: 59-64.
- Szmidt, A. E., X.-R. Wang and S. Changtragoon. 1996a. Contrasting patterns of genetic diversity in two tropical pines: *Pinus khasya* (Royle ex Gordon) and *Pinus merkusii* (Jungh et de Vriese). **Theor. Appl. Genet.** 92: 436-441.

- Szmidt, A. E., X.-R. Wang and M.-Z. Lu. 1996b. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L) using haploid tissue analysis. **Heredity**. 76: 412-420.
- Taeprayoon, P., P. Tanya, S.-H. Lee and P. Srinives. 2015. Genetic background of three commercial oil palm breeding populations in Thailand revealed by SSR markers. **Aust. J. Crop Sci.** 9: 281–288.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. Mega4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega) Software Version 4.0. **Mol Biol Evol.** 24: 1596-1599
- Tang, X., G. Zhao and L. Ping. 2011. Wood identification with PCR targeting noncoding chloroplast DNA. **Plant Mol Biol.** 77: 609–617.
- Tani, N., Y. Tsumura, T. Kado, Y. Taguchi, S. L. Lee, N. Muhammad, K. K. S. Ng, S. Numata, S. Nishimura, A. Konuma and T. Okuda. 2009. Paternity analysis-based inference of pollen dispersal patterns, male fecundity variation, and influence of flowering tree density and general flowering magnitude in two dipterocarp species. **Annals of Botany**. 104(7): 1421-1434.
- Tnah, L. H., S. L. Lee, K. K. S. Ng, Q. Z. Faridah and I. Faridah-Hanum. 2010. Forensic DNA profiling of tropical timber species in Peninsular Malaysia. **Forest ecology and management**. 259: 1436-1446.
- 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.
- Tomlinson, P.B. 1986. **The Botany of Mangroves**. Cambridge University Press, USA.
- Tulsieram, L. K., J. C. Glaubitz, G. Kiss and J. E. Carlson. 1992. Single tree genetic linkage mapping in conifers using haploid DNA from Megagametophytes. **Biotechnology**. 10: 686-690.
- Ujino, T., T. Kawahara, T. Yoshihiko, T. Nagamitsu, H. Yoshimaru and W. Ratnam. 1998. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other DIPTEROCARPACEAE species. **Heredity**. 81: 422–428.
- USNH. 2003. **A checklist of the trees, shrubs, herbs, and climbers of Myanmar**. Contributions from the United States National Herbarium. <http://botany.si.edu/myanmar/checklistNames.cfm>.
- Van Bommel, A. C. V. 1968. Contribution to the knowledge of the geographical races of *Pongo pygmaeus* (Hoppius). **Bijdragen tot de Dierkunde**. 38: 13–15.
- Van de ven, W. T. G. and R. J. McNicol. 1995. The use of RAPD markers for the identification of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) clones. **Heredity**. 75: 126-132.

- Van Sam, H., K. Nanthavong and P. J. A. Kessler. 2004. Trees of Laos and Vietnam: A field guide to 100 economically or ecologically important species. **Blumea**. 49: 201–349.
- Verhaegen, D., D. Ofori, I. Fofana, M. Poitel and A. Vaillant. 2005. Development and characterization of microsatellite markers in *Tectona grandis* (Linn. f). **Molecular Ecology Notes**. 5: 945–947.
- Villagomez, C. M. M., H. S. Espino, A. N. Cedillo, L. L. V. Montero, C. P. Segovia, C. A. M. Guerra, G. M. Guerra, A. C. Hernandez and O. P. Lopez. 2009. Identification of Peach Genotypes (*Prunus persica* (L.) Batsch) in the North-Central Region, Mexico. **International Journal of Botany**. 5(2): 160-165.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijmans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids**. 23: 4407-4414.
- Wagner, D. B. 1992. Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. **New Forests**. 6: 373-390.
- Wang, X-R. and A. E. Szmidt. 1993. Chloroplast DNA-based phylogeny of Asian *Pinus* species. **Plant Systematics and Evolution**. 188: 197-211.
- Wang, X-R. and A. E. Szmidt. 1994. Hybridization and chloroplast DNA in a *Pinus* species complex from Asia. **Evolution**. 48: 1020-1031.
- Wang, X-R. and A.E. Szmidt. 2001. Molecular markers in population genetics of forest trees. **Scandinavian Journal of Forest Research**. 16: 199-220.
- Wang, X-R., D. Lindegren, A. E. Szmidt and R. Yazdani. 1991. Pollen migration into a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. and the methods of its estimation using allozyme markers. **Scand. J. For. Res.** 6:379-385.
- Warren, K. S., I. J. Nijman, J. A. Lenstra, R. A. Swan, Heriyanto and M. Den Boer. 2000. Microsatellite DNA variation in Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus*). **Journal of Medical Primatology**. 29(2): 57-62.
- Warren, K. S., E. J. Verschoor, S. Langenhuijzen, Heriyanto, R. A. Swan, L. Vigilant and J. L. Heeney. 2001. Speciation and intrasubspecific variation of Bornean orangutans, *Pongo pygmaeus pygmaeus*. **Molecular Biology and Evolution**. 18(4): 472-480.
- Wattanakupakin, T., S. Lamtham, K. C. Grubbs and H. A. Volkaert. 2015. Population genetic analysis of *Xylia xylocarpa* (FABACEAE-MIMOSOIDEAE) in Thailand. **Tree Genetics & Genomes**. 11: 7.

- Weber, J. L. 1990. Informativeness Of Human (Dc-Da)N (Dg-Dt)N Polymorphisms. **Genomics**. 7: 524-530.
- Weber, J. L. and C. Wong. 1993. Mutation of Human Short Tandem Repeats. **Human Molecular Genetics**. 2:1123-1128.
- Weeden, N. F. 1989. Applications of isozymes in plant breeding (review). **Plant breed. Rev.** 6: 11-54.
- Weir, B. S. and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**. 38: 1358-1370.
- Werner, W. L. 1993. **Pinus in Thailand**. Geoecological Research. Vol. 7. Franz Steiner Verlag, Stuttgart, Germany.
- Wheeler, N. C. and K. S. Jech. 1992. The use of electrophoretic markers in seed orchard research. **New Forests**. 6: 311-328.
- White, E., J. Hunter, C. Dubetz, R. Brost, A. Bratton, S. Edes and R. Sahota. 2000. Microsatellite markers for individual tree genotyping: application in forest crime prosecutions. **J Chem Tech Biotechnol**. 75: 923-926.
- White, K. 1991. **Teak some aspects of research and development**, RAPA Publication 1991/17, FAO Regional Office for Asia and Pacific, Bangkok.
- Williams, C. G. and D. B. Neale. 1992. Conifer wood quality and marker-aided selection: a case study. **Canadian Journal of Forest Research**. 22: 1009-1017.
- Wong, K. N., W. L. Tan and F. T. Chew. 2009. Identification and characterization of microsatellite loci in *Intsia palembanica* (LEGUMINOSAE), a valuable tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**. 9: 360-364.
- Xu, X. F. and U. Arnason. 1996. The mitochondrial DNA molecule of Sumatran orangutan and a molecular proposal for two (Bornean and Sumatran) species of orangutan. **Journal of Molecular Evolution**. 43(5): 431-437.
- Yeh, F. C. 1989. Isozyme analysis for revealing population structure for use in breeding strategies, Pp. 119-131. In Gibson, G. I., A. R. Griffin and A. C. Matheson, eds. **Breeding tropical trees: population structure and genetic improvement strategies in clonal and seedling forestry**. OFI. Oxford, U.K. and Winrock International, Arlington, Virginia.
- Yeh, F. C., R. C. Yang and T. Boyle. 1999. **Popgene Version 1.31 Microsoft Window-Base Freeware for Population Genetic Analysis**. University of Alberta and Center for International Forestry Research, Canada.

- Yu, M., L. Jiao, J. Guo, A. C. Wiedenhoef, T. He, X. Jiang and Y. Yin. 2017. DNA Barcoding of Vouchered Xylarium Wood Specimens of Nine Endangered *Dalbergia* Species. **Planta**. 246: 1165–1176.
- Zhang, W. P., J. F. Wendel and L.G. Clark. 1997. Bamboozled again! inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bamboos (POACEAE: BAMBUSOIDEAE). **Mol. Phylogenet. Evol.** 8: 205-217.
- Zhang, Y. W., O. A. Ryder and Y.P. Zhang. 2001. Genetic divergence of orangutan subspecies (*Pongo pygmaeus*). **Journal of Molecular Evolution**. 52(6): 516-526.
- Zhi, L., W. B. Karesh, D. N. Janczewski, H. Frazier Taylor, D. Sajuthi, F. Gombek, M. Andau, J. S. Martenson and S. J. Obrien. 1996. Genomic differentiation among natural populations of orang-utan (*Pongo pygmaeus*). **Current Biology**. 6(10): 1326-1336.
- Ziegenhagen, B., A. Kormutak, M. Schauerte and F. Scholz. 1995. Restriction site Polymorphism in Chloroplast DNA of silver fir (*Abies alba* Mill.). **Forest Genetics**. 2(2): 99-107.

[illegible]