# รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : การวิจัยและพัฒนาพืชเศรษฐกิจเฉพาะพื้นที่ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาการผลิตปลาไหลเผือกใหญ่ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน
   **กิจกรรม** : สำรวจและศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ต้นปลาไหลเผือกใหญ่ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การจัดจำแนกปลาไหลเผือกใหญ่ ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน
   **ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** : Identification of *Eurycoma longifolia* Jack. in Upper South Thailand by Using DNA Barcoding

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**


**หัวหน้าการทดลอง** : นางสาวสุธีรา ถาวรรัตน์
สังกัดสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7

**ผู้ร่วมงาน** : นางสาวอรุโณทัย ซาววา[2]
นายสมคิด ดำน้อย[1]
นางสุภาพร ขุนเสถียร[1]
นายอนุศักดิ์ ขุนเสถียร[1]


5. **บทคัดย่อ**


การจัดจำแนกพันธุกรรมต้นปลาไหลเผือกใหญ่ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมปลาไหลเผือกใหญ่ในแหล่งธรรมชาติ โดยทำการศึกษาระหว่าง ปี 2559-2561 โดยการคัดเลือกต้นปลาไหลเผือกจาก 6 แหล่งธรรมชาติ คือ 1.อ.ปลายพระยา จ.กระบี่ 2.อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี 3.อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ 4.อ.ปะทิว จ.ชุมพร 5.อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร และ 6.อ.กระบุรี จ.ระนอง มาศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ สภาพแวดล้อมและตรวจสอบดีเอ็นเอ เพื่อทราบข้อมูลพืชและความสัมพันธ์ของระหว่างพืชในแต่ละแหล่งธรรมชาติ พบว่า ต้นปลาไหลเผือกใหญ่ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน



[1]สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7 จังหวัดสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร
[2]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี กรมวิชาการเกษตร

เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น อยู่ระหว่าง 10.44-19.56 เซนติเมตร ใบแบบประกอบแบบขนนก รูปไข่ ปลายใบติ่งแหลม ฐานใบมน และขอบใบเรียบ จำนวนใบเฉลี่ย อยู่ระหว่าง 20.00-42.33 ใบต่อต้น จำนวนใบย่อยเฉลี่ย อยู่ระหว่าง 22.53-33.73 ใบย่อยต่อใบ ลักษณะการมีขนที่ใบ มีเฉพาะต้นปลาไหลเผือกใหญ่ใน อ.ปลายพระยา จ.กระบี่ ส่วนการมีขนที่ก้านใบ มีเฉพาะต้นปลาไหลเผือกใหญ่ใน อ.กระบุรี จ.ระนอง สีใบด้านบน เป็นสีเขียว 137A, 137B, 137C และ 144A สีใบด้านล่าง เป็นสีเขียว 145B, 146D, 147C และ 147D ลำต้นสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม และชนิดพืชในรัศมี 5 เมตรรอบลำต้น พบหลายชนิด ได้แก่ ต้นปลาไหลเผือก มะม่วงหิมพานต์ ผักพูม หญ้าขจร ตะบองเพชร กำชำ จิก ยางนา เข็มป่า มังคุดป่า ต้นตะเคียน หวาย หมุ่ย เต่าร้าง ซึ่งมีความแตกต่างและเหมือนกันในบางแหล่ง ลักษณะดินเป็นดินร่วนปนทรายถึงดินทราย เป็นกรดอ่อน อยู่ระหว่าง 4.14-5.11 มีอินทรียวัตถุ อยู่ระหว่าง 0.80-3.70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฟอสฟอรัส อยู่ระหว่าง 0.09-3.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียม อยู่ระหว่าง 6.88-35.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสำหรับการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR พบว่า มี 21 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนตั้งแต่ 4 แถบขึ้นไป ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 215 แถบ มีแถบดีเอ็นเอต่าง 197 แถบ คิดเป็น 91.62% ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 100-1,400 คู่เบส (bp, base pair) ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ UBC835 และ UBC817 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 15 แถบ มีแถบดีเอ็นเอต่าง 15 แถบ คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อดูแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendogram) พบว่าสามารถจำแนกปลาไหลเผือกใหญ่และพืชเปรียบเทียบได้ 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 16, 17 และ 18 กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่ 8, 13, 14 และ 15 และมีค่าดัชนีความเหมือน อยู่ระหว่าง 0.37 ถึง 0.93 โดยปลาไหลเผือก ตัวอย่างที่ 2 และ 18 มีค่าดัชนีความเหมือนมากที่สุด และตัวอย่างปลาไหลเผือก 14 มีค่าดัชนีความเหมือนน้อยที่สุด

**Abstract**

Identification of Eurycoma longifolia Jack. in Upper South Thailand for genetic diversity in natural areas. The study was conducted during 2016-2018. From 6 natural sources including 1. Plai Phraya District, Krabi Province 2. Tha Chana District, Surat Thani Province 3. Chaiya District, Surat Thani Province 4. Pathio District, Surat Thani Province Chumphon 5. Tha Sae District, Chumphon Province and 6. Kra Buri District, Ranong Province. Study of botanical characteristics, environment and DNA in order to know the plant data and the relationship between the plants in each natural source. The result, height was between 157.33-260.00 centimeters, trunk diameter was between 10.44-19.56 centimeters. Leave was pinnate compound leaves, ovate, cuspidate, obtuse and entire, average number was between 20.00-42.33 leaves per tree, 22.53-33.73 Sub-leaves per leaf, color of top leave was between 137A, 137B, 137C and 144A, color of bottom leave was green about 145B, 146D, 147C and 147D. The stems was light brown to dark brown. And a species in a radius of 5 meters around the trunk, found many species, namely

*Anacardium occidentale*, *Lepionurus sylvestris* Bl., *Pennisetum pedicellatum*, *Cereus hexagonus* (L.) Mill., *Lepisanthes rubiginosa*, *Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don, *Ixora Cibdela* Craib., *Garcinia speciosa* Wall., *Hopea odorata* Roxb., *Calamus viminalis* Willd., *Micromelum minutum* (G.Forst) Wight & Arn. and *Caryota urens* etc., which are different and the same in some sources. The soil type is sandy loam to sandy soil with weak acid between 4.14-5.11, organic matter between 0.80-3.70 percent, phosphorus content between 0.09-3.01 mg/kg, potassium content between 6.88-35.50 mg/kg. In addition, detection of DNA molecules by ISSR, it have 21 primers for gave clear DNA bands from more 4 band, total band have 215 and gave different band was 197 DNA bands, or 91.62%. There are sizes ranging from 100-1,400 pairs (base pair). The most number DNA-band by UBC835 primer and UBC817 primer, total band and different band 15 DNA bands. The relationship chart by dendogram, it can be found that the two types into groups 1; sample 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 16. , 17 and 18 and group 2; sample 8, 13, 14 and 15, and a similarity index was between 0.37 to 0.93, sample 2 and 18 have the highest similarity index but sample 14 have the least similarity index.

## 6. คำนำ

ปลาไหลเผือกใหญ่ หรือ คะนาง, ชะนาง (ตราด) หรือ ตุงสอ แฮพันชั้น (ภาคเหนือ) หรือ เอียนด่อน (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) หรือ เพียก (ภาคใต้) หรือ กรุงบาดาล (สุราษฎร์ธานี) หรือ ไหลเผือก (ตรัง) หรือ ตรึงบาดาล (ปัตตานี) ตุวุเบ๊าะมิง (นราธิวาส) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Eurycoma longifolia* Jack. อยู่ในวงศ์ SIMAROUBACEAE สกุล *Eurycoma* อันดับ SAPINDALES มีโครโมโซม 2n=18 (ชฎาพร, 2553) มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้พุ่มไม่ผลัดใบ ลำต้นเรียบสีน้ำตาลเทา ใบแบบใบประกอบแบบขนนก ดอกออกตามซอกใบหรือปลายก่ง กลีบเลี้ยงสีเขียวอมน้ำตาล ปลายกลีบสีแดงอมเขียว กลีบดอกสีแดงอ่อน เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียสีแดงอ่อน ยื่นยาวกว่าดอก ผลเดี่ยว ทรงกระบอกกลมสั้น ผลอ่อนสีเขียว เมื่อแก่เป็นสีส้ม (มัณฑนา, 2552 และ Nooteboom, 1962) เป็นพืชป่า กระจายในป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง ป่าดิบแล้งและป่าดิบชื้น ระดับความสูงจนถึงประมาณ 700 เมตร (http://biodiversity.forest.go.th/index.) สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ มีดอกเป็นทั้งดอกสมบูรณ์เพศ และดอกไม่สมบูรณ์เพศ เช่น ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอาจอยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious plant) หรือต่างต้น (diecious plant) (Smitinand, 1981) ดังนั้น จึงมีโอกาสผสมข้ามได้สูง และเมื่อมีการผสมข้ามจะเกิดสภาพ heterozygosity ได้สูง (Rao and Hodgkin, 2002) ด้วย จากการศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกในประเทศไทยของวิจิตรา (2559) จำนวน 82 แหล่ง พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ 6 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความสอดคล้องกับพื้นที่ที่เก็บรวบรวม คือ กลุ่มที่ 1 พื้นที่จังหวัดตาก ลำพูน พิจิตร เชียงใหม่ ลำปาง อุตรดิตถ์ พิษณุโลก กำแพงเพชร และสุโขทัย กลุ่มที่ 2 พื้นที่จังหวัด

อุบลราชธานี ยโสธร ขอนแก่น อำนาจเจริญ บึงกาฬ อุดรธานี นครพนม มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ ชัยภูมิ และกาฬสินธุ์ กลุ่มที่ 3 พื้นที่จังหวัดระยอง จันทบุรี ปราจีนบุรี และตราด กลุ่มที่ 4 พื้นที่จังหวัดราชบุรี กลุ่มที่ 5 พื้นที่จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี และกระบี่ และกลุ่มที่ 6 พื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และตรัง

ปลาไหลเผือกใหญ่และเป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญ มีสารออกฤทธิ์สำคัญที่มีรสขมกลุ่ม quassinoids มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ปรับพฤติกรรมทางเพศ เพิ่มประสิทธิภาพในระบบสืบพันธุ์เพศชาย เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ เพิ่มมวลกล้ามเนื้อ ต้านเบาหวาน แก้ไข้ แก้ปวด ต้านการอักเสบ คลายเครียด และวิตกกังวล เป็นต้น (พิชานันท์, 2561) และเป็นวัตถุดิบในตำรับยาหลายขนาน และพื้นที่ภาคใต้ตอนบนซึ่งมีแหล่งต้นปลาไหลเผือกใหญ่ที่มีขนาดใหญ่หลายพื้นที่ แต่ปัจจุบันมีการบุกรุกพื้นที่ ทำให้แหล่งปลาไหลเผือกใหญ่ตามธรรมชาติลดลง เป็นผลเนื่องจากหลายสาเหตุ ได้แก่ ความต้องการใช้ เช่น เป็นยาสมุนไพร สูงแต่มีแหล่งพืชน้อย มีความต้องการขยายพื้นที่ปลูกพืชเศรษฐกิจ เช่น ปาล์มน้ำมัน มะพร้าวสูง เป็นต้น ดังนั้น นักวิจัยจึงเห็นความจำเป็นและความเร่งด่วนในการศึกษาและรักษาพันธุกรรมปลาไหลเผือกใหญ่ของพื้นที่ฯ ไว้ จึงได้ทำการวิจัยเพื่อจัดทำฐานข้อมูลพันธุกรรมระดับโมเลกุล และความสัมพันธ์ทางด้านพันธุกรรมของปลาไหลเผือกใหญ่ของแต่ละพื้นที่ในเขตภาคใต้ตอนบน สำหรับการอนุรักษ์พันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์และพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตต่อไป

**7. วิธีดำเนินการ** :

**- อุปกรณ์**

1.ใบเพสลาดของต้นปลาไหลเผือกใหญ่

2.อุปกรณ์ทำเครื่องหมายต้น ได้แก่ GPS ป้ายชื่อพืชแบบอ่อน และดินสอ เป็นต้น

3.อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ใบมีด ถุงพลาสติก ปากกาติดทน และกระติกน้ำแข็ง เป็นต้น

4.อุปกรณ์บันทึกข้อมูล ได้แก่ กล้องบันทึกภาพ ปากกา และสมุด เป็นต้น

5.อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ได้แก่ Thermal Paper, ถุงมือ, Mask, โกร่ง, หลอดทดลองขนาด 0.2, 1.5, และ 15 มิลลิลิตร, ไปเปตทิปขนาดต่างๆ, ขวดดูแรน เป็นต้น

6.เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)

7.เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)

8.เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)

9.ชุดถ่ายภาพ

10.UV Transilluminators (BIORAD)

11.ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

6.สารเคมีสำหรับงานชีววิทยาโมเลกุล ได้แก่ CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), เจลอะกาโรส (Agarose gel), TBE Buffer, Taq DNA Polymerase, DNA Ladder และ Edthidium Bromide เป็นต้น

**- วิธีการ**

**1.บันทึกข้อมูลพื้นฐานพืชและสภาพแวดล้อมแหล่งพืช**

ได้แก่ พิกัดตัวอย่าง ลักษณะดินและธาตุอาหารในดิน ลักษณะและขนาดใบ

**2.จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ**

2.1 การเตรียมตัวอย่างใบปลาไหลเผือกใหญ่และพืชเปรียบเทียบและการสกัดดีเอ็นเอ

นำใบเพสลาดของตัวอย่างพืช เป็นใบปลาไหลเผือกใหญ่จาก 6 แหล่งพืชในจังหวัดทางภาคใต้ตอนบน แหล่งละ 3 ตัวอย่าง รวมเป็น 18 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 1-3 จาก อ.ปลายพระยา จ.กระบี่ ตัวอย่างที่ 4-6 จาก อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี ตัวอย่างที่ 7-9 จาก อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี ตัวอย่างที่ 10-12 จาก อ.ปะทิว จ.ชุมพร ตัวอย่างที่ 13-15 จาก อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร ตัวอย่างที่ 16-18 จาก อ.กระบุรี จ.ระนอง และตัวอย่างที่ 19-20 เป็นพืชเปรียบเทียบ ซึ่งเป็นพืชในอันดับเดียวกัน คือ พืชมะหวด หรือ กำชำ (ภาคกลาง) หรือ ชันรู (ภาคตะวันออกเฉียงใต้) หรือ กำจำ หรือ นำซำ (ภาคใต้) หรือ หวดค่า (อุดรธานี) หรือ สีฮอกน้อย (ภาคเหนือ) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Lepisanthes rubiginosa* (Roxb.) Leenh. อยู่ในวงศ์ SAPINDACEAE สกุล *Lepisanthes* อันดับ SAPINDALES มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้พุ่มผลัดใบหรือไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ทรงพุ่มกลมหรือเป็นรูปไข่ เปลือกต้นสีน้ำตาล แตกเป็นร่องตามยาว กิ่งมีขนละเอียด ใบแบบใบประกอบแบบขนนก ขอบขนาน ออกดอกเป็นช่อแบบแยกแขนางตั้ง ดอกย่อยขนาดเล็กสีขาว มีกลิ่นหอมอ่อนๆ กลีบดอก 4-5 กลีบ กลีบเลี้ยง 5 กลีบดอกแบบแยกเพศ ผลสดรูปรีเว้าเป็นพู ผิวผลเกลี้ยง ขนาดกว้างประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร ผิวเกลี้ยง เปลือกและเนื้อบาง ผลอ่อนสีเขียว ผลสุกสีเหลืองแดงและม่วงดำเมื่อแก่จัด รสหวาน มีเมล็ดสีน้ำตาลดำเป็นมัน 1 เมล็ด (นิจศิริ และธวัชชัยม, 2557)

มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีของอรุโณทัยและคณะ (2552) ดังนี้

เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide)] เติม 0.2% β-mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งใบปลาไหลเผือกใหญ่ 5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Choroform:Isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Choroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAC 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใส

ทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SSR ด้วยเทคนิค Inter-simple sequence repeat : ISSR และจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ทดสอบไพรเมอร์ ISSR จำนวนทั้งหมด 64 ไพรเมอร์ โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร 10xPCR buffer($(NH_4)_2SO_4$) 2 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (5 uM) 2 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 50-55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส (electropholesis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD) นำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์ผลโดยถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนน 0 และปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนน 1 แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.1 ตามวิธีการของ Rohlf (2000)

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม พ.ศ. 2559 สิ้นสุด กันยายน พ.ศ. 2561

สถานที่ดำเนินการทดลอง ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบนและห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1.ลักษณะพื้นฐานของปลาไหลเผือกและสภาพแวดล้อมแหล่งพืช

จากการศึกษาข้อมูลปฐมภูมิและทุติยภูมิเกี่ยวกับแหล่งปลาไหลเผือกใหญ่ธรรมชาติในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน พบว่า มีกระจายในหลายจังหวัด คือ สุราษฎร์ธานี ชุมพร ระนอง และกระบี่ โดยแหล่งปลาไหลเผือกใหญ่ธรรมชาติที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในภาคใต้ตอนบน คือ จังหวัดชุมพร และจากการสำรวจพื้นที่ ได้คัดเลือกแหล่งปลาไหลเผือกใหญ่ธรรมชาติที่ยังคงเหลือพันธุ์ในพื้นที่ และบันทึกข้อมูลทั่วไปจำนวน 6 พื้นที่ เพื่อทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม คือ 1) อ.ปลายพระยา จ.กระบี่ 2) อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี 3) อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี 4) อ.ปะทิว จ.ชุมพร 5) อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร และ 6) อ.

กระบุรี จ.ระนอง จากข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของต้น พบว่า ความสูงของต้นปลาไหลเผือกใหญ่ อยู่ระหว่าง 157.33-260.00 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่ระดับ 10 เซนติเมตรเหนือพื้นดิน อยู่ระหว่าง 10.44-19.56 เซนติเมตร โดยเส้นผ่านศูนย์กลางแปรผันตามความสูงต้น ลักษณะใบ (ภาพที่ 1) เป็นใบแบบประกอบแบบขนนก รูปไข่ ปลายใบติ่งแหลม ฐานใบมน และขอบใบเรียบ เหมือนกันทุกแหล่งพืช จำนวนใบเฉลี่ย อยู่ระหว่าง 20.00-42.33 ใบต่อต้น จำนวนใบย่อยเฉลี่ย อยู่ระหว่าง 22.53-33.73 ใบย่อยต่อใบ ลักษณะการมีขนที่ใบ มีเฉพาะต้นปลาไหลเผือกใหญ่ใน อ.ปลายพระยา จ.กระบี่ ส่วนการมีขนที่ก้านใบ มีเฉพาะต้นปลาไหลเผือกใหญ่ใน อ.กระบุรี จ.ระนอง สีใบด้านบน เป็นสีเขียว 137A, 137B, 137C และ 144A สีใบด้านล่าง เป็นสีเขียว 145B, 146D, 147C และ 147D ลำต้นสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม และชนิดพืชในรัศมี 5 เมตรรอบลำต้น พบหลายชนิด ได้แก่ ต้นปลาไหลเผือก มะม่วงหิมพานต์ ผักพูม หญ้าขจร ตะบองเพชร กำชำ จิก ยางนา เข็มป่า ต้นลายนกนอน มังคุดป่า ต้นตะเคียน หวาย หมุ่ยพลา เต่าร้าง ซึ่งมีความแตกต่างและเหมือนกันในบางแหล่ง ดังตารางที่ 1

และคุณสมบัติของดินและปริมาณธาตุอาหารในดินของแหล่งพืช พบว่า ชนิดดินเป็นดินร่วน ถึงดินร่วนปนทราย เป็นกรดอ่อน อยู่ระหว่าง 4.14-5.11 ค่าการนำไฟฟ้า อยู่ระหว่าง 0.006-0.042 ds/m อินทรียวัตถุ อยู่ระหว่าง 0.80-3.70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฟอสฟอรัส อยู่ระหว่าง 0.09-3.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียม อยู่ระหว่าง 6.88-35.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณแคลเซียม อยู่ระหว่าง 24.80-292.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณแมกนีเซียม อยู่ระหว่าง 12.11-61.34 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณเหล็ก อยู่ระหว่าง 32.48-81.52 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณแมงกานีส อยู่ระหว่าง 0.15-51.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปริมาณทองแดง อยู่ระหว่าง 0.06-0.13 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 2

**ตารางที่ 1** ข้อมูลพฤกษศาสตร์ต้นปลาไหลเผือกใหญ่และชนิดพืชในรัศมี 5 เมตร ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน

| ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ | แหล่งพันธุ์ในจังหวัดภาคใต้ตอนบน | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1. ปลายพระยา | 2. ท่าชนะ | 3. ไชยา | 4. ปะทิว | 5. ท่าแซะ | 6. กระบุรี |
| ความสูงต้น (ซม.) | 260.00 | 170.67 | 252.33 | 171.33 | 157.33 | 159.67 |
| เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (ซม.) | 19.56 | 18.98 | 16.91 | 14.04 | 13.74 | 10.44 |
| ลักษณะใบ | ใบประกอบแบบขนนก (pinnate compound leaves) | | | | | |

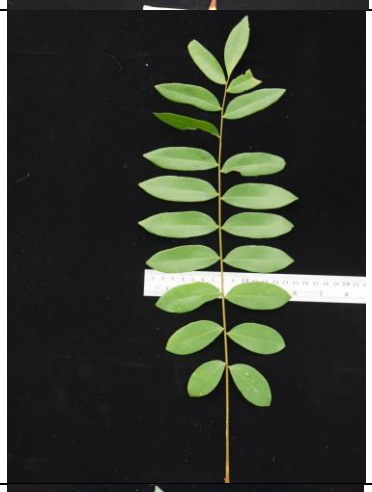
| | รูปไข่ (ovate) ปลายใบติ่งแหลม (cuspidate) ฐานใบมน (obtuse) ขอบใบเรียบ (entire) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| จำนวนใบ/ต้น | 42.33 | 23.67 | 19.00 | 36.67 | 29.00 | 20.00 |
| จำนวนใบย่อย/ใบ | 33.73 | 26.73 | 24.20 | 26.53 | 25.13 | 22.53 |
| ขนใบ | มีขนนุ่ม สั้น คล้ายกำมะหยี่ | ไม่มีขน | ไม่มีขน | ไม่มีขน | ไม่มีขน | ไม่มีขน |
| ขนก้านใบ | ไม่มีขน | ไม่มีขน | ไม่มีขน | ไม่มีขน | ไม่มีขน | มีขนนุ่ม สั้น คล้ายกำมะหยี่ |
| สีใบด้านบน | 137A | 144A, 137B | 137A, 137C | 137A, 137B | 137A,137B | 137A |
| สีใบด้านล่าง | 147D | 145B, 146D | 147D | 147D, 148D | 147C,147D | 147D |
| สีลำต้น | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลอ่อน | น้ำตาลอ่อน | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลเข้ม |
| ชนิดพืช รัศมี 5 เมตรจากต้น | ปลาไหลเผือกใหญ่ ไผ่ กลอย หวาย เถาวัลย์ความถึก ปาล์มน้ำมัน | ปลาไหลเผือกใหญ่ มะม่วงหิมพานต์ ผักพูม หญ้าขจร ตะบองเพชร | ปลาไหลเผือกใหญ่ มะม่วงหิมพานต์ กำชำ จิก ยางนา เข็มป่า ต้นลายนกนอน | ปลาไหลเผือกใหญ่ ชะมวง เข็มป่า ผักพูม มังคุดป่า | ปลาไหลเผือกใหญ่ต้น ตะเคียน หวาย หมุ่ย พลา เต่าร้าง ผักพูม | ปลาไหลเผือกใหญ่ เข็มป่า ไผ่ |

**ตารางที่ 2** ข้อมูลคุณสมบัติดินและปริมาณธาตุอาหารในดินของแหล่งปลาไหลเผือกใหญ่พื้นที่ภาคใต้ตอนบน

| คุณสมบัติดิน | แหล่งพันธุ์ในจังหวัดภาคใต้ตอนบน | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1. ปลายพระยา | 2. ท่าชนะ | 3. ไชยา | 4. ปะทิว | 5. ท่าแซะ | 6. กระบุรี |
| ชนิดดิน | ร่วนปนทราย | ทราย | ทราย | ทราย | ร่วนปนทราย | ร่วนเหนียวปนทราย |
| ความเป็นกรด-ด่าง | 4.54 | 5.09 | 4.54 | 4.14 | 5.11 | 4.56 |
| ค่าการนำไฟฟ้า (ds/m) | 0.027 | 0.006 | 0.021 | 0.042 | 0.024 | 0.013 |
| อินทรียวัตถุ (%) | 2.12 | 0.80 | 3.44 | 3.70 | 1.95 | 1.52 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ฟอสฟอรัส (มก./กก.) | 1.59 | 1.03 | 3.01 | 2.70 | 2.87 | 0.90 |
| โพแทสเซียม (มก./กก.) | 24.92 | 6.88 | 19.37 | 26.52 | 19.64 | 35.50 |
| แคลเซียม (มก./กก.) | 80.79 | 24.86 | 80.79 | 105.65 | 292.10 | 24.86 |
| แมกนีเซียม (มก./กก.) | 50.04 | 12.11 | 59.73 | 61.34 | 52.06 | 16.55 |
| เหล็ก (มก./กก.) | 81.52 | 32.48 | 40.42 | 32.60 | 41.86 | 54.86 |
| แมงกานีส (มก./กก.) | 10.44 | 1.34 | 1.66 | 8.97 | 51.50 | 0.15 |
| ทองแดง (มก./กก.) | 0.12 | 0.06 | 0.13 | 0.09 | 0.09 | 0.07 |

| | | |
|---|---|---|
| **ปลายพระยา** | | |

| | | |
|---|---|---|
| ท่าชนะ | | |
| ไชยา | |  |
| ปะทิว | | |

| | | |
|---|---|---|
| **ท่าแซะ** | | |

**ภาพที่ 1** ลักษณะใบปลาไหลเผือกใหญ่ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน

**2.ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาไหลเผือก**

2.1การสกัดดีเอ็นเอของปลาไหลเผือกใหญ่

การสกัดดีเอ็นเอจากใบเพสลาดของปลาไหลเผือก จำนวน 20 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CTAB เมื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร บนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่กระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ นาน 30 นาที พบว่า วิธีการนี้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดีและมีปริมาณมาก แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB มีความเหมาะสมในการเป็นต้นแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี ISSR-PCR ของตัวอย่างปลาไหลเผือก

2.2การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาไหลเผือกใหญ่ด้วยเทคนิค ISSR

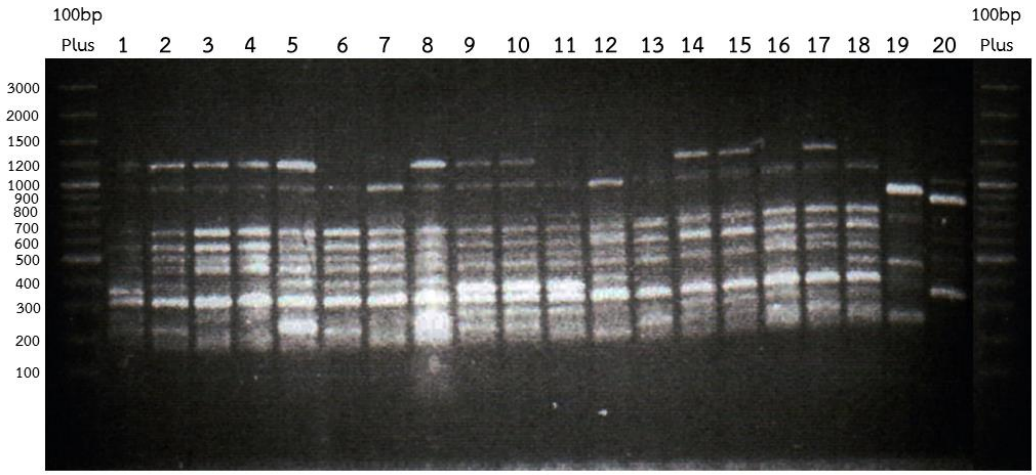
เครื่องหมายโมเลกุล ISSR เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและนิยมนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการให้ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Silva *et al*., 2017) ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบไพรเมอร์ชนิด ISSR จำนวน 64 ไพรเมอร์ ด้วยการรวมดีเอ็นเอของปลาไหลเผือกใหญ่และมะหวด ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 43 ไพรเมอร์ แต่มีเพียง 21 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนตั้งแต่ 4 แถบขึ้นไป ดังตารางที่ 2 จึงถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างปลาไหลเผือกใหญ่ในการทดลองนี้ (ภาพภาคผนวกที่ 1) จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 215 แถบ มีแถบดีเอ็นเอต่าง 197 แถบ คิดเป็น 91.62% ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 100-1,400 คู่เบส (bp, base pair) ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ UBC835 และ UBC817 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 15 แถบ มีแถบดีเอ็นเอต่าง 15 แถบ คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2, ภาพที่ 2) ส่วนไพรเมอร์ CT(CCT)3CAC ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 4 แถบ มีแถบดีเอ็นเอต่าง 15 แถบ คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** ไพรเมอร์ชนิด ISSR ที่ใช้ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกใหญ่ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน

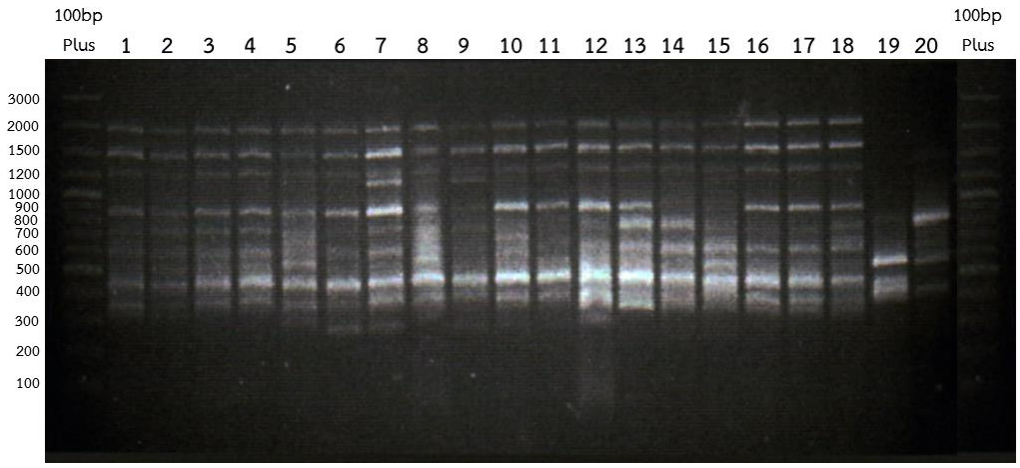
| ลำดับที่ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5'-3') | Ta (°C) | จำนวนแถบดีเอ็นเอ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | ทั้งหมด | แบนต่าง | % polymorphism |
| 1. | UBC807 | 5'-AGA GAG AGA GAG AGA GT-3' | 50 | 8 | 7 | 89.20 |
| 2. | UBC810 | 5'-GAG AGA GAG AGA GAG AT-3' | 50 | 12 | 10 | 93.02 |
| 3. | UBC889 | 5'-DBD ACA CAC ACA CAC AC-3' | 55 | 11 | 8 | 72.73 |
| 4. | (CAG)5 | 5'-CAG CAG CAG CAG CAG-3' | 50 | 10 | 9 | 90 |
| 5. | (AGC)5AY | 5'-AGC AGC AGC AGC AGC AY-3' | 55 | 12 | 12 | 100 |
| 6. | CA(GA)8 | 5'-ACA ACA ACA CAC ACA CYA-3' | 55 | 8 | 8 | 100 |
| 7. | GC(GA)8 | 5'-ACC ACC ACC ACC ACC ACC-3' | 50 | 10 | 10 | 100 |
| 8. | (AGC)5Y | 5'-GCT GCT GCT GCT GCT Y-3' | 50 | 11 | 10 | 90.91 |
| 9. | UBC809 | 5'-TCT CTC TCT CTC TCT CTC A-3' | 50 | 8 | 6 | 87.02 |
| 10. | UBC846 | 5'-TCT CTC TCT CTC TCT CTC G-3' | 50 | 8 | 7 | 87.50 |
| 11. | UBC868 | 5'-CTC CTC CTC CTC CTC CTC-3' | 55 | 9 | 8 | 88.89 |
| 12. | UBC880 | 5'-GGA GAG GAG AGG AGA-3' | 50 | 11 | 11 | 100 |
| 13. | UBC887 | 5'-AGA GAG AGA GAG AGA GC-3' | 55 | 12 | 10 | 83.33 |
| 14. | UBC888 | 5'-BDB CAC ACA CAC ACA CA-3' | 55 | 14 | 12 | 85.71 |
| 15. | UBC890 | 5'-VHV GTG TGT GTG TGT GT-3' | 55 | 14 | 14 | 100 |
| 16. | UBC891 | 5'-HVH TGT GTG TGT GTG TG-3' | 50 | 11 | 9 | 81.82 |
| 17. | (ATG)6G | 5'-ATG ATG ATG ATG ATG ATG G-3' | 55 | 13 | 13 | 100 |
| 18. | CT(CCT)3CAC | 5'-CAC ACA CAC ACA CAC AG-3' | 55 | 4 | 4 | 100 |
| 19. | UBC835 | 5'-AGA GAG AGA GAG AGA GY-3' | 50 | 15 | 15 | 100 |
| 20. | UBC817 | 5'-CAC ACA CAC ACA CAC AA-3' | 50 | 15 | 15 | 100 |
| 21. | UBC826 | 5'-CTC TCT CTC TCT CTC TRA-3' | 50 | 5 | 4 | 97.25 |

Degenerated primers: B=(C,G,T), D=(A,G,T), Y=(C,T), R=(A,G), V=(A,C,G), H=(A,C,T)

*Ta = annealing temperatures




UBC835

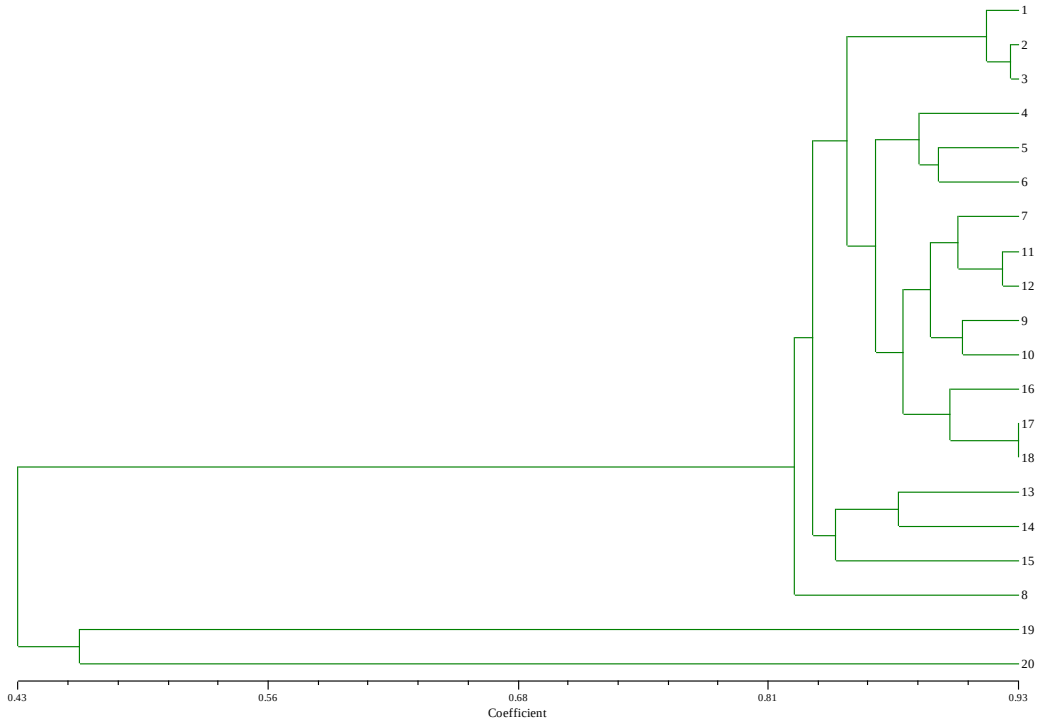



UBC817

**ภาพที่ 2** แสดงแถบดีเอ็นที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ UBC835 และ UBC817 บนเจลอะกาโรส 2%

2.3การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาไหลเผือกใหญ่

ผลจากการวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.1 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) พบว่า สามารถจำแนกปลาไหลเผือกใหญ่และพืชเปรียบเทียบทั้ง 20 ตัวอย่าง แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลัก กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 16, 17 และ 18 สำหรับกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 8, 13, 14 และ 15 นอกจากนี้ยังสามารถแยกปลาไหลเผือกจากมะหวดพืชวงศ์เดียวกันได้อย่างชัดเจน เมื่อวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างปลาไหลเผือกใหญ่ทั้ง 18 ตัวอย่าง (ภาพที่ 3) ค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์มีค่าอยู่ระหว่าง 0.37 ถึง 0.93 (ภาพที่ 4) โดยปลาไหลเผือก 2 และ 18 มีค่าดัชนีความเหมือนมากที่สุดคือ 0.93 ในขณะที่ปลาไหลเผือก 14 มีค่าดัชนีความเหมือนน้อยที่สุดคือ 0.37




**ภาพที่ 3** แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกใหญ่ (1-18) และพืชเปรียบเทียบ (19-20) จำนวน 20 ตัวอย่าง ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 21 ไพรเมอร์ และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.1

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 0.92 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 0.91 | 0.93 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0.85 | 0.87 | 0.89 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.82 | 0.81 | 0.86 | 0.89 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 0.83 | 0.83 | 0.85 | 0.88 | 0.89 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 0.82 | 0.83 | 0.86 | 0.85 | 0.89 | 1.00 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 0.84 | 0.86 | 0.84 | 0.81 | 0.83 | 0.83 | 0.82 | 1.00 | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 0.82 | 0.82 | 0.85 | 0.87 | 0.85 | 0.86 | 0.89 | 0.82 | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| 10 | 0.83 | 0.82 | 0.84 | 0.85 | 0.87 | 0.84 | 0.88 | 0.81 | 0.90 | 1.00 | | | | | | | | | | |
| 11 | 0.86 | 0.84 | 0.87 | 0.86 | 0.85 | 0.87 | 0.90 | 0.83 | 0.89 | 0.91 | 1.00 | | | | | | | | | |
| 12 | 0.83 | 0.84 | 0.86 | 0.85 | 0.85 | 0.87 | 0.90 | 0.81 | 0.87 | 0.88 | 0.92 | 1.00 | | | | | | | | |
| 13 | 0.83 | 0.84 | 0.84 | 0.83 | 0.81 | 0.83 | 0.83 | 0.84 | 0.82 | 0.84 | 0.86 | 0.82 | 1.00 | | | | | | | |
| 14 | 0.84 | 0.82 | 0.82 | 0.85 | 0.81 | 0.83 | 0.83 | 0.77 | 0.84 | 0.84 | 0.86 | 0.83 | 0.87 | 1.00 | | | | | | |
| 15 | 0.81 | 0.79 | 0.81 | 0.81 | 0.82 | 0.82 | 0.81 | 0.77 | 0.82 | 0.81 | 0.85 | 0.82 | 0.82 | 0.86 | 1.00 | | | | | |
| 16 | 0.85 | 0.85 | 0.87 | 0.88 | 0.86 | 0.87 | 0.87 | 0.84 | 0.85 | 0.88 | 0.89 | 0.88 | 0.83 | 0.84 | 0.86 | 1.00 | | | | |
| 17 | 0.86 | 0.85 | 0.86 | 0.86 | 0.85 | 0.88 | 0.85 | 0.81 | 0.86 | 0.88 | 0.89 | 0.87 | 0.85 | 0.87 | 0.85 | 0.90 | 1.00 | | | |
| 18 | 0.87 | 0.88 | 0.88 | 0.85 | 0.85 | 0.89 | 0.89 | 0.83 | 0.85 | 0.87 | 0.89 | 0.90 | 0.86 | 0.85 | 0.82 | 0.90 | 0.93 | 1.00 | | |
| 19 | 0.47 | 0.47 | 0.48 | 0.45 | 0.44 | 0.45 | 0.44 | 0.52 | 0.45 | 0.44 | 0.48 | 0.46 | 0.47 | 0.45 | 0.44 | 0.44 | 0.45 | 0.45 | 1.00 | |
| 20 | 0.39 | 0.41 | 0.42 | 0.39 | 0.40 | 0.41 | 0.40 | 0.45 | 0.42 | 0.41 | 0.45 | 0.40 | 0.44 | 0.37 | 0.38 | 0.40 | 0.41 | 0.41 | 0.46 | 1.00 |

**ภาพที่ 4** ค่าดัชนีความเหมือนของปลาไหลเผือกใหญ่และพืชเปรียบเทียบ จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย ISSR จำนวน 21 ไพรเมอร์

## 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

**สรุปผลการทดลอง**

การศึกษาพันธุกรรมปลาไหลเผือกใหญ่ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน พบว่า มีความใกล้ชิดของพันธุกรรม หรือสอดคล้องกับสภาพพื้นที่ แต่ไม่สามารถสังเกตความแตกต่างได้ชัดเจนจากภายนอก และเมื่อจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล ISSR สามารถจำแนกปลาไหลเผือกใหญ่ได้เป็น 2 กลุ่ม โดยมีค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์อยู่ระหว่าง 0.37 ถึง 0.93 ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุล ISSR เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ดี วิธีที่ง่ายมีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ซึ่งข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาไหลเผือกใหญ่ที่ได้ จะถูกนำไปใช้วางแผนในการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมต่อไป

**ข้อเสนอแนะ**

การจำแนกความหลากหลายของพันธุกรรม ปัจจุบันนิยมใช้เครื่องหมายโมเลกุล Single Nucleotide Polymorphisms หรือ SNPs เนื่องจากสามารถศึกษาพืชได้ทั้งจีโนม รวดเร็วและทำได้ครั้งละหลายตัวอย่าง (มากกว่า 96 ตัวอย่าง/ครั้ง) ฉะนั้น เพื่อให้การศึกษาความสัมพันธ์ของปลาไหลเผือกของประเทศซึ่งมีในหลายพื้นที่ สามารถเลือกใช้วิธี SNPs ได้ และใช้ไพรเมอร์ 21 ไพรเมอร์จากการศึกษานี้ในการตรวจสอบได้

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

**ผลงานวิจัยสิ้นสุดนี้ นำไปใช้ประโยชน์ได้** ดังนี้

1.เป็นฐานข้อมูลพันธุ์ปลาไหลเผือกใหญ่สำหรับการอนุรักษ์และคัดเลือกเพื่อการพัฒนาพันธุ์ต่อยอดสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

2.นำไปขยายผลประกอบความรู้ด้านพันธุกรรม คุณประโยชน์และสร้างจิตสำนึกการอนุรักษ์พันธุกรรมให้กับชุมชนในพื้นที่และผู้ที่สนใจต่อไป

**กลุ่มเป้าหมาย** ดังนี้

1.นักอนุรักษ์พันธุ์พืช

2.นักวิจัย ได้แก่ นักปรับปรุงพันธุ์พืช นักสาธารณสุข นักวิจัยและพัฒนาการผลิต เป็นต้น

3.หน่วยงานภาคประชาสัมพันธ์ ได้แก่ กรมส่งเสริมการเกษตร ส่วนบริหารส่วนท้องถิ่น สาธารณสุขท้องถิ่น เป็นต้น

## 11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณผู้บริหารของกรมวิชาการเกษตร ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณสำหรับการวิจัย

ขอขอบคุณผู้บริหารและผู้เชี่ยวชาญของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7 ที่ให้คำปรึกษาเป็นอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณคณะผู้วิจัยและทีมงานวิจัยของหน่วยงานวิจัยทุกท่าน ที่มีความตั้งใจและช่วยกันดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์อย่างไม่ย่อท้อและมุ่งมั่นเป็นอย่างดียิ่ง

**12. เอกสารอ้างอิง**

ชฎาพร เสนาคุณ. 2553. โครโมโซมพืชในป่าโคกหินลาดหนองคู-นาดูน. วารสานวลัยรุกขเวช 11: 3-7.

มัณฑนา นวลเจริญ. 2552. พรรณไม้ป่าชายหาด. ปทุมธานี. สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. หน้า 13 และ หน้า 92.

พิชานันท์ ลีแก้ว. 2561. ปลาไหลเผือก สมุนไพรสำหรับสภาพบุรุษ. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพ.

นิจศิริ เรืองรังสี และธวัชชัย มังคละคุปต์. 2547. สมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ. บี เฮลท์ตี้. หน้า 239.

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

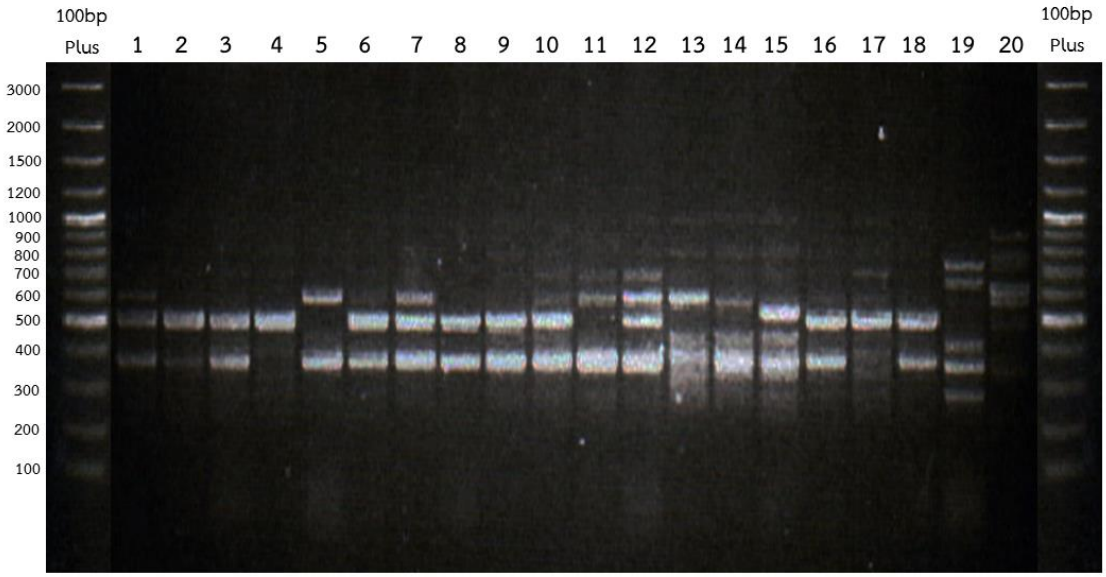
Rohlf, F.J. 2000. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1 User Guide F. James Rohlf Department of Ecology and Evolution State University of New York Stony Brook, NY 11794-5245. 44 pages.

http://biodiversity.forest.go.th/index.

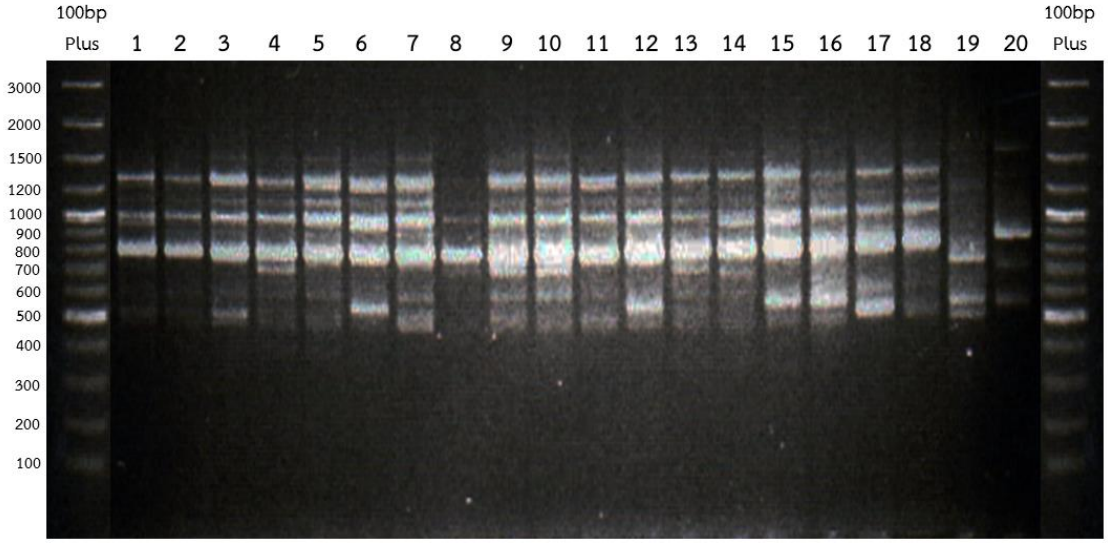
Smitinand, T. 1981. Flora of Thailand Vol. Two Part Four. The Tistr Press, Bangkok.

Nooteboom, H.P. 1962. Simaroubaceae. In Flora Malesiana Vol. 6: 205-207.

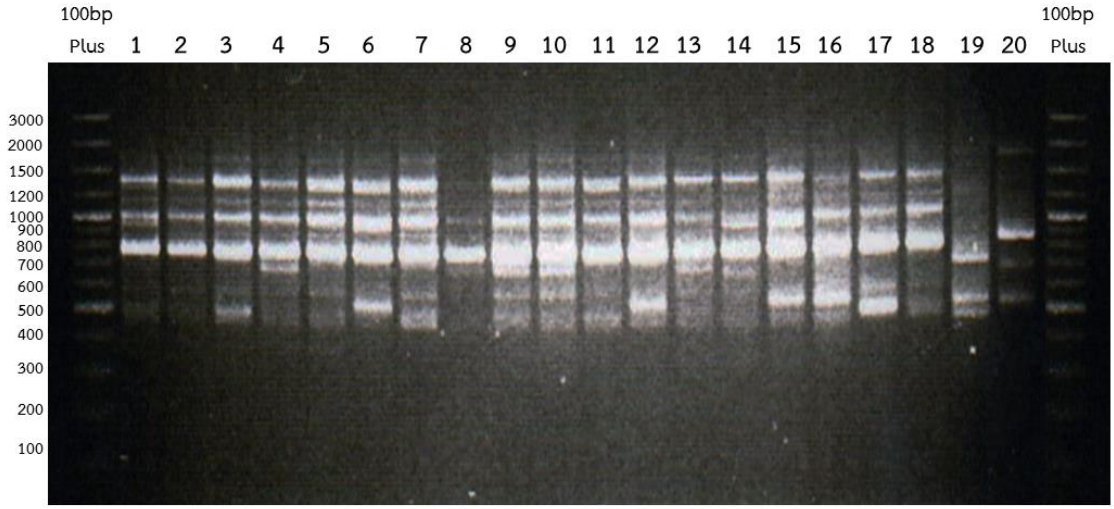
**13. ภาคผนวก**



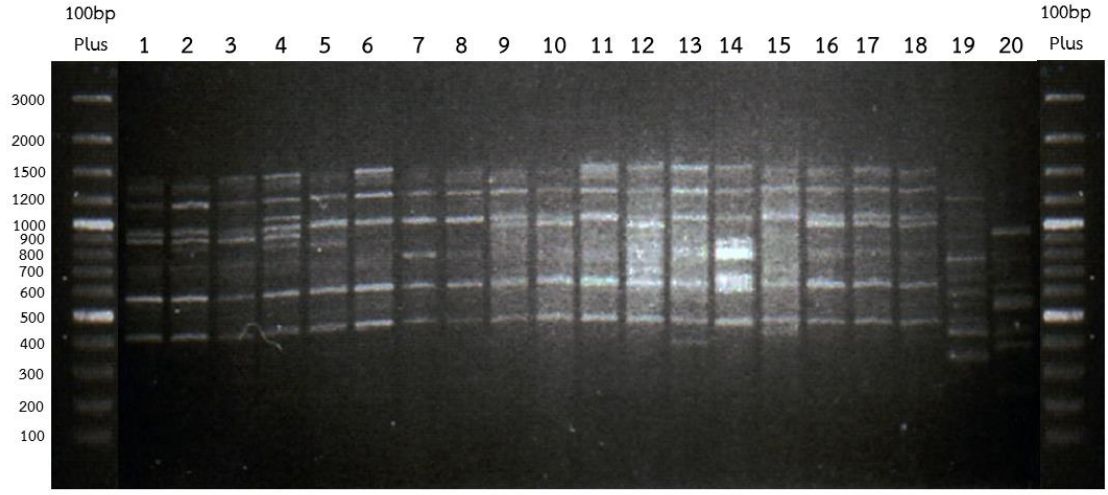

UBC807



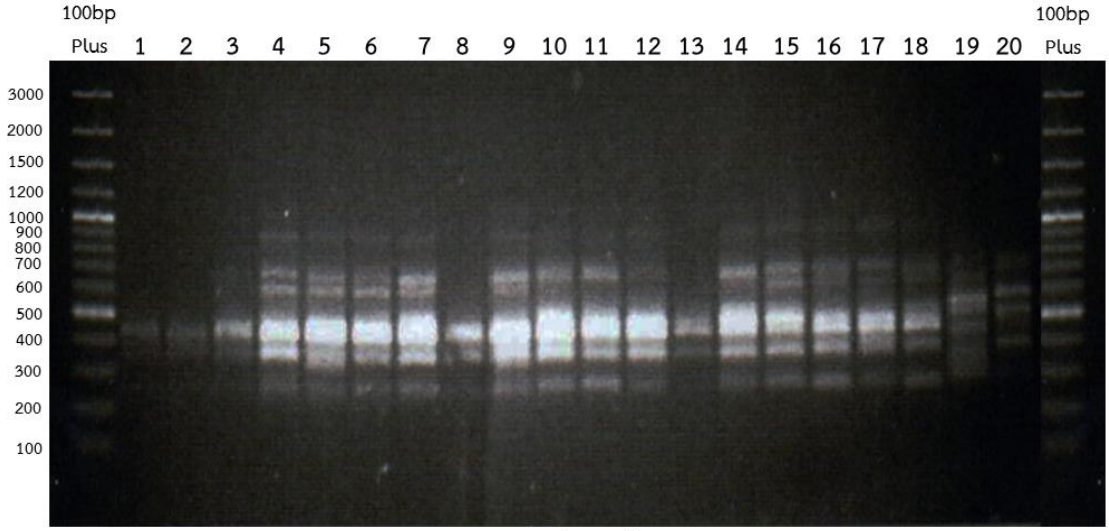

UBC810



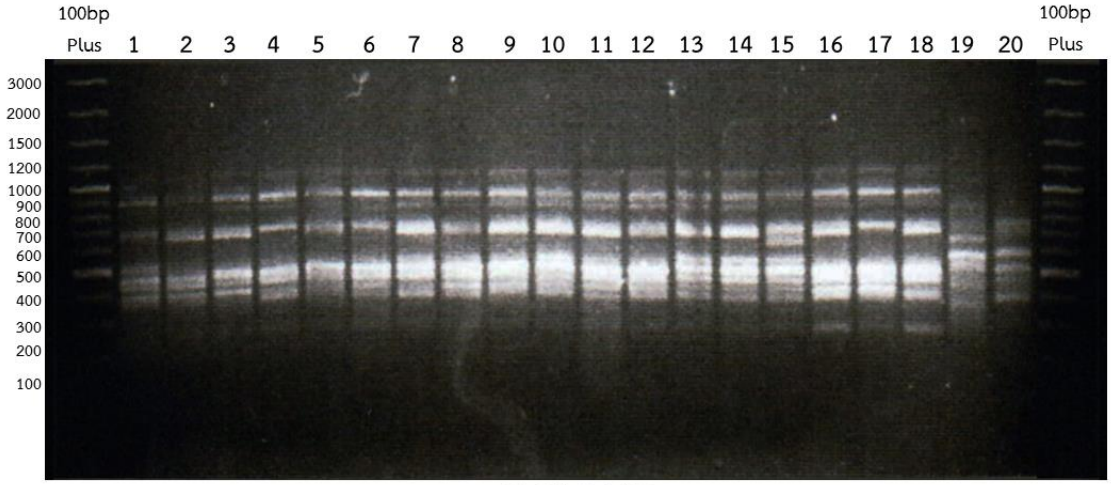

(CAG)5



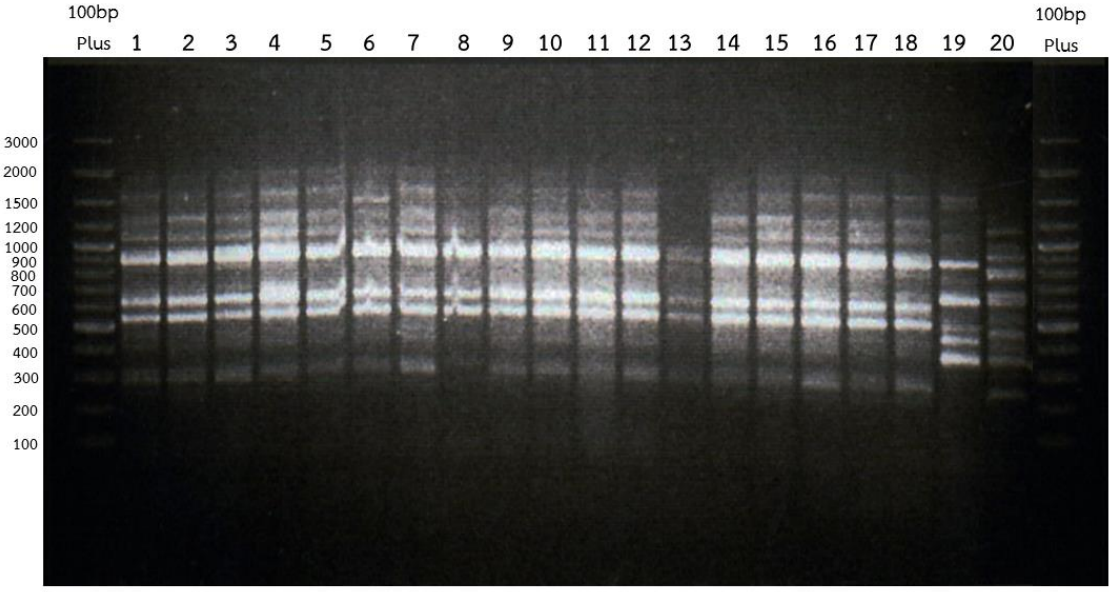

(AGC)5AY



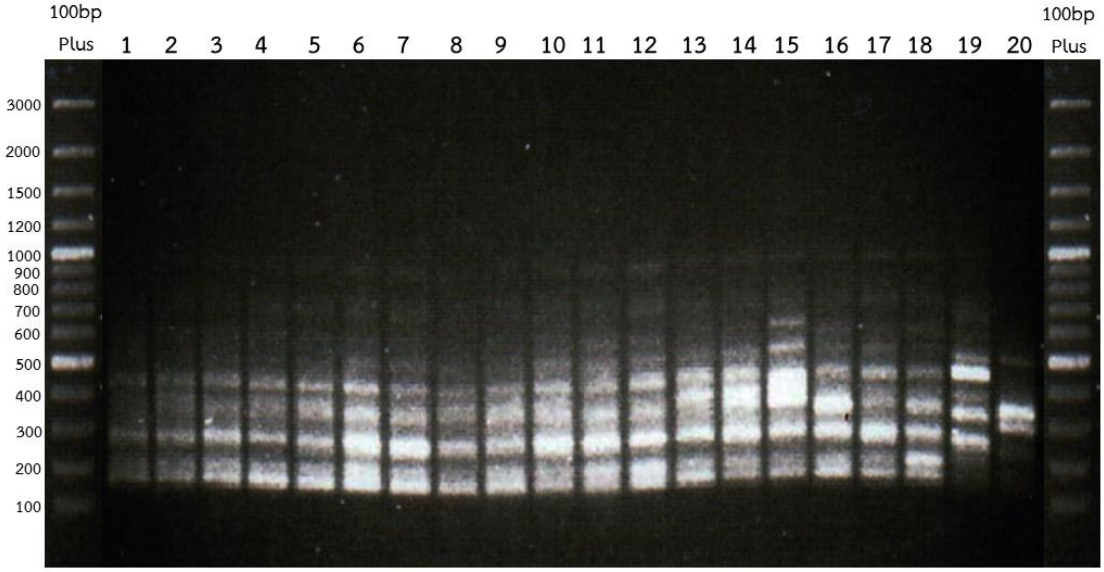

CA(GA)8



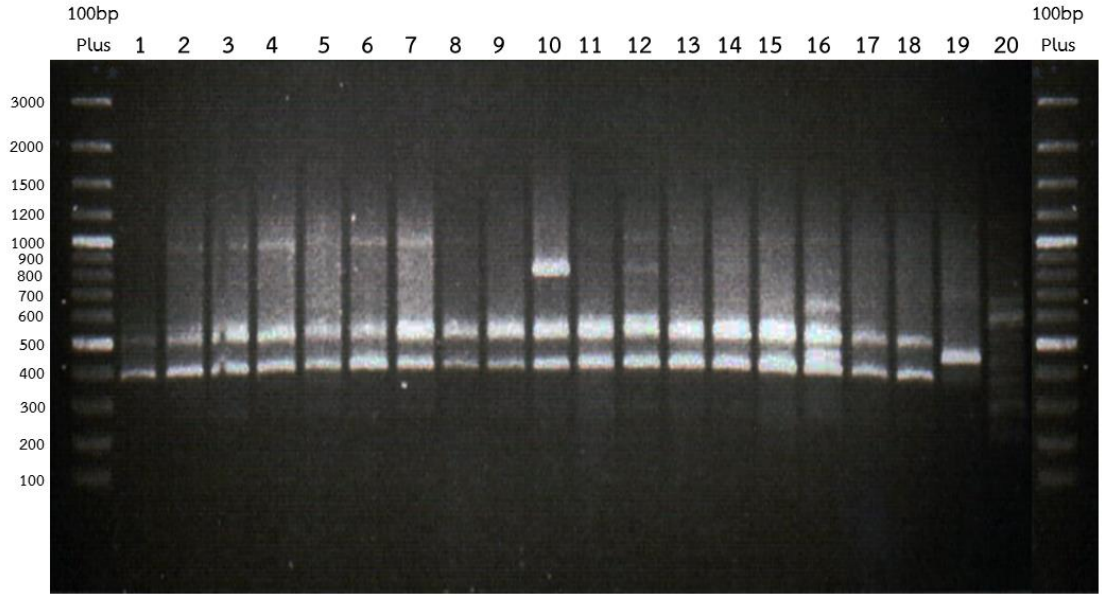

GC(GA)8



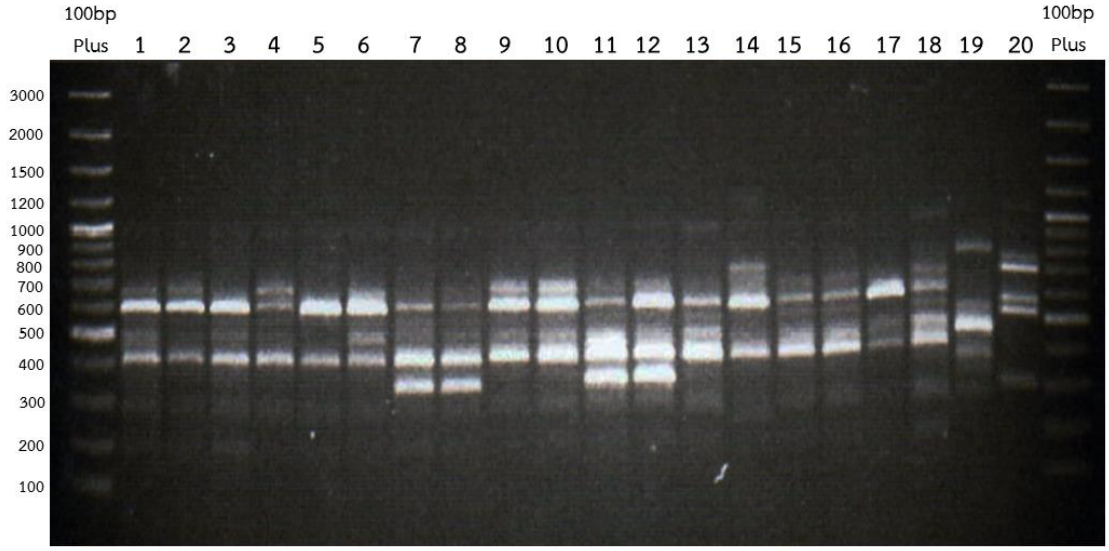

(AGC)5Y



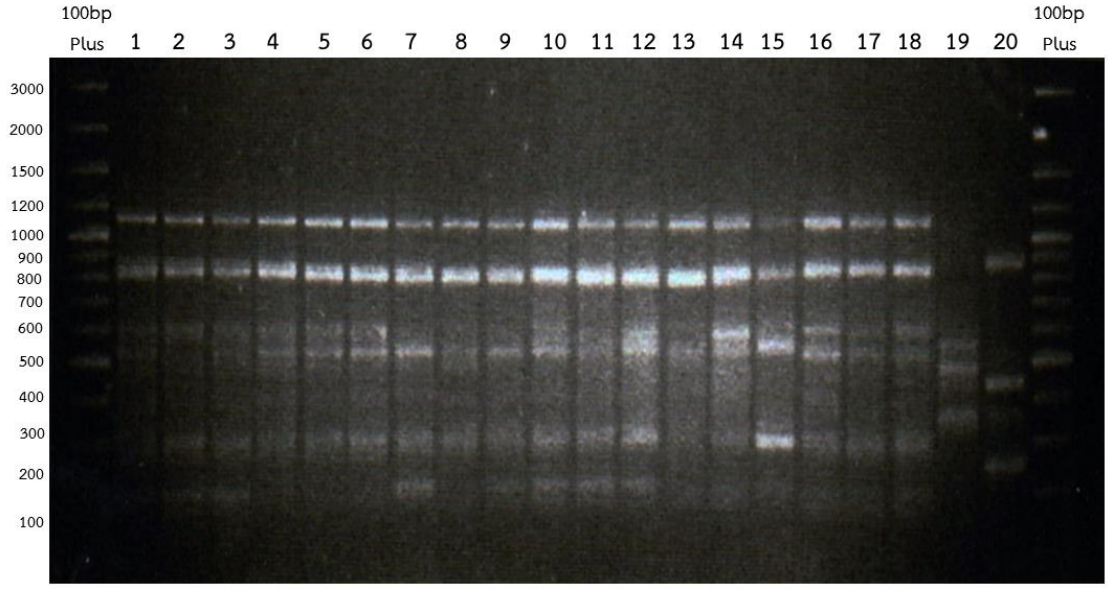

UBC809



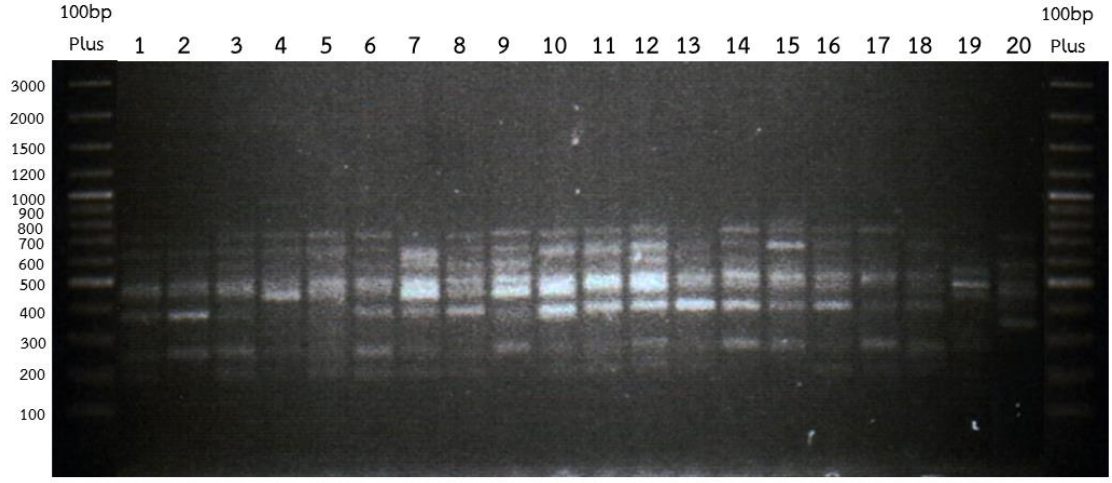

UBC846



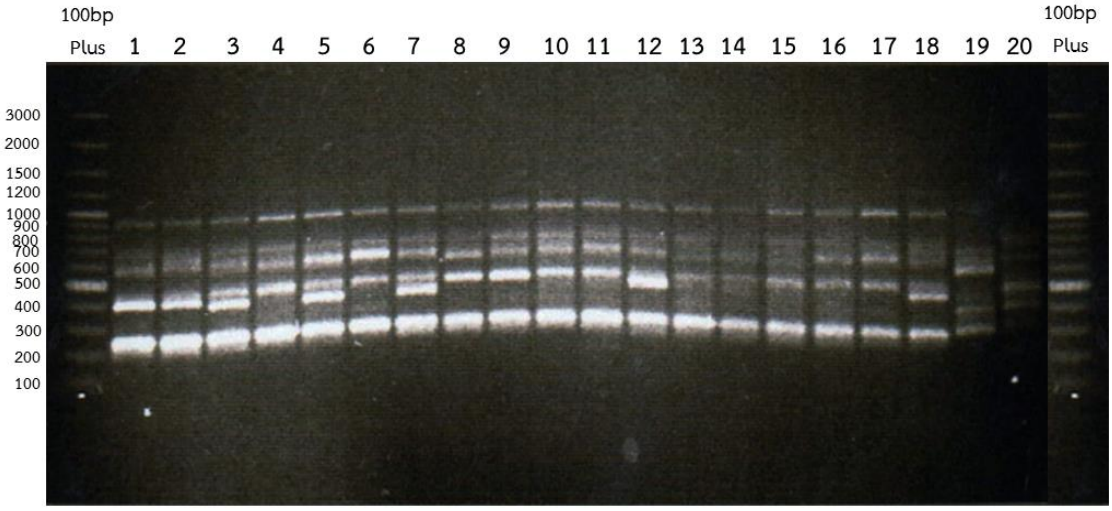

UBC868



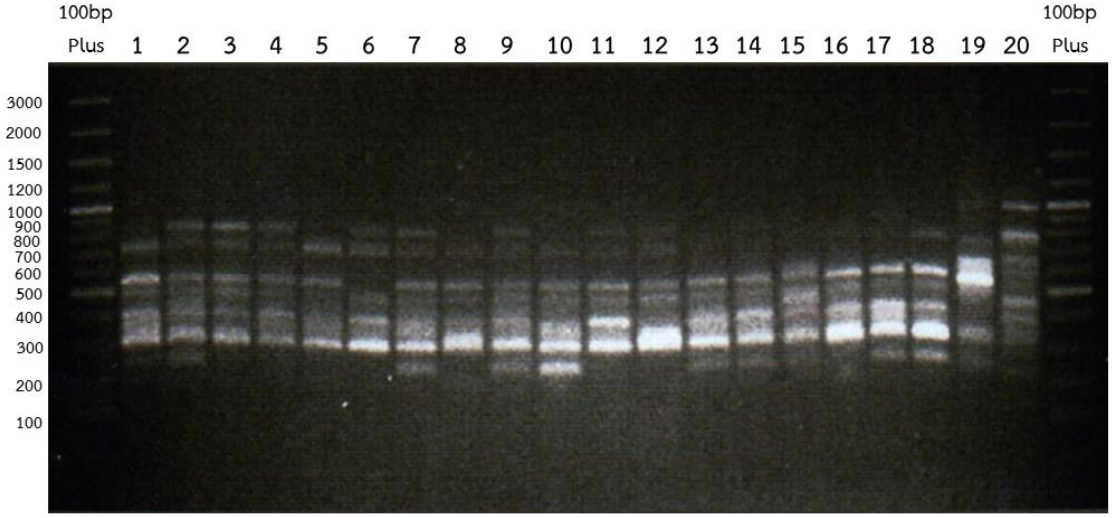

UBC880



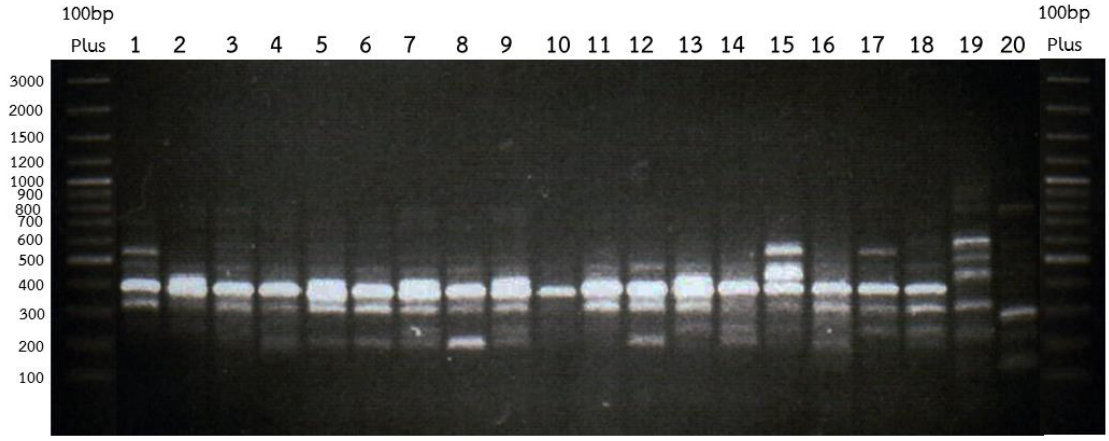

UBC887



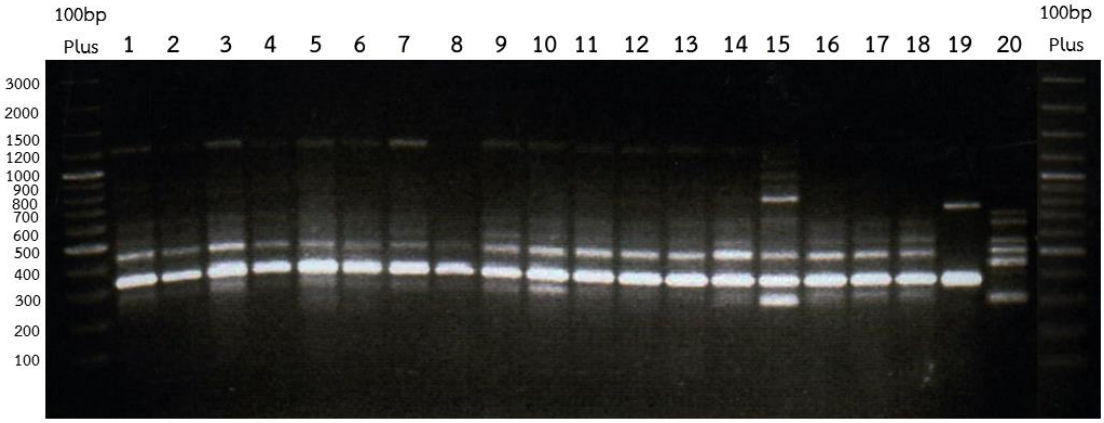

UBC888



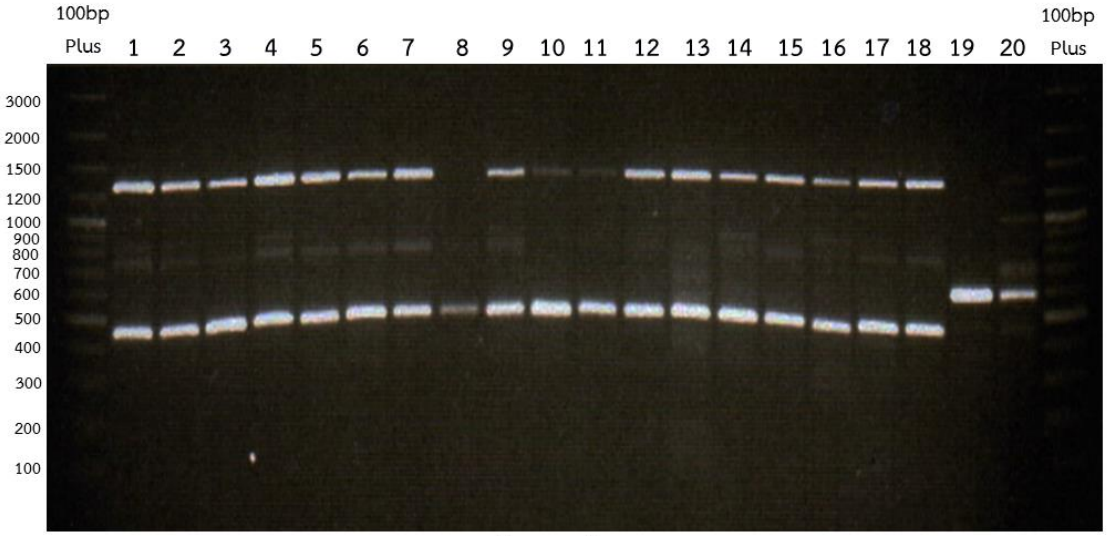

UBC890



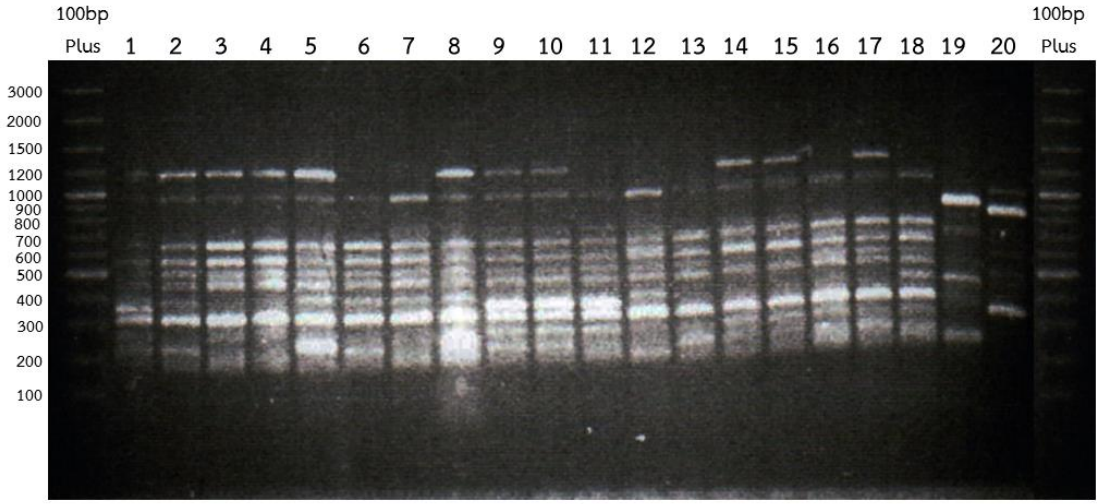

UBC891



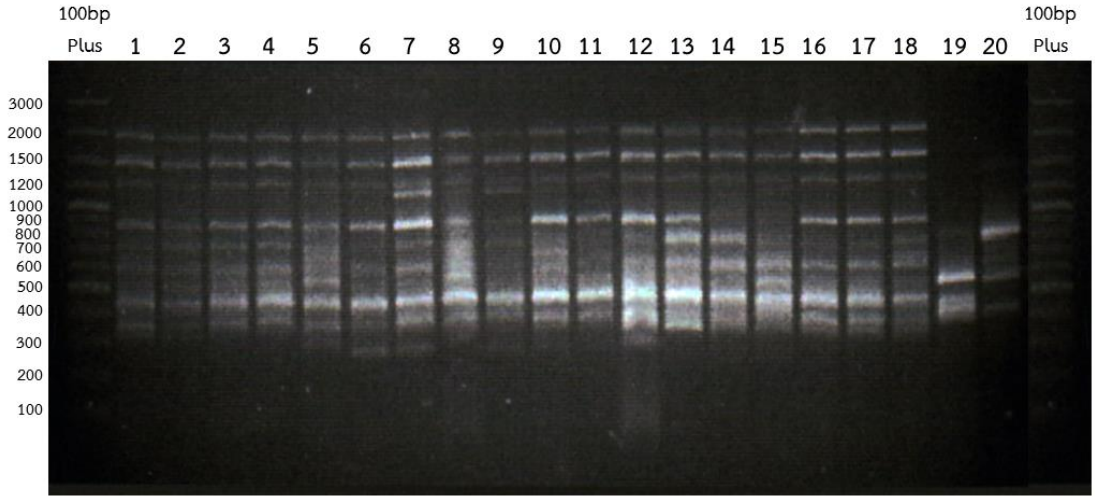

(ATG)6G



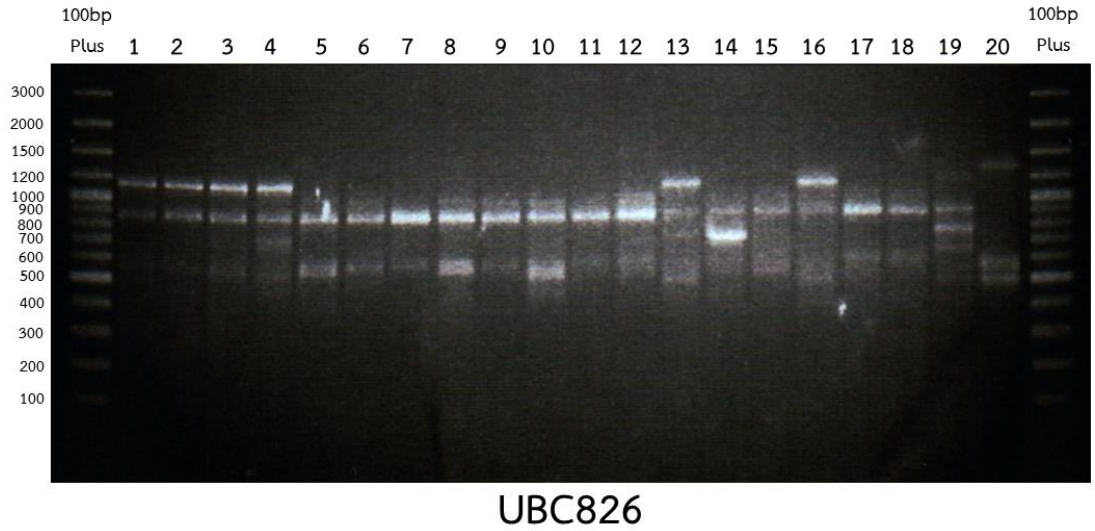

CT(CCT)3CAC




UBC835




UBC817




**ภาพภาคผนวกที่ 1** แสดงแถบดีเอ็นปลาไหลเผือกและพืชเปรียบเทียบ ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR จำนวน 21 ไพรเมอร์ บนเจลอะกาโรส 2%