

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของมะกา (*Bridelia ovata* Decne.)

ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายโมเลกุล ISSR

Evaluating Biodiversity of *Bridelia ovata* by Using Morphological Characteristic and ISSR Marker

นันทชญาณ์ พัทธ์พีริยา^{1*} ปริชาติ ดิษฐกิจ¹ บุณทริกา นันทา¹ และพิเชฐ บัญญัติ²

Nunchaya Patpeeriya^{1*}, Parichat Dittakit¹, Buntarika Nuntha¹ and Phichet Bunyat²

¹สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช นนทบุรี 11120

²กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี 11000

¹School of Agriculture and Cooperatives, Sukhothai Thammathirat Open University, Nonthaburi, Thailand 11120

²Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand 11000

*Corresponding author: puy_1980@hotmail.com

Received: March 17, 2023

Revised: April 24, 2023

Accepted: April 27, 2023

Abstract

Makaa (*Bridelia ovata* Decne.) is classified in the Family Euphorbiaceae, Genus *Bridelia* varies among more than 60 species in Africa and Asia, especially in Thailand. Makaa extract includes friedelin, stigmasterol, β -sitosterol and campesterol. These substances have anti-inflammatory effects on human muscle and can inhibit lung cancer cells *in vitro*. This study aimed to study the biodiversity and to collect morphological data of Makaa varieties in Thailand. Morphological data and DNA samples were collected from 101 Makaa plants from 20 provinces of Thailand. Makaa leaves were measured for width, length, width to length ratio, and the number of veins. Using 96 pairs of ISSR primer for accessing genotypic data, only 12 markers showed polymorphism in the Makaa population. The average polymorphism information indexes of this study were 0.31. The phylogenetic of morphological leaf data was calculated in UPGMA and neighbor joining model by MEGA 7.0 program. The UPGMA morphological tree could not group a cluster from province and area. However, the phylogenetic tree using the neighbour joining method still groups most samples from the same province and nearly region in the same clade. This result suggested that using genotypic information had higher efficiency than morphological data for studying the biodiversity of Makaa.

Keywords: Makaa, *Bridelia odata* Decne., ISSR technique, genetic diversity

บทคัดย่อ

มะกา (Makaa, *Bridelia ovata* Decne.) จัดอยู่ในวงศ์ ยางพารา (Euphorbiaceae) ในสกุล *Bridelia* ที่มีความหลากหลายกว่า 60 สปีชีส์ ในบริเวณแอฟริกาและเอเชีย รวมถึงประเทศไทย ในมะกามีสารสำคัญหลายชนิดได้แก่ Friedelin stigmasterol β -sitosterol และ Campesterol ที่มีฤทธิ์ช่วยแก้ท้องเสีย รวมถึงยับยั้งเซลล์มะเร็งในระดับห้องทดลอง วัตถุประสงค์การทดลองในครั้งนี้เพื่อศึกษาทางสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะกาในประเทศไทย ทำการเก็บตัวอย่างมะกา 101 ต้น จาก 20 จังหวัดในประเทศไทย ทำการตรวจวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ความกว้าง ความยาว อัตราส่วนระหว่างความกว้างและความยาว และจำนวนเส้นใบของมะกา ทำการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR ทั้งหมด 96 ไพรเมอร์ พบ 12 ไพรเมอร์ ที่ให้ความแตกต่างในประชากรมะกา ทำการคำนวณค่า Polymorphism information indexes เฉลี่ยเท่ากับ 0.31 การสร้างแผนภูมิของข้อมูลทางสัณฐานวิทยาด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 วิธีการ UPGMA พบว่าไม่สามารถจับกลุ่มตัวอย่างตามภูมิภาคหรือจังหวัดได้ ในส่วนของการสร้างแผนภูมิของข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยวิธีการ Neighbor-joining พบว่าไม่สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามภูมิภาคได้อย่างชัดเจน แต่สามารถใช้จัดกลุ่มจากเขตจังหวัดและเขตพื้นที่จังหวัดใกล้เคียงได้

Keywords: มะกา *Bridelia odata* Decne.
เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR
ความหลากหลายทางพันธุกรรม

คำนำ

มะกา (Makaa) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Bridelia ovata* Decne. เป็นไม้เลื้อยเนื้อแข็ง ในสกุล *Bridelia* จัดอยู่ในวงศ์ ยางพารา (Euphorbiaceae) พืชสกุลนี้มีความหลากหลายทางด้านชนิดพันธุ์มากกว่า 60 ชนิด ส่วนใหญ่พบการกระจายพันธุ์ในแอฟริกา เกาะมาดากัสการ์ เยเมน อินเดีย จีนตอนใต้ ครอบคลุมถึงพื้นที่เขตอินโดจีนรวมทั้งประเทศไทย (Yeboah *et al.*, 2022) ซึ่งมีรายงานพืชในสกุล *Bridelia* ไว้จำนวน 10 ชนิด (Chayamarit and Welzen, 2005) สำหรับพืชในสกุล *Bridelia* นั้นมีการนำมาใช้ในรูปแบบของสมุนไพรอย่างกว้างขวาง แตกต่างกันไปตามชนิดของมะกาที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคที่แตกต่างกัน ส่วนของมะกาที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรค ได้แก่ เปลือก ราก ลำต้น ใบ และผล (Ngueyem *et al.*, 2009) เข้าตำรับยาแพทย์แผนไทยหลายตำรับยาด้วยกัน เช่น ยานึ่งหน้าท้องให้ยุบยาแก้สันนิบาตหน้าเพลิง ยาถ่ายดีเกลือฝรั่ง ยาผายโลหิต ยาคลอดบุตรอยู่ไฟมิได้ ยาขับโลหิตบุพโพ และยาแก้กษัยปลวก (Wutthummawej, 2011) โดยในใบมะกามีสารสำคัญในกลุ่ม Hexane dichloromethane และ Methanol เช่น Friedelin stigmasterol β -sitosterol และ Campesterol (Thongkon, 1995) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดในห้องทดลอง (Poofery *et al.*, 2020)

ในพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดได้มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับความหลากหลายทั้งทางชีวภาพ สารสำคัญ และพันธุกรรม เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการต่อยอดงานวิจัยและนวัตกรรมเกี่ยวกับสมุนไพรไทย เช่น วานชักมดลูก ข่า ไพล และขมิ้นชัน (Laosatit, 2010;

Khunpiban, 2010; Bua-in, 2009; Thaikert, 2009) ทั้งนี้ การศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมและ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะกอกในประเทศไทย มีความจำเป็นต่อการศึกษาและอนุรักษ์ โดยในการทดลอง ครั้งนี้ได้ทำการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR มาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในมะกอก เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR เป็นเครื่องหมาย ที่มีความสามารถในการแยกแยะความแตกต่างของ ลักษณะพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต ราคาถูก ง่ายแก่การทำการ ทดลอง รวมถึงสามารถตรวจสอบผลการทดลองซ้ำได้ (Ng and Tan, 2015; Pradeep Reddy *et al.*, 2002; Godwin *et al.*, 1997) วัตถุประสงค์ของการทดลองครั้งนี้ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรมของมะกอกในประเทศไทย โดยหวังว่าการ ทดลองในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการต่อยอด ไปใช้ประโยชน์ ทั้งในด้านประเมินเชื้อพันธุกรรมและ งานด้านการอนุรักษ์สมุนไพรพื้นถิ่นในประเทศต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างพืชและข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

ทำการเก็บตัวอย่างมะกอก 101 ต้น จาก 20 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี ขอนแก่น จันทบุรี ชัยนาท ชัยภูมิ ตราด นครนายก นครปฐม นครราชสีมา นนทบุรี ปทุมธานี ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก เพชรบุรี มหาสารคาม ระยอง ราชบุรี ลำปาง สมุทรปราการ และสุพรรณบุรี โดยทำการเก็บใบอ่อนปริมาณ 5 กรัม ใส่ใน ซิลิกาเจลสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ทำการตรวจวัดและเก็บ ข้อมูลความกว้างใบและความยาวใบ เพื่อใช้สำหรับคำนวณ อัตราส่วนความกว้างต่อความยาวใบ และจำนวนเส้นใบ ทำการตรวจวัดและเก็บข้อมูลความกว้าง ความยาวของใบ เพื่อใช้สำหรับคำนวณอัตราส่วนความกว้างต่อความยาวใบ และจำนวนเส้นใบ จากใบมะกอกที่สมบูรณ์โดยใช้ใบที่ 6-9 จากปลายกิ่ง โดยทำการเก็บจากกิ่งมะกอกที่สมบูรณ์ 5 กิ่ง กิ่งละ 2 ใบ

การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบมะกอกตัวอย่างละ 0.02 กรัม มาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Modified CTAB เดิมไนโตรเจนเหลวและบด ให้ละเอียดด้วยโกร่ง นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่หลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 1.5 มล. จากนั้นเติมสารละลาย CTAB buffer ปริมาตร 1 มล. (2%(w/v) CTAB, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl (pH 8.0) 0.2%(v/v) β -mercaptoethanol) โดยเติม 1% (v/v) PVP ผสมกับ CTAB buffer ด้วย นำไปหมุนเหวี่ยงให้สารละลายเข้ากัน เติม RNase A (ความเข้มข้น 10 มก./มล.) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C. 90 นาที หลังจาก นั้นวางให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับ หลอดขึ้นลงเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบน ใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนด้วย Isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ตกตะกอนทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20°C. นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C. นาน 10 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนทิ้ง เติมสารละลาย Wash buffer (70% ethanol) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร กลับหลอด ไปมาเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที และดูดของเหลวใสส่วนบนทิ้ง จากนั้นตาก ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายตะกอน ดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการสกัดดีเอ็นเอซ้ำด้วยการประยุกต์ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ NucleoSpin® Genomic DNA from plant (Macherey-Nagel, Germany) นำสารละลายดีเอ็นเอมะกอกมาละลาย ใน TE buffer ให้มีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร เติม บัฟเฟอร์ PC ปริมาตร 450 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา เบา ๆ ดูดสารละลายดีเอ็นเอทั้งหมดใส่ในคอลัมน์ นำไป ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที ดูดของเหลวใสส่วนบนทิ้ง ล้างด้วย PW1 wash buffer 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ล้างด้วย PW2 wash buffer 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที

และล้างด้วย PW2 wash buffer 200 ไมโครลิตรอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เปลี่ยนคอลัมน์ใส่หลอดใหม่ ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ Elution buffer 30 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที ทำซ้ำอีกครั้ง ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ TBE buffer จากนั้นนำมาวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A260/A280) และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20°C.

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (ProFlex™ Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA) โดยใช้เอนไซม์ Quick Taq™ HS DyeMix (TOYOBO, Japan) นำดีเอ็นเอต้นแบบมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) จำนวน 96 คู่ไพรเมอร์ (UBC 801-896) โดยผสม PCR reaction mix (น้ำ 8.2 ไมโครลิตร 2x Quick Taq™ HS DyeMix 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ISSR 0.8 ไมโครลิตร และ DNA template 1 ไมโครลิตร) ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ทำพีซีอาร์ครั้งแรก โดยใช้โปรแกรมที่ 1 Pre-denaturing ที่ความร้อน 94°C. นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 Denaturing ที่ 94°C. นาน 30 วินาที โปรแกรมที่ 3 Annealing ที่ 26-70°C. นาน 45 วินาที (ขึ้นอยู่กับ Tm ของไพรเมอร์) โปรแกรมที่ 4 Extension ที่ 72°C. นาน 1 นาที ซ้ำโปรแกรมที่ 2-4 จำนวน 34 รอบ โปรแกรมที่ 5 Final extension ที่ 72°C. นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ นำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1.5% ใน TBE buffer เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder marker (SibEnzyme®, USA)

ในบางไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรมปกติได้ มีการประยุกต์การทำพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรม Step up (โปรแกรมที่ 1 Pre-denaturing ที่ 94°C. นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2

Denaturing ที่ 94°C. นาน 1 นาที โปรแกรมที่ 3 Annealing ที่ 45°C. นาน 1 นาที และโปรแกรมที่ 4 Extension ที่ 72°C. นาน 75 วินาที จำนวน 10 รอบ โปรแกรมที่ 5 Denaturing ที่ 94°C. นาน 1 นาที โปรแกรมที่ 6 Annealing ที่ 51°C. นาน 1 นาที โปรแกรมที่ 7 Extension ที่ 72°C. นาน 75 วินาที จำนวน 30 รอบ และโปรแกรมที่ 8 Final extension ที่ 72°C. นาน 7 นาที) นำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% ใน TBE buffer เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder marker (SibEnzyme®, USA)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม

การคำนวณความหลากหลายทางพันธุกรรมเริ่มจากการใช้ข้อมูลอัลลีลของเครื่องหมายโมเลกุล ISSR ที่แสดงความแตกต่างระหว่างประชากรมะกอกและความยาวใบ ความกว้างใบ ค่าอัตราส่วนระหว่างความกว้างและความยาวของใบ และจำนวนเส้นใบของมะกอก ทำการกำหนดพารามิเตอร์ ได้แก่ จำนวนอัลลีล (NA) [The number of alleles] ค่าการเกิดเฮเทอโรไซโกสในประชากร (H0) [Observed heterozygosity] ความหลากหลายของยีนหรืออัลลีลที่พบ [He; Expected heterozygosity, Gene diversity] ค่า Polymorphism information content (PIC) ของเครื่องหมายโมเลกุล แต่ละเครื่องหมายคำนวณโดยใช้

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 = \sum_{i=1}^{n-1} 2f_i^2 f_j^2$$

โดย $n = Na$

f_i = ความถี่ของจำนวนอัลลีล i

f_j = ความถี่ของจำนวนอัลลีล j ของโลคัสที่ 1

ทำการคำนวณค่า Population structure ของประชากรมะกอกทั้งหมด 101 ต้น โดยใช้โปรแกรม STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) ทำการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สมมุติของประชากร หรือค่า

Assumed population (K) โดยตั้งค่าการจำลองการคำนวณที่ 20 รอบ กำหนดช่วงของค่า K อยู่ที่ 1 ถึง 10 และจำนวนซ้ำในการวิเคราะห์ที่ 10,000 ถึง 50,000 รอบ โดยใช้อัลกอริทึมของ Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) จากนั้นทำการวิเคราะห์เพื่อประมาณค่า K ที่ดีที่สุด โดยใช้ The ad-hoc ΔK ของ Evanno (Evanno *et al.*, 2005)

ในขั้นตอนสุดท้ายทำการวิเคราะห์ Structure อีกครั้งด้วยค่า K โดยทำการตั้งค่าจำนวนซ้ำในการวิเคราะห์ที่ 100,000 ถึง 500,000 ครั้ง ด้วยอัลกอริทึม MCMC เพื่อสร้างแผนภาพทางพันธุกรรมและคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรม ทำการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ Nei's genetic distance โดยใช้โปรแกรม POPULATIONS 1.2.32 นำค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ Neighbor-joining (NJ) และ UPGMA ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016)

ผลการวิจัย

จากการตรวจวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นมะกา ได้แก่ ความกว้างใบ ความยาวใบ และอัตราส่วนความกว้างต่อความยาวของใบ พบว่ามีการกระจายตัวภายในต้นมะกาโดยมีค่าเฉลี่ยของความกว้างใบเท่ากับ 6.18 ซม. ความยาวใบเท่ากับ 10.09 ซม. และอัตราส่วน

เฉลี่ยเท่ากับ 0.61 จำนวนเส้นใบเฉลี่ย 13.32 (Table 1)

ในการตรวจสอบความแตกต่าง (Polymorphism) ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR พบเพียง 12 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่างภายในประชากรของต้นมะกา ได้แก่ เครื่องหมาย UBC866, UBC858, UBC876, UBC880, UBC873, UBC827, UBC826, UBC834, UBC842, UBC855, UBC812 และ UBC817 ในจำนวนไพรเมอร์ทั้ง 12 ไพรเมอร์ ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 113 แถบ พบเครื่องหมาย UBC827 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด 24 แถบ ส่วน UBC812 และ UBC834 แสดงแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดเพียง 3 แถบ (Figure 1) ค่า PIC สูงสุดที่ 0.40 และต่ำสุดที่ 0.12 ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.31 (Table 2)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Neighbor-joining ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 พบว่าไม่สามารถทำการแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามภูมิภาคได้อย่างชัดเจน และไม่สามารถจับกลุ่มตัวอย่างเป็นกลุ่มย่อย (Figure 1) แต่พบว่ากลุ่มต้นมะกาที่มาจากเขตจังหวัดเดียวกันมีการรวมกลุ่มกันเป็นส่วนมาก พบได้ในกลุ่มจังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา นครนายก เพชรบุรี และราชบุรี ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาด้วยวิธีการ UPGMA ไม่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้ รวมถึงกลุ่มตัวอย่างในจังหวัดเดียวกันมีการกระจายตัว (Figure 2)

Table 1 Minimum, maximum, average and standard deviation of width, length, ratio between width and length, and number of veins in *B. ovata* leaves from 101 samples

	Width (cm)	Length (cm)	Ratio between width and length	Number of veins
Minimum	3.17	5.77	0.41	9.00
Maximum	10.33	13.90	0.84	18.00
Average	6.18	10.09	0.61	13.32
SD	1.323	1.635	0.084	1.913

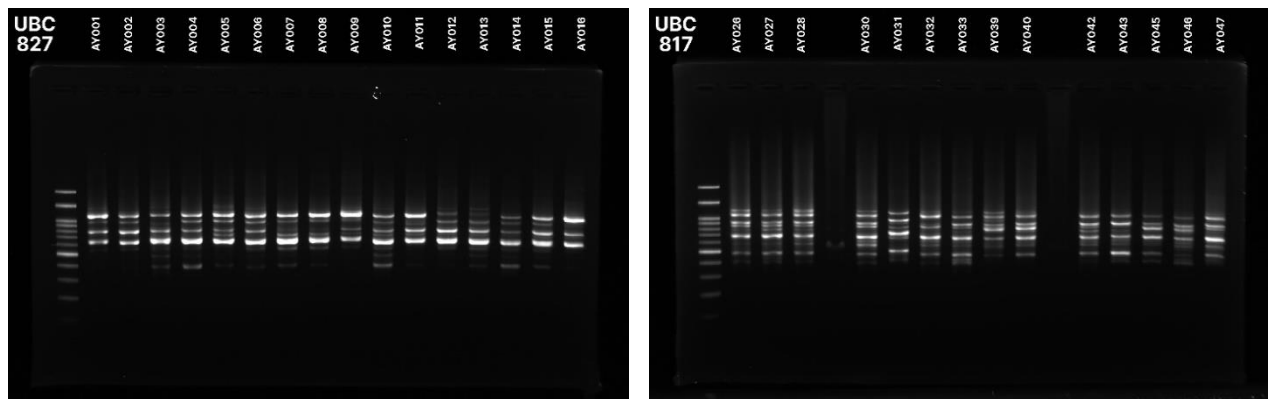


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of *B. ovata* samples with ISSR marker UBC827 and UBC817

Table 2 List of ISSR primers that showed polymorphism in *B. ovata* samples, the number of alleles from ISSR primers, polymorphism information indexes (PICs) of each primer and He (expected heterozygosity)

No.	Primers	Number of Banding	PIC	He
1	UB866	8	0.32	0.303
2	UB858	8	0.32	0.346
3	UB876	7	0.39	0.343
4	UB880	8	0.40	0.402
5	UB873	15	0.12	0.221
6	UB827	24	0.29	0.208
7	UB826	15	0.37	0.281
8	UB834	3	0.28	0.414
9	UB842	9	0.26	0.340
10	UB855	9	0.37	0.322
11	UB812	3	0.31	0.357
12	UB817	4	0.28	0.379
Total		113		
Average		9.42	0.31	

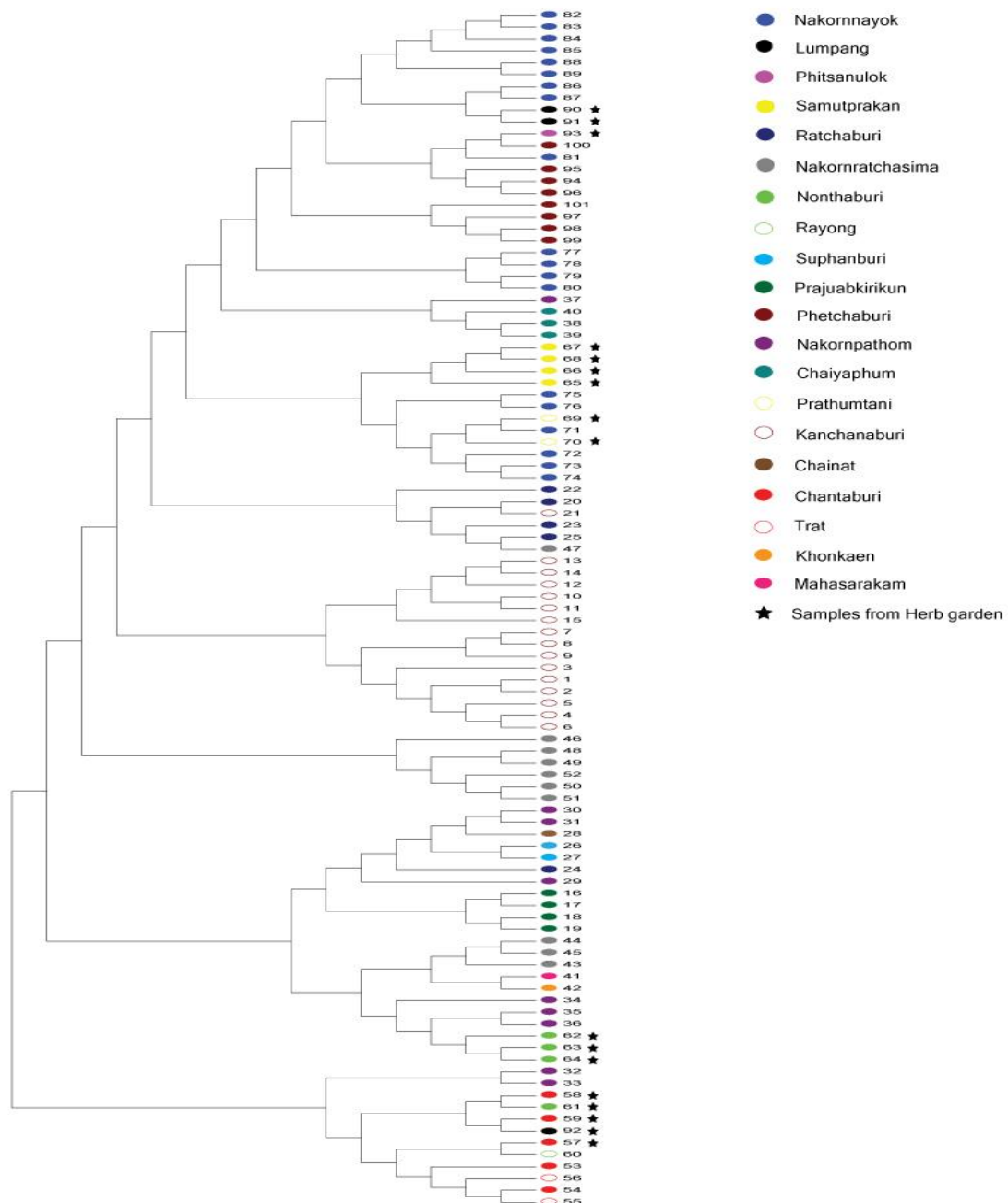


Figure 2 Phylogenetic tree Neighbor-Joining (NJ) method with 101 sample of *B. ovata* from 20 provinces as Kanchanaburi, Nakornnayok, Lumpang, Phitsanulok, Phetchaburi, Ratchaburi, Nakornpathom, Chaiyaphum, Samutprakan, Nonthaburi, Prathumtani, Nakornratchasima, Chainat, Chantaburi, Rayong, Trat, Suphanburi, Khonkaen, Prajuabkirikun, and Maharakam with 12 ISSR markers genotypic data

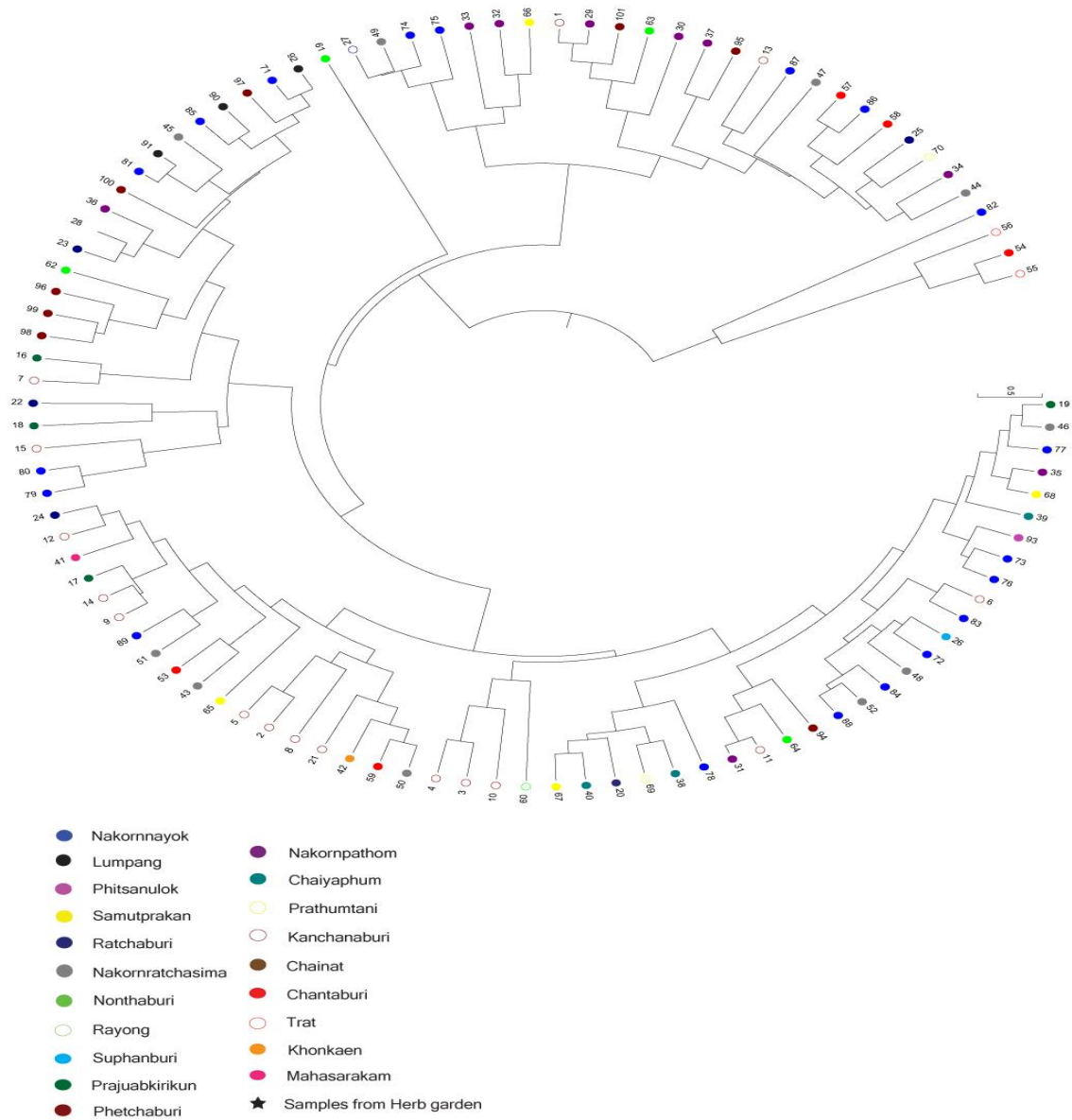


Figure 3 Morphological analysis using UPGMA method with 101 sample of *B. ovata* from 20 provinces as Kanchanaburi, Nakornnayok, Lumpang, Phitsanulok, Phetchaburi, Ratchaburi, Nakornpathom, Chaiphum, Samutprakan, Nonthaburi, Prathumtani, Nakornratchasima, Chainat, Chantaburi, Rayong, Trat, Suphanburi, Khonkaen, Prajuabkirikun, and Mahasarakam with leaves width, leaves length, ration between width and length of leaves, and number of veins of Makaa leaves

วิจารณ์ผลการวิจัย

การทดสอบการแสดงออก Polymorphism ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR ทั้งหมด 96 เครื่องหมาย พบว่าเครื่องหมาย ISSR เพียง 12 ไพรเมอร์ ที่แสดงความแตกต่างในประชากรมะกา อีกทั้งค่า Polymorphism information contents ในเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Dominant marker ค่า PICs อยู่ระหว่าง 0-0.5 โดยเครื่องหมาย ISSR ชุดนี้วิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.3131 แสดงให้เห็นถึงความสามารถของเครื่องหมายโมเลกุลนี้สามารถแยกแยะความแตกต่างของตัวอย่างมะกาได้ เนื่องจากค่า PICs ยิ่งต่ำแสดงให้เห็นถึงโอกาสการเกิด Polymorphism ของแบนสูง เป็นการแสดงออกในลักษณะผกผัน (Yousefi *et al.*, 2015)

แผนภาพจากวิธีการวิเคราะห์ด้วย UPGMA ในลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถใช้ในการจัดกลุ่มตัวอย่างได้ สืบเนื่องจากลักษณะที่ใช้จำแนกน้อยเกินไป รวมถึงการกระจายตัวของลักษณะไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ทำให้การใช้วิธีการจัดกลุ่มด้วยข้อมูลสัณฐานวิทยา ไม่เหมาะกับการจัดกลุ่มของมะกา แตกต่างจากวิธีการใช้ข้อมูลของดอกและเหง้าในการจัดกลุ่มของว่านชัชมดลูก (Laosattit, 2010) หรือในการศึกษาของ Ceylon olive พบว่าลักษณะของปริมาณสารในเนื้อผลและขนาดของผล เหมาะกับการใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากการใช้ลักษณะทั้งหมด 24 ลักษณะ ที่ใช้ในการทดลอง (Raji and Siril, 2021) อีกทั้งในพืชกลุ่มสมุนไพรการใช้สารสกัดจากตัวอย่างควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลก็สามารถใช้แบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ดี (Pandotra *et al.*, 2013) รวมถึงจากการศึกษา การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมแบบ Neighbor-joining แสดงให้เห็นถึงการจับกลุ่มของประชากรมะกา ที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจนตามเขตภูมิภาค แต่ยังคงสามารถจัดกลุ่มในจังหวัดเดียวกันรวมถึงเขตพื้นที่ข้างเคียง

จากตัวอย่าง 20, 21, 22, 23 และ 25 (Figure 1) โดยตัวอย่างที่ 21 เป็นต้นมะกาที่พบอยู่ในเขตรอยต่อของจังหวัดกาญจนบุรีและราชบุรี ตัวอย่างต้นมะกาไม่สามารถรวมกลุ่มกับต้นมะกาจากเขตกาญจนบุรีแต่ถูกจัดรวมกับกลุ่มราชบุรี อีกทั้งยังพบว่าการจัดกลุ่มตัวอย่างจากเขตภาคตะวันออก เช่น จันทบุรี ระยอง และตราด สามารถรวมกันอยู่ในคลดเดียวกัน แม้ว่าจะพบตัวอย่างจากบางจังหวัดถูกรวมกับกลุ่มตัวอย่างนี้ด้วย เช่น นครปฐม (61) และนนทบุรี (92) ในตัวอย่างที่ได้จากสวนสมุนไพรในเขตพื้นที่ลำปาง พิชณุโลก สมุทรปราการ และนนทบุรี จากการสัมภาษณ์พบว่าตัวอย่างจากสวนสมุนไพรในลำปางและพิษณุโลก หมอยาได้ให้ข้อมูลว่าได้ต้นมะกามาจากพื้นที่ภาคกลางแถวจังหวัดเพชรบุรี สอดคล้องกับแผนภาพทางพันธุกรรมในตัวอย่างจากสมุทรปราการและนนทบุรี กลุ่มแพทย์แผนไทยเจ้าของสวนสมุนไพรแจ้งว่าได้รับต้นมะกามาจากพื้นที่นครปฐมและราชบุรี ตรงกับกลุ่มตัวอย่างที่จัดกลุ่มแบบ NJ ทั้งนี้การที่ไม่สามารถจัดกลุ่มแบ่งตัวอย่างได้อย่างชัดเจนอาจเป็นเพราะจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลยังไม่เพียงพอต่อการใช้ในการแบ่งกลุ่มประชากร ในการศึกษาพืชสมุนไพรกลุ่มอื่น เช่น ไพล ข่า ขมิ้นชัน และว่านชัชมดลูก มีการประยุกต์ใช้เครื่องหมายจำนวนมากและมีการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ที่ครอบคลุมในแต่ละพื้นที่ ทำให้ข้อมูลที่ได้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามพื้นที่ได้ดี (Laosattit, 2010; Khunpiban, 2010; Thakert, 2009; Bua-in, 2009) รวมถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในมะกาพบได้น้อย เนื่องจากยังไม่เคยมีการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ในประเทศไทย

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความหลากหลายทางสัณฐานวิทยา และพันธุกรรมในมะกาทั้ง 20 จังหวัด จำนวน 101 ต้น พบว่าประชากรมะกามีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยข้อมูล ความยาว ความกว้าง อัตราส่วน

ระหว่างความกว้างและความยาว และเส้นใบ พบว่าไม่สามารถจับกลุ่มตัวอย่างได้ ในส่วนของการใช้ลักษณะความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย ISSR พบว่าไม่สามารถจับกลุ่มตัวอย่างแบ่งตามเขตภูมิภาคได้อย่างชัดเจน แต่สามารถใช้จับกลุ่มในเขตจังหวัดและพื้นที่ใกล้เคียงได้ค่อนข้างดี จึงสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการอนุรักษ์สมุนไพรพื้นถิ่นของไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชาดิษฐ์กิจ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญทริกา นันทา และนายแพทย์พิเชฐ บัญญัติ ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัยให้ถูกต้องและสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- Bua-in, S. 2009. **Genetic Diversity, Active Compounds and Antioxidant Activity in *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr, and Its Relatives.** Master Thesis. Kasetsart University. 99 p. [in Thai]
- Chayamarit, K. and P.C. van. Welzen. 2005. **Flora of Thailand: Euphorbiaceae (Genera A-F).** Bangkok: The Forest Herbarium, National Park Wildlife and Plant Conservation Department, Thailand. 303 p.
- Evanno, G., S. Regnaut and J.Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology** 14(8): 2611-2620.
- Godwin, I.D., E.A.B. Aitken and L.W. Smith. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. **ELECTROPHORESIS** 18(9): 1524-1528. [Online]. Available <https://doi.org/10.1002/elps.1150180906> (April 12, 2023).
- Khunpiban, A. 2010. **Genetic Diversity of Edible Galanga (*Alpinia* spp.) in Thailand Using AFLP Technique.** Master Thesis. Kasetsart University. 86 p. [in Thai]
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution** 33(7): 1870-1874.
- Laosatit, K. 2010. **Genetic diversity of Waan Chak Modlook (*Curcuma* sp.) in Thailand Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).** Master Thesis. Kasetsart University. 103 p. [in Thai]
- Ngueyem, T.A., G. Brusotti, G. Caccialanza and P.V. Finzi. 2009. The genus Bridelia: a phytochemical and ethnopharmacological review. **Journal of Ethnopharmacology** 124(3): 339-349. [Online]. Available <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.019> (April 12, 2023).

- Ng, W. and S. Tan 2015. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. **ASM Sci J.** 9(1): 30-39.
- Pandotra, P., A.P. Gupta, M.K. Husain. and S. Gupta. 2013. Evaluation of genetic diversity and chemical profile of ginger cultivars in North-Western Himalayas. **Biochemical Systematics and Ecology** 48: 281-287.
- Poofery, J., P. Khaw-On, S. Subhawa, B. Sripanidkulchai, A.Tantraworasin, S. Saeteng, S. Siwachat, N. Lertprasertsuke and R. Banjerdpongchai 2020. Potential of Thai herbal extracts on lung cancer treatment by inducing apoptosis and synergizing chemotherapy. **Molecules** 25(1): 1-30. DOI: 10.3390/molecules 25010231.
- Pradeep Reddy, M., N. Sarla and E. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica** 128: 9-17.
- Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155(2): 945-959.
- Raji, R., and E.A. Siril. 2021. Genetic diversity analysis of promising ceylon olive (*Elaeocarpus serratus* L.) genotypes using morphological traits and ISSR markers. **Current Plant Biology** 26: 1-11. DOI:10.1016/j.cpb.2021.100201.
- Thaikert, R. 2009. **Genetic Diversity and some Active Compounds of Turmeric (Curcuma longa L.)**. Master Thesis. Kasetsart University. 73 p. [in Thai]
- Thongkon, N. 1995. **Chemical Constituents of the Leaves of *Bridelia ovata* Decne.** Master Thesis. Chulalongkorn University. 75 p.
- Wutthummawej, W. 2011. **Encyclopedia of Pharmaceutical in Ratthanakosin Era.** Bangkok: Siam Art Package and Press. 720 p.
- Yeboah, G.N., F.W.A. Owusu, M.-A. Archer, M.O. Kyene, D. Kumadoh, F. Ayertey, S.O. Mintah, P.A.-A. Junior and A.A. Appiah. 2022. *Bridelia ferruginea* Benth.: an ethnomedicinal, phytochemical, pharmacological and toxicological review. **Heliyon** 8: 1-18. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e10366.
- Yousefi, V., A. Najaphy, A. Zebarjadi and H. Safari. 2015. Molecular characterization of Thymus species using ISSR markers. **JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences** 25(4): 1087-1094.