

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นประ (Elateriospermum tapos)
ในอำเภอนบพิตำ จังหวัดนครศรีธรรมราช
GENETIC DIVERSITY OF PARAH TREE (Elateriospermum tapos)
IN NOPPHITUM DISTRICT, NAKHON SI THAMMARAT PROVINCE

จุฑามาศ ศุภพันธ์^{1*}, วีระเกียรติ ทรัพย์มี² และ พัฒนพร รินทจักร³

¹คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช 80280

²คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ไซใหญ่ อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110

³อุทยานแห่งชาติเขานัน อ.ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช 80160

Juthamas Suppapan^{1*}, Verakiat Supmee² and Phatthanaporn Rinthajak³

¹Faculty of Education, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Mueang district, Nakhon Si Thammarat, 80280

²Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of technology Srivijaya, Sai Yai Campus,
Thungsong District, Nakhon Si Thammarat, 80110

³Khaonan National Park, Thasala district, Nakhon Si Thammarat, 80280

*E-mail: weddbeauty@yahoo.com

Received: 2019-10-24

Revised: 2021-04-30

Accepted: 2021-05-23

บทคัดย่อ

ต้นประ (Elateriospermum tapos) เป็นพรรณไม้ป่าและเป็นต้นไม้ที่พบมากในอำเภอนบพิตำ จังหวัดนครศรีธรรมราช ปัจจุบันต้นประมีจำนวนลดลงเนื่องจากการตัดไม้ทำลายป่า ดังนั้นจึงควรมีข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในการวางแผนการจัดการ การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ (1) เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นประ (2) เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของต้นประ และ (3) เพื่อวิเคราะห์ประวัติประชากรของต้นประในอำเภอนบพิตำ จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยเก็บตัวอย่างใบประจากป่าธรรมชาติ ได้แก่ ป่าธรรมชาติบ้านห้วยเลข ป่าธรรมชาติน้ำตกหินท้อ ป่าปลูกลำตอกหินท้อ ป่าปลูกลำตอกสนันหา นำมาสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน ribulose-bisphosphate carboxylase (rbcL) ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอและใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากต้นประในประเทศมาเลเซียและบรูไนจาก National Center for Biotechnology Information (GenBank) เพื่อทำการวิเคราะห์ร่วมกัน รวมทั้งหาค่า 121 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบแฮปโลไทป์ทั้งหมด 3 แฮปโลไทป์ โดยมีค่า haplotype diversity อยู่ในช่วง 0.000-0.667 และค่า nucleotide diversity อยู่ในช่วง 0.00000-0.00103 ผลการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรพบการแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็นสองกลุ่มคือกลุ่มประชากรต้นประในอำเภอนบพิตำและกลุ่มประชากรต้นประจากประเทศมาเลเซียและบรูไน ผลการศึกษาประวัติประชากรพบว่าประชากรต้นประในอำเภอนบพิตำไม่มีการขยายขนาดประชากร

คำสำคัญ : ต้นประ, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, นครศรีธรรมราช

ABSTARCT

The parah tree (*Elateriospermum tapos*) is a species of forest and tree found in the Noppitum district, Nakhon Si Thammarat Province. At present, the number of trees has decreased due to deforestation. Therefore, genetic information should be available for use in management planning. The objectives of this research were (1) to analyze the genetic diversity of the parah trees, (2) to analyze the population genetic structure of the parah trees, and (3) to analyze the demographic history of the parah trees in the Noppitum district, Nakhon Si Thammarat Province. Leave samples were collected from four localities in the Noppitum district (natural forest: Huay lek, Hin Tor Waterfall, planted forest: Hin Tor Waterfall, Sunantha Waterfall). DNA was extracted and nucleotide sequences were analyzed from gene ribulose-bisphosphate carboxylase (*rbcl*) in chloroplast DNA. To analyze data, nucleotide sequences of parah trees from Malaysia and Brunei in National Center for Biotechnology Information (GenBank) were used for analysis. The total nucleotide sequence was 121 sequences. The result showed 3 haplotypes. The haplotype diversity was in the range of 0.000-0.667 and the nucleotide diversity was in the range of 0.00000-0.00103. The result of the study of population genetic structure shows that dividing the population into two groups (Noppitum group and Malay-Brunei group). Results of the demographic history study found that the parah tree population in the Noppitum district has not expanded the population size.

Keywords: parah tree, genetic diversity, Nakhon Si Thammarat

บทนำ

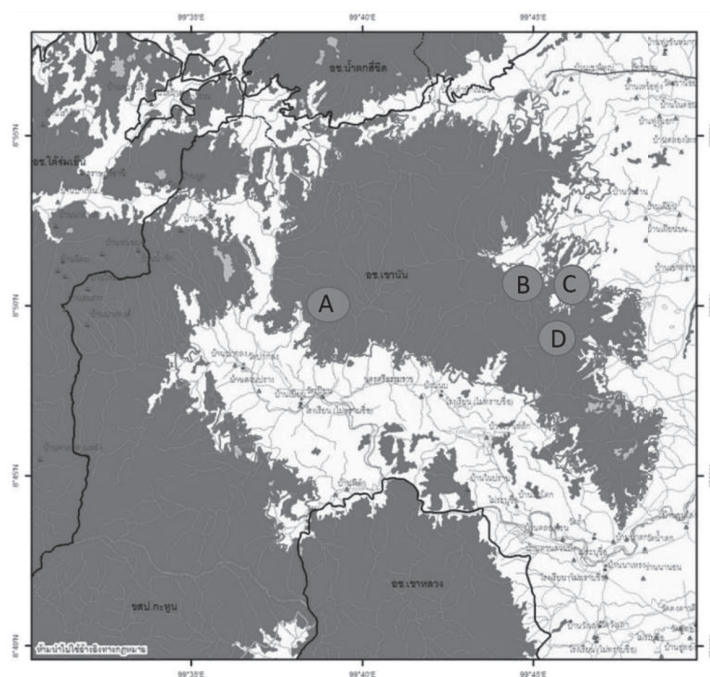
ต้นประ (*Elateriospermum tapos*) เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae จัดเป็นพืชชนิดเดียวในสกุล *Elateriospermum* ที่แพร่กระจายในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบมากในประเทศมาเลเซียและประเทศในแถบหมู่เกาะสุมาตรา(Jaroensutasinee, 2008) ในภาคใต้ของประเทศไทย มีพื้นที่ป่าประผืนใหญ่โดยมีเนื้อที่ป่าประมาณ 5,000 ไร่ ซึ่งอยู่ในอำเภอนบพิตำ จังหวัดนครศรีธรรมราช (Baimai & Tanthalekha, 2007) ต้นประสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง โดยเฉพาะลูกประสามารถนำมาปรุงเป็นอาหารได้หลายชนิดเช่น ลูกประดอง หรือลูกประทอด เป็นต้น จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของชุมชนในท้องถิ่นของอำเภอนบพิตำ จากการศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาของต้นประในอำเภอนบพิตำ พบว่าเคยมีการศึกษาเมื่อปี พ.ศ. 2551 โดยชุดโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (Biodiversity Research and Training Program-BRT) (Jaroensutasinee, 2008) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวมีการศึกษาเมื่อประมาณสิบปีที่ผ่านมา ปัจจุบันพบว่าต้นประในอำเภอนบพิตำ จังหวัดนครศรีธรรมราช มีจำนวนลดลงและหาได้ยาก เนื่องจากการบุกรุกป่าเพื่อการทำเกษตรกรรมซึ่งเสี่ยงต่อการหายไปในพื้นที่ จึงได้มีการอนุรักษ์โดยการนำต้นประจากแหล่งอื่นมาปลูกในพื้นที่ทำให้มีการผสมกับต้นพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นจึงควรมีข้อมูลทางพันธุกรรมของต้นประในอำเภอนบพิตำ เช่น ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ แต่พบว่าการศึกษา

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของต้นประที่มียีนปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (GenBank) เป็นข้อมูลของต้นประในประเทศมาเลเซีย และประเทศบรูไน ซึ่งไม่ปรากฏข้อมูลดังกล่าวของต้นประในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ (1) เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน ribulose-bisphosphate carboxylase (*rbcL*) ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของต้นประ (2) เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของต้นประ และ (3) เพื่อวิเคราะห์ประวัติประชากรของต้นประในอำเภอนบพิตำ ข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการจัดการวางแผนอนุรักษ์ต้นประในอำเภอนบพิตำ ในจังหวัดนครศรีธรรมราชได้

วิธีการ

1. ตัวอย่างต้นประ

เก็บตัวอย่างใบสดของต้นประจากบริเวณอุทยานแห่งชาติเขานัน โดยเก็บตัวอย่างใบสดของต้นประจากป่าธรรมชาติ ได้แก่ ป่าธรรมชาติบริเวณบ้านห้วยเลข ป่าธรรมชาติบริเวณน้ำตกหินท้อ ป่าปลูกบริเวณน้ำตกหินท้อ และป่าปลูกบริเวณน้ำตกสุนันทา รวมทั้งหมด 118 ต้น (รูปที่ 1) จากนั้นส่งตัวอย่างเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ



- A= ห้วยเลข (ป่าธรรมชาติ) 40 ต้น
- B= น้ำตกหินท้อ(ป่าธรรมชาติ) 40 ต้น
- C= น้ำตกหินท้อ(ป่าปลูก) 28 ต้น
- D= น้ำตกสุนันทา (ป่าปลูก) 10 ต้น

ภาพที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างต้นประในแต่ละพื้นที่ในอำเภอนบพิตำ

2. การสกัดดีเอ็นเอ

ตัดใบสดขนาด 1x1 มิลลิเมตร นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Kit ตามวิธีการที่บริษัทแนะนำ

3. การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *rbcl* ของต้นประ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank รหัส accession number AY794873.1 เป็นต้นแบบ ซึ่งได้ไพรเมอร์ดังนี้ ET_*rbcl*_F 5'-GGG CAC TAC TGC TAC AAA GT -3' และ ET_*rbcl*_R 5'- CCC CTC ATC TAA ACA TCT TCT -3'

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบในหลอดพีซีอาร์ซึ่งประกอบด้วย Water, nuclease- free 19.5 ไมโครลิตร, 2x Phire Plant Direct PCR Master Mix 25 ไมโครลิตร, forward primer 2 ไมโครลิตร และ reverse primer 2 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่อง PCR MS Major Science Major cycler เริ่มต้นการแยกสายดีเอ็นเอ (initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 5 วินาที ลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส 5 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิเพื่อต่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 20 วินาที รวมเป็น 40 รอบ และใช้อุณหภูมิสุดท้ายเพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที

5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN, BIOTECHCORP.) จากนั้นส่งดีเอ็นเอบริสุทธิ์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการ (1st Base Laboratory, Malaysia)

6. การจัดการข้อมูลและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

6.1 การจัดการข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งในการศึกษานี้มีการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลใน GenBank (Accession: AB267940.1, MF435456.1, AY794873.1) มาวิเคราะห์ร่วมด้วย จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเรียงลำดับ (alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalW version 2.0.12 (Larkin et al., 2007) แล้วตรวจสอบความถูกต้องด้วยสายตาอีกครั้ง

6.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้แก่ nucleotide diversity (π ; Nei, 1987), haplotype diversity (h ; Nei, 1987) และค่า polymorphic site ด้วยโปรแกรม DnaSP version 5 (Librado & Rozas, 2009)

6.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

สร้างต้นไม้วิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของต้น *Duchesnea indica* เป็น outgroup ใช้วิธี Neighbor-joining ตามโมเดลของ kimura -2-parameter โดยใช้ค่า bootstrap 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA version 4 (Tamura et al., 2007)

6.4 การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

วิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี analysis of molecular variance (AMOVA) เพื่อเปรียบเทียบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations

6.5 การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรด้วยวิธี pairwise F_{ST} ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010)

6.6 การวิเคราะห์ประวัติประชากร

6.6.1 ทดสอบ neutrality test

วิเคราะห์ค่า Tajima's D (Tajima, 1989) และ Fu's F_s (Fu, 1997) เพื่อทดสอบการเบี่ยงเบนของประชากรจาก neutral evolution ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010)

6.6.2 ทดสอบ mismatch distribution

วิเคราะห์ mismatch distribution เพื่อศึกษาการขยายขนาดของประชากรภายใต้สมมติฐาน sudden expansion model โดยใช้ค่าทดสอบ Harpending Raggedness index (Harpending, 1994) และ sum of squared deviations (SSD) เพื่อทดสอบ goodness-of-fit ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ที่นำมาวิเคราะห์มีลำดับเบส 647 คู่เบส มีตำแหน่ง align sites 647 ตำแหน่ง แบ่งเป็น monomorphic sites 645 ตำแหน่ง polymorphic sites 2 ตำแหน่ง มีแฮปโลไทป์ทั้งหมด 3 แฮปโลไทป์ ประกอบไปด้วยแฮปโลไทป์ที่เป็น shared haplotype จำนวน 2 แฮปโลไทป์โดยแบ่งเป็นแฮปโลไทป์ที่เป็น shared haplotype ระหว่างประชากร 2 แฮปโลไทป์ โดยแฮปโลไทป์ H01 เป็นแฮปโลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกแหล่งตัวอย่างในอำเภอนบพิตำ และแฮปโลไทป์ H02 เป็นแฮปโลไทป์ที่มีสมาชิกจากป่าธรรมชาติน้ำตกหินท้อ ป่าปลูกลำตอกสนันทา และจากกลุ่มประเทศมาเลเซียและบรูไน โดยแฮปโลไทป์ H03 เป็น rare haplotype ซึ่งมีสมาชิกมาจากกลุ่มประเทศมาเลเซียและบรูไน (ตารางที่ 2) สำหรับค่า haplotype diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.000-0.667 ส่วนค่า nucleotide diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.00000-0.00103 โดยค่า haplotype diversity ของประชากรทั้งหมดมีค่า 0.154 ± 0.016 และค่า nucleotide diversity ของประชากรทั้งหมดมีค่า 0.00003 ± 0.00003 สำหรับค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมได้แก่ จำนวนแฮปโลไทป์, จำนวน polymorphic sites, haplotype diversity (h) และ nucleotide diversity (π) แสดงในตารางที่ 1 จากผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าค่า haplotype diversity มีค่าสูงในขณะที่ค่า nucleotide diversity มีค่าต่ำในทุกกลุ่มประชากรเป็นการบ่งบอกว่าประชากรต้นประกาล้างเริ่มมีการสะสมรูปแบบการกลายพันธุ์มาเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่ผ่านมา (Avice et al., 1984; Rogers, 1992) ลักษณะรูปแบบดังกล่าวสามารถพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ต้น roundleaf chastetree (*Vitex rotundifolia*) (Sun et al., 2019), ต้น magnolia (*Michelia shiluensis*) (Deng et al., 2020) และต้น lacy tree fern (*Alsophila*

podophylla) (Su et al., 2005) เป็นต้น และจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการวิเคราะห์ พบตำแหน่ง polymorphic site เพียง 2 ตำแหน่ง ซึ่งแบ่งแฮปโลไทป์ออกเป็นจำนวน 3 แฮปโลไทป์ และเป็น rare haplotype เพียง 1 แฮปโลไทป์ ซึ่งเป็นแฮปโลไทป์จากกลุ่มประเทศมาเลเซียและบรูไน แสดงว่าต้นประในอำเภอนบพิตำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นประจากกลุ่มประเทศมาเลเซียและบรูไน (Tokuoka, 2007) ซึ่งสาเหตุที่กลุ่มต้นประในอำเภอนบพิตำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำอาจเป็นผลมาจากการถูกบุกรุกทำลายมาเป็นเวลานาน ซึ่งมีหลักฐานในพืชหลายชนิดที่เป็นพืชในกลุ่มใกล้เคียงพันธุ์และพบที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ เช่น ต้น China sunflower (*Leucomeris decora*) (Zhao & Gong, 2012) และ ต้น trunkless cycad (*Cycas simplicipinna*) (Feng et al., 2014) ดังนั้นจึงควรมีการจัดการในการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น การนำต้นประจากแหล่งอื่นที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าแต่ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับต้นพันธุ์ในพื้นที่นำมาปลูกทดแทนเพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม

ตารางที่ 1 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม

Collecting localities	N	No. polymorphic sites	No. haplotypes	Haplotype diversity (h) (mean±SD)	Nucleotide diversity (π) (mean±SD)
Huay lek (A)	40	0	1	0.000 ± 0.000	0.00000 ± 0.00000
Hin Tor (B)	40	1	2	0.010 ± 0.311	0.00002 ± 0.00001
Hin Tor (C)	28	0	1	0.000 ± 0.000	0.00000 ± 0.00000
Sunantha (D)	10	1	2	0.040 ± 0.231	0.00012 ± 0.00040
Malay-Brunei	3	1	2	0.667 ± 0.314	0.00103 ± 0.00048
Total	121	2	3	0.154 ± 0.016	0.00003 ± 0.00003

ตารางที่ 2 การกระจายของแฮปโลไทป์ในแต่ละพื้นที่เก็บตัวอย่าง

Haplotype	Huay lek (A)	Hin Tor (B)	Hin Tor (C)	Sunantha (D)	Malay-Brunei	Total
HAP 1	40	34	28	9	-	111
HAP 2	-	6	-	1	2	9
HAP 3	-	-	-	-	1	1
Total	40	40	28	10	3	121

2. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร พบว่ามีความแตกต่างของโครงสร้างทางพันธุกรรมเมื่อวิเคราะห์จากประชากรรวมทั้งหมด (single region) โดยมีค่า $\phi_{ST} = 0.39484$ ($p = 0.000$) ประชากรมีความแปรปรวนภายในกลุ่ม 60.52 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ผลการวิเคราะห์ค่า pairwise F_{ST} พบว่ามีความแตกต่างของกลุ่มประชากรระหว่างป่าธรรมชาติบ้านห้วยเลขกับป่าธรรมชาติน้ำตกหินท้อ, และมีความแตกต่างระหว่างจุดเก็บตัวอย่างในอำเภอนบพิตำทุกจุดกับกลุ่มต้นประจากประเทศมาเลเซียและบรูไน (ตารางที่ 4) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็นสองกลุ่ม (ภาพที่ 2) โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยต้นประจากกลุ่มต้นประในอำเภอนบพิตำ (HAP 1) ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยต้นประจากกลุ่มประเทศมาเลเซียและบรูไนรวมถึงกลุ่มต้นประบางส่วนจากป่าธรรมชาติน้ำตกหินท้อและป่าปลูกน้ำตกสุนันทา (HAP 2, HAP 3) (รูปที่ 2)

รูปแบบโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรบ่งบอกถึงความสามารถในการอยู่รอดที่สิ่งมีชีวิตสามารถปรับตัวให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่ นั้น ๆ โดยแสดงออกในรูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมกับกลุ่มประชากร โดยการเกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเกิดจากการที่มีการขัดขวางความสามารถในการส่งถ่ายยีนในกลุ่มประชากร เช่น การขัดขวางการเกิดการถ่ายยีนอันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น ปัจจัยทางสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์หรือระยะทางที่ห่างไกลซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่เพื่อสืบพันธุ์ (Ayala, 1982; Slatkin, 1987) ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมในการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลุ่มประชากรต้นประในภาคใต้กับกลุ่มประชากรต้นประในประเทศมาเลเซียและบรูไนมีความแตกต่างทางพันธุกรรมซึ่งน่าจะเกิดจากปัจจัยปัจจัยทางภูมิศาสตร์และระยะทางที่ห่างกันมีผลในการขัดขวางการแลกเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างประชากรทั้งสองพื้นที่ อีกทั้งผลจากการวิเคราะห์ pairwise F_{ST} พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างป่าธรรมชาติบ้านห้วยเลขและป่าธรรมชาติน้ำตกหินท้อ ซึ่งทั้งสองพื้นที่ถูกขวางกั้นด้วยสองฝั่งของภูเขาจึงน่าจะเป็นสาเหตุให้มีการขัดขวางการผสมพันธุ์ระหว่างประชากรและส่งผลให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมได้เช่นเดียวกัน ในประชากรพืชพบว่ามีหลายชนิดที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมเนื่องมาจากการขัดขวางการถ่ายยีนจากสภาพภูมิศาสตร์และระยะทางที่ห่างกัน เช่น swamp weeds (*Hygrophila pogonocalyx*) ที่อยู่ระหว่างฝั่งตะวันออกและฝั่งตะวันตกของประเทศไต้หวัน (Huang et al., 2005) ซึ่งถูกขวางกั้นด้วยแผ่นดินระหว่างสองฝั่งทะเล ต้น elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*) ในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทยที่ถูกขวางกั้นด้วยพื้นที่ราบสูงทางตอนกลางของประเทศ (Gao et al., 2017) และ ต้น parrot-flower (*Psittacanthus sonora*) ที่อยู่ในแผ่นดินใหญ่และบริเวณปลายแหลมแคลิฟอร์เนียประเทศสหรัฐอเมริกา (Ornelas et al., 2019) เป็นต้น

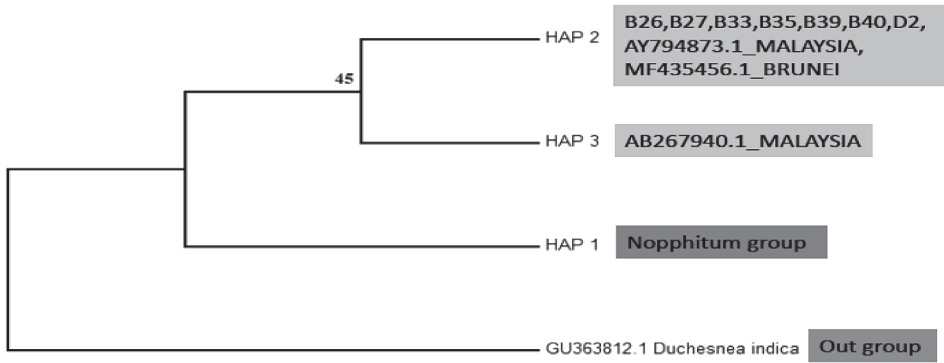
ตารางที่ 3 การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี Analysis of Molecular Variance (AMOVA)

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	p-value
Among populations	4	3.499	0.03750 Va	39.48	$\phi_{ST} = 0.39484^*$ (p=0.000)
Within populations	116	6.667	0.05747 Vb	60.52	
Total	120	10.165	0.09497		

*significant differentiation (p< 0.05)

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยวิธี pairwise F_{ST}

	Huay lek (A)	Hin Tor (B)	Hin Tor (C)	Sunantha (D)	Malay-Brunei
Huay lek (A)	-				
Hin Tor (B)	0.12821*	-			
Hin Tor (C)	0.00000	0.10332	-		
Sunantha (D)	0.16955	-0.05541	0.11672	-	
Malay-Brunei	0.97142*	0.73575*	0.95997*	0.75106*	-



ภาพที่ 2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

3. ประวัติประชากร

การศึกษาประวัติประชากรเป็นการศึกษาถึงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของ effective population size ในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการวิเคราะห์สามารถที่จะนำมาสร้างเป็นโมเดลของรูปแบบของการกลายพันธุ์เพื่อใช้คาดคะเนการเปลี่ยนแปลงที่ผ่านมาได้เช่น การตรวจสอบการขยายขนาดของประชากร โดยการศึกษาย้อนกลับด้วยวิธีการทาง coalescent เพื่อคาดคะเนประชากรก่อนและหลังการขยายตัว (Tajima, 1989 ; Rogers and Harpending, 1992) ซึ่งจากการวิเคราะห์ประวัติประชากรด้วยวิธีการทดสอบ 3 วิธี ในการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าประชากรต้นประในอำเภอหนองบัวไม่มีการขยายขนาดประชากร โดยวิธีที่ 1 การทดสอบการเบี่ยงเบนไปจาก neutral population พบว่าค่า D statistic มีค่า 0.000 ($p= 0.000$) และค่า F_s statistic มีค่า 0.000 ($p= 0.000$) ซึ่งจากผลการทดสอบ neutrality test ทั้งวิธี Tajima's D test และ Fu's F_s test มีค่าเท่ากับศูนย์ แสดงว่าประชากรไม่มีการเบี่ยงเบนไปจากสมดุล และไม่มีการขยายขนาดประชากรเพิ่มเติม (Yang, 2006) สำหรับค่า Fu's F_s ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงและนิยมใช้ในการตรวจสอบการขยายขนาดของประชากรที่เหมาะสมกับเครื่องหมายพันธุกรรมที่เป็น non-recombination genetic data (Ramirez-Soriano et al., 2008) มีค่าเท่ากับศูนย์ด้วยเช่นกัน จึงเป็นการยืนยันว่าประชากรต้นประในอำเภอหนองบัวอยู่ในสภาวะสมดุลทางพันธุกรรมและไม่มีการขยายขนาดประชากรเพิ่มเติม วิธีที่ 2 การทดสอบ mismatch distribution พบว่าไม่สอดคล้องกับ sudden expansion model โดยมีค่า SSD เท่ากับ 0.13788 ($p=0.100$) และค่า Harpending Raggedness index เท่ากับ 0.25028 ($p=0.100$) (ตารางที่ 5) ซึ่งสรุปได้ว่าประชากรต้นประไม่มีการขยายขนาดประชากร และวิธีที่ 3 การทดสอบค่าพารามิเตอร์เพื่อแสดงขนาดของประชากรก่อน (θ_0) และหลัง (θ_1) การขยายขนาดประชากร พบว่าค่า θ_1 มีค่ามากกว่าค่า θ_0 ในค่าของประชากรรวม, กลุ่มต้นประบางส่วนจากป่าธรรมชาติ น้ำตก หินท้อ และป่าปลูก น้ำตก สุนันทา เล็กน้อย (ตารางที่ 5) ซึ่งแสดงว่าประชากรต้นประมีการขยายขนาดประชากรเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ผลการศึกษาประวัติประชากรในครั้งนี้สอดคล้องกับรูปแบบประวัติประชากรพืชหลายชนิดที่อยู่ในสภาวะใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งพบว่าประชากรอยู่ในสภาวะสมดุลและไม่มีการขยายขนาดประชากรเพิ่มเติม ได้แก่ ต้น China sunflower (*Leucomeris decora*) ในประเทศจีน (Zhao & Gong, 2012) และ ต้น trunkless cycad (*Cycas simplicipinna*) ในประเทศจีนตอนใต้และในประเทศเมียนมาร์ (Feng et al., 2014) ดังนั้นในการจัดการอนุรักษ์พันธุ์ต้นประในพื้นที่อำเภอหนองบัว จังหวัดนครศรีธรรมราชจึงควรมีมาตรการในการฟื้นฟูและอนุรักษ์พันธุ์ต้นประอย่างเข้มข้นเพื่อให้มีแหล่งต้นพันธุ์เพิ่มมากขึ้นและคงความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากร

Collecting localities	Tajima's D	Fu's F_s	SSD^a	Rag^b	θ_0^c	θ_d^1
Huay lek (A)	0.000	0.000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Hin Tor (B)	0.000	0.039	0.26859	0.29586	0.90000	3.60000
Hin Tor (C)	0.000	0.000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Sunantha (D)	0.000	-0.339	0.33101	0.40000	0.90000	3.60000
Malay-Brunei	0.000	0.200	0.08981	0.55556	0.00000	99999.00000
Total	0.000	0.000	0.13788	0.25028	0.36000	20001.24000

สรุป

จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรต้นประในอำเภอนบพิตำพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และมีความแตกต่างของโครงสร้างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรต้นประในอำเภอนบพิตำกับประชากรต้นประในกลุ่มประเทศมาเลเซียและบรูไน และยังพบว่าประชากรต้นประในอำเภอนบพิตำไม่มีการขยายขนาดประชากรและอยู่ในสภาวะสมดุล

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้โครงการท้าทายไทย (ABC) ปีที่ 2 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

เอกสารอ้างอิง

- Awise, J.C., Neigel, J.E., & Arnold, J. (1984). Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, 20, 99-105.
- Ayala, F.J. (1982). *Population and Evolutionary Genetics: A Primer*. The Benjamin Cummings Pub. Co. Inc, California.
- Baimai, V., & Tanthalekha, R. (2007). *Khaonan-Pamek: Natural and Global Warming*. Bangkok: Bangkok Ltd. (in Thai)
- Deng, Y., Liu, T., Xie, Y., Wei, Y., Xie, Z., Shi, Y., & Deng, X. (2020). High genetic diversity and low differentiation in *Michelia shiluensis*, an endangered magnolia species in South China. *Forests*, 11, 469; DOI: 10.3390/f11040469.
- Excoffier, L., & Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.

- Feng, X., Wang, Y., & Gong, X. (2014). Genetic diversity, genetic structure and demographic history of *Cycas simplicipinna* (Cycadaceae) assessed by DNA sequences and SSR markers. **BMC Plant Biology**, **14**,187.
- Fu, F.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, **147**, 915–925.
- Gao, Y., Yin, S., Wu, L., Dai, D., Wang, H., Liu, C., & Tang, L. (2017). Genetic diversity and structure of wild and cultivated *Amorphophallus paeoniifolius* populations in southwestern China as revealed by RAD-seq. **Scientific Reports** **7**, 14183.
- Harpending, R.C. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Human Biology**, **66**, 591-600.
- Huang, J.C., Wang, W.K., Peng, C.I., & Chiang T. Y. (2005). Phylogeography and conservation genetics of *Hygrophila pogonocalyx* (Acanthaceae) based on atpB-rbcL noncoding spacer cpDNA. **Journal of plant research**, **118**, 1-11.
- Jaroensutasinee, M. (2008). **The impact of climatic factors on the appearance of parah tree** Retrieved from <http://www.thaienergynews.com> (in Thai), [2019, 20 September.]
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., & Higgins, D.G. (2007). Sequence analysis Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics Applications Note**, (21), 2947-2948.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, **25**, 1451-1452.
- Nei, M. (1987). **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press. Ramirez-Soriano A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J.F., & Navarro, A. (2008). Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. **Genetics**, **179**, 555-567.
- Rogers, A.R., & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, **9**, 552-569.
- Slatkin, M. (1987). Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, **39**(1), 53-65.
- Su, Y.J., Wang, T., Zheng, B., Jiang, Y., Ouyang, P.Y., & Chen, G.P. (2005). Genetic variation and phylogeographical patterns in *Alsophila podophylla* from Southern China based on cpDNA atpB-rbcL sequence data. **American Fern Journal**, **95**(2), 68-79.
- Sun, Y., Yang, H., Zhang, Q., Qin, L., Li, P., Lee, J., Chen, S., Rahman, K., Kang, T., & Jia, M. (2019). **Genetic diversity and its conservation implications of *Vitex rotundifolia* (Lamiaceae) populations in East Asia**. Retrieved from <http://doi.org/10.7717/peerj.6194>.

- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, **123**, 585–595.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, **24**, 1596–1599.
- Tokuoka, T. (2007). Molecular phylogenetic analysis of (*Euphorbiaceae sensu stricto*) based on plastid and nuclear DNA sequences and ovule and seed character evolution. **Journal of plant research**, **120**(4), 511-522.
- Wurdack, K.J., Hoffmann, P., & Chase, M.W. (2005). Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (*Euphorbiaceae sensu stricto*) using plastid RBCL and TRNL-F DNA sequences. **American journal of botany**, **92**(8), 1397-1420.
- Yang, Z. (2006). **Computational molecular evolution**. Oxford University Press, New York.
- Zhao, Y.J., & Gong, X. (2012). Genetic structure of the endangered *Leucomeris decora* (Asteraceae) in China inferred from chloroplast and nuclear DNA markers. **Conservation genetics**, **13**, 271–281
-