

ดีเอ็นเอในพลาสติกดีเอ็น *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ถูกประเมินความเหมาะสมของเพื่อใช้เป็นดีเอ็นบาร์โค้ดในการระบุชนิดพืช โดยทำการศึกษาในพืชสกุล *Alpinia* จำนวน 52 แทกซา (56 ตัวอย่าง) และ outgroup อีก 2 ตัวอย่าง (*Curcuma phaeocaulis* Val. และ *Zingiber officinale* Rosc.) จากการใช้ไพรเมอร์ตามวิธีมาตรฐานที่มีการเสนอไว้บนเว็บไซต์ของ Royal Botanic Gardens Kew (<http://www.kew.org/barcoding/update.html>) พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณดีเอ็น *matK* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ขนาดประมาณ 800 bp จำนวน 21 ตัวอย่าง แต่บริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer สามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ได้เพียง 15 ตัวอย่าง มีขนาดประมาณ 750 bp การเรียงเทียบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอทั้งสองบริเวณ พบว่ามีตัวอย่างที่เป็นชนิดเดียวกันแต่มีลำดับดีเอ็นเอบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ที่ต่างกัน ทำให้มีค่าความผันแปรภายในชนิดของดีเอ็นเอบริเวณนี้ เท่ากับ 0.394-6.307% ในขณะที่ดีเอ็น *matK* มีค่าความผันแปรภายในชนิดเท่ากับ 0 เนื่องจากตัวอย่างพืชชนิดเดียวกันมีลำดับดีเอ็นเอบริเวณนี้เหมือนกัน และยังพบว่าดีเอ็น *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer มีค่าความผันแปรระหว่างชนิดเท่ากับ 0-5.125% และ 0-11.826% ตามลำดับ เนื่องจากมีตัวอย่างบางชนิดที่มีลำดับดีเอ็นเอเหมือนกัน จึงทำให้ค่าความผันแปรระหว่างชนิดเริ่มต้นจากศูนย์ นอกจากนี้ยังพบมีตำแหน่งที่แสดงความผันแปรซึ่งสามารถใช้ระบุชนิดได้ โดยดีเอ็น *matK* ระบุชนิดพืชได้ 33 ชนิด มีความสำเร็จในการจำแนกชนิดได้ 86.206% และบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ระบุชนิดพืชได้ 11 ชนิด และมีความสำเร็จในการจำแนกชนิดได้ 88.888% ซึ่งค่า Similarity Coefficient ที่สามารถใช้จำแนกชนิดในพืชสกุล *Alpinia* ได้ของดีเอ็น *matK* และ บริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer อยู่ในช่วง 0.968-0.998 และ 0.937-0.998 ตามลำดับ การใช้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณดีเอ็น *trnK* จากฐานข้อมูล (GenBank) มาร่วมวิเคราะห์กับข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของดีเอ็น *matK* พบว่าสามารถแยกชนิด *A. foxworthyi* กับ *A. rosea* และ *A. flabellata* กับ *A. sibuyanensis* ออกจากกันได้เพิ่มเติมสำหรับบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ยังมีข้อมูลจากพืชสกุล *Alpinia* ในฐานข้อมูลไม่มากพอจึงไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ร่วมกับลำดับที่ได้จากงานวิจัยนี้ได้

ผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่าการใช้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่ง (*matK* หรือ *trnH-psbA* intergenic spacer) เพียงบริเวณเดียวไม่เพียงพอที่จะทำการจำแนกชนิดพืชได้ เนื่องจากแต่ละบริเวณมีข้อเด่นข้อด้อยแตกต่างกัน สำหรับพืชสกุล *Alpinia* พบว่าสามารถใช้ universal primer ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็น *matK* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ทำได้ยากกว่า ซึ่งอาจเกิดจากการมีความผันแปรของลำดับดีเอ็นเอมากกว่า ทำให้การพยายามเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณนี้ด้วยการใช้ universal primer เป็นเรื่องยากกว่า ดังนั้นเพื่อให้สามารถนำความผันแปรของดีเอ็นเอบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer มาใช้เป็น DNA barcode จึงควรมีการศึกษาหาบริเวณที่อนุรักษ์สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อไป ในเบื้องต้นดีเอ็นเอทั้งสองบริเวณนี้ สามารถจำแนกชนิดพืชได้ดีในระดับหนึ่ง แต่การเพิ่มตัวอย่างพืชให้มีจำนวนมากขึ้นในการศึกษาจะทำให้ได้ผลการประเมินดีเอ็นเอทั้งสองบริเวณนี้ที่เชื่อถือได้มากขึ้นเกี่ยวกับศักยภาพในการใช้เป็น DNA barcode

Two DNA regions in plastid genome: *matK* and *trnH-psbA* intergenic spacer were evaluated for their suitability to be used as DNA barcodes for identification of plants. We examined 52 taxa (56 samples) of plants from the genus *Alpinia* and two outgroups (*Curcuma phaeocaulis* Val. and *Zingiber officinale* Rosc.). Primers used for amplification of the regions via PCR followed the proposed protocol on the website of the Royal Botanic Gardens Kew (<http://www.kew.org/barcoding/update.html>). The obtained PCR products were 800 bp for *matK* gene and 750 bp for *trnH-psbA* intergenic spacer. Amplification of *matK* gene was successful in 21 taxa but in *trnH-psbA* intergenic spacer amplification, only DNAs from 18 taxa were amplified. Alignment of the sequences in each data set revealed that intraspecific variation of *trnH-psbA* intergenic spacer was 0.394-6.307%, whereas there was no intraspecific variation observed in *matK*. For interspecific variation *matK* and *trnH-psbA* intergenic spacer showed 0-5.125% and 0-11.826% variation, respectively. Since some species had identical sequences either of *matK* gene or *trnH-psbA* intergenic spacer, interspecific variation value started from zero. In addition, comparison of sequences exhibited specific sites that can be used to identify species for 33 species by *matK* and 11 species by *trnH-psbA* intergenic spacer. The success of using DNA sequence of *matK* gene and *trnH-psbA* intergenic spacer in classifying species were 86.200% and 88.880%, respectively. Similarity Coefficient values that could classify species were 0.968-0.998 for *matK* gene and 0.937-0.998 for *trnH-psbA* intergenic spacer. Inclusion of *trnK* sequences from GenBank database could additionally separate *A. foxworthyi* from *A. rosea* and *A. flabellata* from *A. sibuyanensis*. Because there was not enough *trnH-psbA* intergenic spacer sequences of genus *Alpinia* in GenBank similar work was not performed for *trnH-psbA* intergenic spacer region.

The results led to the conclusion that single loci (*matK* or *trnH-psbA* intergenic spacer) usage was not adequate for plant identification because each region had different advantages and disadvantages. For plants in the genus *Alpinia*, universal primers worked well in amplification of *matK* gene by PCR whereas it was more difficult for *trnH-psbA* intergenic spacer. The reason for this could be more sequence variation in *trnH-psbA* intergenic spacer that became problematic for PCR using universal primer. Therefore, to enable the use of variations in *trnH-psbA* intergenic spacer for DNA barcoding, there should be a study to search for conserved region for designing more suitable primers. Preliminary conclusion drawn from this research is that both DNA regions could be used well to identify plants to a certain level. Nonetheless, further study with more plant species included would volunteer more accurate evaluation about capability of these two regions to be used as DNA barcode.