



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชสวน)

ปริญญา

พืชสวน

พืชสวน

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ไพล โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี และสการ์

Identification of Molecular Markers for Phlai Breeding Using RAPD and SCAR

นามผู้วิจัย นางสาวภริตา ต้นสายเพชร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์เฉลิมมาลัย วงศ์ชาวจันทร์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ยิ่งยง ไพบูลย์ศานติวัฒนา, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณัฐ พิษกรรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ไพลโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและสการ์

Identification of Molecular Markers for Phlai Breeding Using RAPD and SCAR

โดย

นางสาวกริตา ต้นสายเพชร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชสวน)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภริตา ต้นสายเพชร 2556: การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ไพล โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและสการ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชสวน) สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ณอมมาลย์ วงศ์ชาวจันทร์, Ph.D. 64 หน้า

ตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะเจาะจงต่อไพล 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นไพลที่มีสาร terpinen-4-ol สูง ได้แก่ ไพลเหลือง (*Zingiber montanum* 'Lueng') และไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* 'Plooksave') และกลุ่มที่สองเป็นไพลที่มีสาร terpinen-4-ol ต่ำ ได้แก่ไพลดำ (*Zingiber ottensii*) โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี จากการทดลองหาความแตกต่างโดยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าไพรเมอร์ 16 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ OPC01, OPC18, OPQ02, OPQ05, OPR01, OPR02, OPR06, OPS02, OPX06, OPY07, OPY11, OPY14, OPZ11, OPZ15, OPZ16 และ OPZ18 จากไพรเมอร์ 46 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 21 แถบ ที่มีความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอในไพล ทั้ง 2 กลุ่ม และสามารถนำมาพัฒนาเป็น SCAR ไพรเมอร์ได้ 6 ไพรเมอร์ซึ่งให้ผลของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไพลแต่ละชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์ Y07_PY₁₁₂₅ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลเหลือง ไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅, Y11_PPS₆₂₆ และ Z16_PPS₇₃₀ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 721, 595 และ 654 คู่เบส ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลเหลืองและไพลปลุกเสก และไพรเมอร์ S02_PB₅₅₀ และ X06_PB₈₀₀ ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 465 และ 756 คู่เบส ตามลำดับ ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลดำ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพกับประชากรไพลทั้งหมด 20 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆในประเทศไทยพบว่ามีเพียง 2 ไพรเมอร์ที่ได้แก่ ไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅ และ X06_PB₈₀₀ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 721 คู่เบสที่จำเพาะกับไพล (*Zingiber montanum*) และ 756 คู่เบสที่จำเพาะเจาะจงกับไพลดำ (*Zingiber ottensii*) เท่านั้น อย่างไรก็ตามลำดับเบสที่ได้ อาจสอดคล้องกับตำแหน่งในจีโนมหรือยีนควบคุมกระบวนการสร้างสารสำคัญในไพล

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Parita Tonsaiphetch 2013: Identification of molecular markers for Phlai breeding using RAPD and SCAR. Master of Science (Horticulture), Major Field: Horticulture, Department of Horticulture. Thesis Advisor: Mrs. Sermal Wongchaochant, Ph.D. 64 pages.

Identification of specific molecular markers of 2 groups of Phlai. The first group contains high terpinen-4-ol content e.g. *Zingiber montanum* 'Lueng' and *Zingiber montanum* 'Plooksake'. The second group contains low content of terpinen-4-ol, e.g. *Zingiber ottensii*. Screening of 46 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) were conducted. The 16 primers, OPC01, OPC18, OPQ02, OPQ05, OPR01, OPR02, OPR06, OPS02, OPX06, OPY07, OPY11, OPY14, OPZ11, OPZ15, OPZ16 and OPZ18 revealed polymorphic band profiles. They produced 21 different bands from individual sample which showed polymorphisms between 2 groups of Phlai. These bands were developed to SCAR primers only 6 SCAR primers were generated and produced a specific band for each type of phlai. Y07_PY₁₁₂₅ primer produced specific band at 992 bp in *Zingiber montanum* 'Lueng'. R06_PY₈₇₅, Y11_PPS₆₂₆, and Z16_PPS₇₃₀ primers produced specific band at 721, 595 and 654 bp bands, respectively in both in *Zingiber montanum* 'Lueng' and *Zingiber montanum* 'Plooksake'. S02_PB₅₅₀ and X06_PB₈₀₀ primers produced specific band at 465 and 756 bp bands, respectively of *Zingiber ottensii*. R06_PY₈₇₅ and X06_PB₈₀₀ SCAR primers were tested with 20 Phlai populations from 6 locations in Thailand. The result showed that 721 bp band generated by R06_PY₈₇₅ primer was specified only in *Zingiber montanum* and 756 basepair generated by X06_PB₈₀₀ primer was specified only in *Zingiber ottensii*. However, there was data that may hit to chemical constituent producing gene or functional genes which specific to types of Phlai.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. เฉอมาลย์ วงศ์ชาวจันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร. ยิ่งยง ไพสุขสานติวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และช่วยเหลือในการเรียน และการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการให้คำปรึกษา ตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. วัฒนา เสถียร สวัสดิ์ ผู้ทรงคุณวุฒิซึ่งเป็นผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย และ อาจารย์ ดร. เบญญา มะโนชัย ประธานการสอบ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่ได้ให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในเรื่องการเรียน การทำการทดลอง และการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาจนสำเร็จการศึกษา รวมทั้งเจ้าของงานวิจัยที่ข้าพเจ้านำมาใช้อ้างอิงประกอบการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณพี่น้อง และเพื่อนๆ ที่ภาควิชาพันธุ์ศาสตร์และภาควิชาพืชสวนทุกคนสำหรับความช่วยเหลือ กำลังใจคำปรึกษาที่ดี และความเข้าใจที่มีให้กันเสมอมา

สุดท้ายข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ สำหรับความรัก ความเข้าใจ โอกาสทางการศึกษา และกำลังใจที่มีให้ข้าพเจ้าอย่างมากมายเสมอมา

ภริตา ต้นสายเพชร

เมษายน 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลและวิจารณ์	26
สรุป	49
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	50
ภาคผนวก	58
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	64

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดและแหล่งที่มาของตัวอย่างประชากรไพล	16
2	ส่วนประกอบของสารละลายพีซีอาร์ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร	18
3	ส่วนประกอบของสารละลายพีซีอาร์ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร	24
4	ชนิดของไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3') และขนาดของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับไพลเหลือง (<i>Zingiber montanum</i> 'Lueng') ไพลปลุกเสก (<i>Zingiber montanum</i> 'Plooksake') และไพลดำ (<i>Zingiber ottensii</i>)	33
5	เปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอจำนวน 23 แถบกับฐานข้อมูล NCBI	35
6	SCAR ไพรเมอร์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3') Forward primer และ Reverse primer และขนาดของแถบดีเอ็นเอ	40
ตารางผนวกที่		
1	ลำดับเบสของ random primer	61

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของ terpinen-4-ol และ (<i>E</i>)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)butadiene (DMPBD)	7
2	ลักษณะการแสดงออกของโคโลนีที่ใช้ในการคัดเลือกโดยวิธี blue-white selection	12
3	ลักษณะใบไพลทั้ง 2 กลุ่มที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ไพลเหลือง (<i>Zingiber montanum</i> 'Lueng') ไพลปลุกเสก (<i>Zingiber montanum</i> 'Plooksake') และ ไพลดำ (<i>Zingiber ottensii</i>)	15
4	จีโนมิกดีเอ็นเอของไพลเหลือง (<i>Zingiber montanum</i> 'Lueng') (1) ไพลปลุกเสก (<i>Zingiber montanum</i> 'Plooksake') (2) และ ไพลดำ (<i>Zingiber ottensii</i>) (3) และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas)(M)	26
5	ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของไพลเหลือง (<i>Zingiber montanum</i> 'Lueng') (1) ไพลปลุกเสก (<i>Zingiber montanum</i> 'Plooksake') (2) และ ไพลดำ (<i>Zingiber ottensii</i>) (3) จากการใช้ไพรเมอร์ OPC01 (A), OPC18 (B), OPQ02 (C), OPQ05 (D), และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)	29
6	ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของไพลเหลือง (<i>Zingiber montanum</i> 'Lueng') (1) ไพลปลุกเสก (<i>Zingiber montanum</i> 'Plooksake') (2) และ ไพลดำ (<i>Zingiber ottensii</i>) (3) จากการใช้ไพรเมอร์ OPR01 (A), OPR02 (B), OPR06 (C), OPS02 (D), และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)	30
7	ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของไพลเหลือง (<i>Zingiber montanum</i> 'Lueng') (1) ไพลปลุกเสก (<i>Zingiber montanum</i> 'Plooksake') (2) และ ไพลดำ (<i>Zingiber ottensii</i>) (3) จากการใช้ไพรเมอร์ OPX06 (A), OPY07 (B), OPY11 (C), OPY14 (D), และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)	31

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	<p>ภาพถ่ายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของไพลเหลือง (<i>Zingiber montanum</i> ‘Lueng’) (1) ไพลปลูกเสก (<i>Zingiber montanum</i> ‘Plooksake’) (2) และไพลดำ (<i>Zingiber ottensii</i>) (3) จากการใช้ไพรเมอร์ OPZ11 (A), OPZ15 (B), OPZ16 (C), OPZ18 (D), และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)</p>	32
9	<p>ภาพถ่ายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SCAR ของไพลเหลือง (<i>Zingiber montanum</i> ‘Lueng’) (1) ไพลปลูกเสก (<i>Zingiber montanum</i> ‘Plooksake’) (2) และไพลดำ (<i>Zingiber ottensii</i>) (3) จากการใช้ SCAR ไพรเมอร์ Y07_PY₁₁₂₅ ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลเหลืองและไพลปลูกเสก และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)</p>	42
10	<p>ภาพถ่ายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SCAR ของไพลเหลือง (<i>Zingiber montanum</i> ‘Lueng’) (1) ไพลปลูกเสก (<i>Zingiber montanum</i> ‘Plooksake’) (2) และไพลดำ (<i>Zingiber ottensii</i>) (3) จากการใช้ SCAR ไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅ (A), Y11_PPS₇₄₀ (B), Z16_PPS₇₃₀ (C) ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลเหลืองเท่านั้นและ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)</p>	43
11	<p>ภาพถ่ายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SCAR ของไพลเหลือง (<i>Zingiber montanum</i> ‘Lueng’) (1) ไพลปลูกเสก (<i>Zingiber montanum</i> ‘Plooksake’) (2) และไพลดำ (<i>Zingiber ottensii</i>) (3) จากการใช้ SCAR ไพรเมอร์ S02_PB₅₅₀ (A) และ X06_PB₈₀₀ (B) ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลดำเท่านั้นและ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)</p>	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	<p>ภาพถ่ายพิมพ์ดีเอ็นเอของการทดสอบสการ์ไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅ กับประชากรไพลทั้งหมด 20 ตัวอย่างจาก 6 แหล่งในประเทศไทย โดยตัวอย่างเรียงตามลำดับดังตารางที่ 1 และ gene ruler 100 bp DNA ladder (Fermentas) (M)</p>	46
13	<p>ภาพถ่ายพิมพ์ดีเอ็นเอของการทดสอบสการ์ไพรเมอร์ X06_PB₈₀₀ กับประชากรไพลทั้งหมด 20 ตัวอย่างจาก 6 แหล่งในประเทศไทย โดยตัวอย่างเรียงตามลำดับดังตารางที่ 1 และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)</p>	46
ภาพผนวกที่		
1	<p>จีโนมิกดีเอ็นเอของประชากรไพลทั้งหมด 20 ตัวอย่างจาก 6 แหล่งในประเทศไทย โดยตัวอย่างเรียงตามลำดับดังตารางที่ 1 และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)</p>	63

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	base pair
CH ₃ COOK	=	potassium acetate
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
NaOH	=	sodium hydroxide
PVP	=	polyvinyl pyrrolidone
RNase	=	ribonuclease
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
TBE	=	Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer solution

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ไพล โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและสการ์

Identification of Molecular Markers for Phlai Breeding Using RAPD and SCAR

คำนำ

มนุษย์ได้ใช้ประโยชน์จากสมุนไพรซึ่งเป็นผลผลิตจากธรรมชาติในการบำบัดรักษาอาการของโรคและบำรุงสุขภาพมาเป็นเวลานานนับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน สมุนไพรไทยหลากหลายชนิดมีศักยภาพในการเป็นยาหรือการรักษาโรคเบื้องต้น จนในปัจจุบันได้ถูกพัฒนาเพื่อการผลิตในเชิงการพาณิชย์ ไพลจัดว่าเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่รู้จักกันมานานและมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่อง ในสมัยโบราณชาวบ้านนิยมปลูกกันตามบ้านเรือน เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของยาไทยแผนโบราณ เนื่องจากน้ำมันระเหยมีสรรพคุณทางยามากมายทั้งด้านการบำรุงผิวและการรักษาโรค ซึ่งพบได้ทุกส่วนของพืช โดยส่วนของเหง้ามีปริมาณมากที่สุด (สุรพล, 2543) ในน้ำมันหอมระเหยประกอบไปด้วยสารที่สำคัญ คือ terpinen-4-ol และ (*E*)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) ซึ่งสามารถช่วยลดอาการอักเสบ ปวดเมื่อย และสมานแผลยับยั้งเชื้อโรค ในปัจจุบันการแพทย์แผนไทยได้นำไพลมาทำลูกประคบเพื่อรักษาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อและคลายเส้น นอกจากนี้องค์การเภสัชกรรมได้นำไพลมาผลิตครีมรักษาอาการอักเสบและปวดเมื่อยออกจำหน่าย ดังนั้นปริมาณความต้องการในการใช้ประโยชน์จากไพลจึงมีมากขึ้น ส่งผลให้ความต้องการวัตถุดิบที่จะนำไปใช้เพิ่มขึ้นตามไปด้วย แต่ขณะนี้การปลูกโดยทั่วไปเป็นการปลูกแบบดั้งเดิมหรือปลูกเป็นพืชแซม ไม่มีการปลูกเชิงพาณิชย์อย่างจริงจัง ทำให้ผลผลิตที่ได้ออกมาจึงไม่เหมาะต่อการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์และเชิงพาณิชย์ เนื่องจากวัตถุดิบไม่ได้มาตรฐานทั้งคุณภาพและปริมาณสารสำคัญที่ไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นจึงเป็นปัญหาสำคัญที่ต้องพัฒนาสายพันธุ์ไพลให้มีคุณภาพที่ดีตรงตามความต้องการของตลาด

การจำแนกชนิดของไพลด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา สามารถทำได้โดยดูจากลักษณะทางกายภาพ และการผลิตสารสำคัญ (secondary metabolite) แต่การจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพเป็นหลักหรือลักษณะทางพีโนไทป์ของพืชนั้น อาจมีความแปรผันไปตามอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ทำให้ยากต่อการจำแนกได้อย่างชัดเจน และนำไปสู่ปัญหาในการจำแนกชนิดและ

พัฒนาสายพันธุ์เพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์ ปัจจุบันจึงมีแนวคิดที่ใช้เทคนิคในการวิเคราะห์ระดับ โมเลกุล มาใช้ประโยชน์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ การขยายพันธุ์ และอนุรักษ์พันธุ์ไพล โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ที่สามารถใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของ สิ่งมีชีวิตในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ ที่นำมาใช้ในการตรวจสอบและจำแนกชนิดของไพลตั้งแต่ระยะ ต้นอ่อน และสามารถใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารสำคัญ ในไพล เป็นต้น เพื่อเป็นแนวทางที่จะทำให้ได้ข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือและเชื่อมโยงไปถึง ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดหรือการเกิดการกลายพันธุ์ได้อีกด้วย

ในงานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์ในการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถใช้ในการจำแนก ชนิดของไพล 3 ชนิดและเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะเจาะจงกับยีนที่ควบคุมการสร้างปริมาณสาร ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญต่างๆ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดหนึ่ง และเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว ไซปริมาณดี เอ็นเอน้อย โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มากนัก ผลจากการศึกษาครั้งนี้ นับได้ว่าเป็น ข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพ สำหรับการ ระบุชนิดของไพลและการตรวจหาไพลที่มีปริมาณสารสำคัญสูง เพื่อสนับสนุนงานวิจัยและขยาย องค์ความรู้ในด้านการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์ไพลให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น อีกทั้งยังเป็น ข้อมูลพื้นฐานที่ช่วยลดระยะเวลาและทรัพยากรที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

ตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ไฟล 3 สายพันธุ์และ
จำเพาะเจาะจงกับปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในไฟลแต่ละชนิด



การตรวจเอกสาร

ไพลเป็นพืชในวงศ์ขิง Zingiberaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr. มีชื่อพ้องว่า *Zingiber cassumunar* Roxb. และ *Zingiber purpureum* Roscoe มีชื่อท้องถิ่นว่า ปูลอย ปูเลย (ภาคเหนือ) ว่านไฟ (ภาคกลาง) มันสะล่าง (เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน) (รุ่งรัตน์, 2540; วันดี, 2538) มีชื่ออังกฤษ คือ Thai Ginger, Bengal Ginger, Cassunar Ginger, Cassumunar (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2546) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดีย อินโดนีเซีย และแพร่กระจายไปทั่วภูมิภาคเอเชีย (เรวดี, 2539)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไพลเป็นไม้หัวล้มลุกที่มีอายุหลายฤดู (perennial herb) ลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดิน (rhizome) มีการเจริญเติบโตในแนวระนาบทางด้านข้าง (sympodial) แตกแขนงทอดเรียงขนานไปกับพื้น มีลำต้นเหนือดินเกิดจากกาบใบโอบล้อมซ้อนกันเป็นลำต้นเทียม (pseudostem) มีสีเขียวแทงขึ้นมาจากดินสูงประมาณ 0.7-1.5 เมตร ขนาดของเหง้าจะมีขนาดแตกต่างกันไปตามชนิด เปลือกนอกสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในลักษณะสีเหลืองอมเขียว มีเซลล์น้ำมันหอมระเหยกระจายอยู่ทั่วไปในทุกลำต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนของเหง้ามีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด ส่วนของใบเกิดจากเหง้าหรือลำต้นใต้ดิน ลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ มีลักษณะเรียวยาว กว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 5-7 เซนติเมตร เนื้อในบางและปลายแหลม โคนใบแผ่เป็นกาบหุ้มลำต้น ดอกเป็นช่อทรงพุ่มกลมแทงจากเหง้าใต้ดินโดยตรง ก้านช่อดอกยาวได้ถึง 17 เซนติเมตร ตัวช่อดอกยาว 7-9 เซนติเมตร ส่วนดอกมีกลีบดอกสีเหลืองนวลที่ถูกหุ้มด้วยใบประดับย่อยสีม่วง ผลมีลักษณะกลมและแห้ง (สมภพ, 2543) ไพลมีจำนวนโครโมโซม 11 คู่ ($2n=22$) (Triboun, 2006) ใช้เหง้าในการขยายพันธุ์โดยสามารถปลูกลงในดินเหนียวปนทรายที่มีอินทรีย์วัตถุสูง มีการระบายน้ำที่ดี ที่มีอากาศร้อนชื้น (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และคณะ, 2537) การเก็บเกี่ยวจะเก็บเกี่ยวเหง้าช่วงเดือนมกราคม - มีนาคม หลังจากปลูกไปแล้วประมาณ 8 เดือน และไม่ควรเก็บเหง้าไพลขณะที่เริ่มแตกหน่อใหม่ เพราะจะทำให้ได้น้ำมันไพลที่มีปริมาณและคุณภาพต่ำ

การศึกษาความหลากหลายชนิดของพืชวงศ์ขิงในประเทศไทยได้มีการศึกษากันมาอย่างต่อเนื่องโดยนักพฤกษศาสตร์ทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศ ทำให้ได้ทราบข้อมูลความหลากหลาย

และอนุกรมวิธานของพรรณพืชวงศ์ขิง Theilade and Maersk-Moller (1991) ได้รายงานเบื้องต้นพืชสกุลขิงที่พบในประเทศไทยจำนวน 33 ชนิด ซึ่งตัวอย่างที่พบเช่น *Zingiber montanum* (Koenig) Theilade (ไพล), *Zingiber ottensii* Val. (ไพลดำ), *Zingiber spectabile* Griff. (จะเงาะ), *Zingiber wrayi* Ridl. (ปลูดหวาน), *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. (กระทือ) วิเชียร (2545) อธิบายถึงความแตกต่างของไพล โดยการจำแนกจากลักษณะทางสัณฐาน กายวิภาค สรีรวิทยาและการเจริญเติบโต โดยแบ่งได้เป็น ไพลเหลือง (*Zingiber montanum* 'Leung') ไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* 'Plooksake') และไพลดำ (*Zingiber ottensii*) พบว่าไพลทั้ง 3 ชนิดมีการเจริญเติบโตโดยทั่วไปและลักษณะทางสัณฐานของใบเหมือนกันกล่าวคือ ใบเป็นใบเดี่ยว เส้นใบขนาน (parallel venation) ใบรูปหอก (lanceolate) ปลายใบแหลม (acute) โคนรูปปลี (cuneate) ขอบใบเรียบ (entire) ใบคล้ายกระดาษ (chartaceous) ใบเรียงสลับระนาบเดียว (distichous) ผิวใบเรียบเกลี้ยงไม่มีสิ่งปกคลุม (glabrous)

ไพลปลุกเสกมีแถบสีขาวที่ใบ การจัดเรียงใบหรือการกางใบของไพลแตกต่างกันโดยไพลเหลืองมีการกางใบมากที่สุดขนานกับพื้น ตามด้วยไพลปลุกเสกและไพลดำ สีของใบไพลเหลือง ไพลปลุกเสกและไพลดำ มีสีเหลืองเขียว (yellow green group, 144A), สีเหลืองเขียว (yellow green group, 144C) และสีเขียว (green group, 137A) ตามลำดับ ส่วนลักษณะอื่นๆของใบพบว่า ไพลดำมีผิวเป็นมันและหนากว่าไพลอื่นๆ (วิเชียร, 2545)

ลำต้นของไพลที่อยู่เหนือดินเป็นลำต้นเทียม (pseudostem) มีสีแตกต่างกันดังนี้ ไพลเหลือง มีสีเหลืองเขียว (yellow-green 144A) ไพลปลุกเสกมีสีเขียว (green, 144C) และไพลดำมีสีเขียว (green, 144C) เนื้อของเหง้า (rhizome) ของไพลเหลืองมีสีเหลืองส้ม (yellow-orange, 17B) ไพลปลุกเสกมีสีเหลืองส้ม (yellow-orange, 16B) และไพลดำมีสีม่วง (violet-blue, 9D) (วิเชียร, 2545)

ลักษณะของดอกไพลทั้ง 3 ชนิดเป็นแบบ bilabiate ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ สีของดอกไพลเหลืองเป็นสีขาว (white, 155B) ไพลปลุกเสกมีสีขาว (white, 155B) และไพลดำมีสีเหลือง (yellow, 3C) ช่อดอกเป็นแบบ Vriesia spike กลีบประดับ (bract) ไพลเหลืองมีสีม่วงแดง (red purple, 40A) ไพลปลุกเสกมีสีม่วง (grayed-purple, 187B) และไพลดำมีสีแดง (red, 40A) (วิเชียร, 2545)

จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานในส่วนของรูปร่างใบ ลำต้น และดอกพบว่า ไพลเหลืองและไพลปลูกเสกเป็นไพลชนิดเดียวกัน แต่จากลักษณะที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัดของไพลทั้ง 2 ชนิด คือแถบสีขาวที่ใบซึ่งพบเฉพาะในไพลปลูกเสก จึงคาดว่าไพลปลูกเสกอาจกลายพันธุ์มาจากไพลเหลือง

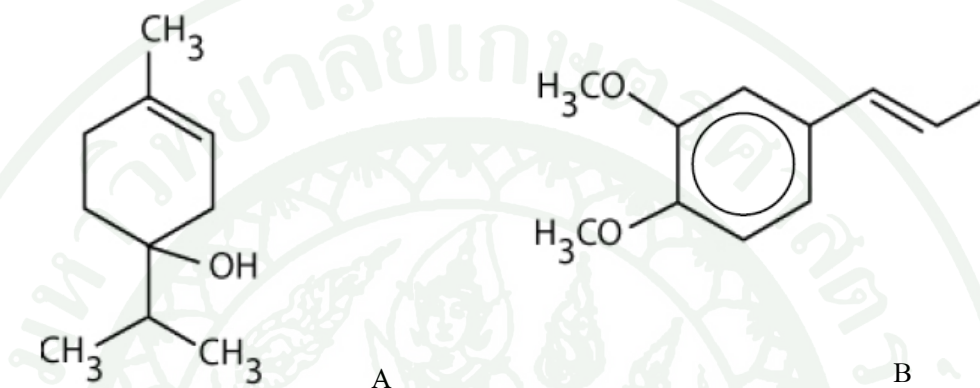
น้ำมันหอมระเหยของไพล

น้ำมันหอมระเหย คือ สารประกอบอินทรีย์ที่มีกลิ่นหอม ระเหยง่าย เป็นของเหลวใสไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อน และเป็นสารพฤษเคมีชนิดหนึ่งที่พืชสร้างขึ้น จากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) และสร้างขึ้นบนอวัยวะพิเศษ โดยพบในเซลล์น้ำมัน (oil cells) ของพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ซึ่งจะเก็บสะสมไว้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ดอก ตา ใบ กลีบเลี้ยง ผล เมล็ด เนื้อเปลือกไม้ ลำต้น ราก และเหง้า เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยที่พืชสร้างขึ้นมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อต้านพืชเพื่อป้องกันพืชจากแมลง แบคทีเรีย เชื้อรา และพืชชนิดอื่น มีส่วนช่วยดึงดูดผึ้งหรือแมลงในการผสมเกสรดอกไม้ มีความเกี่ยวข้องของกับกระบวนการสื่อสารทำหน้าที่เป็น biological messenger ทั้งยังช่วยสมานแผลในเนื้อเยื่อพืช และเป็นแหล่งพลังงานสำรอง นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันพืชจากการสูญเสียน้ำเนื่องจากสภาพอากาศร้อนและแห้งแล้ง (ชวลิต, 2541)

สารสำคัญที่พบในเหง้าไพล

องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมันไพลคือ sabinene, γ -terpinene, α -terpinene, terpinen-4-ol และ DMPBD ไพลมีองค์ประกอบทางเคมีหลักคือกลุ่มเทอร์ปีนส์ (terpenes) และอนุพันธ์ สารส่วนใหญ่ที่พบเป็นกลุ่มโมโนเทอร์ปีนส์ (monoterpenes) ที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลัก โดยสารที่พบมากที่สุดคือ terpinen-4-ol (ภาพที่ 1A) และกลุ่มฟีนิล โพรพิเนนส์ (phenylpropenes) และอนุพันธ์ เช่น (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) (ภาพที่ 1B) ซึ่งมีฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) ฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่ (ศศิธร, 2532) ฤทธิ์แก้อาการแพ้ (anti-allergic) (Tewtrakul and Subhadhirasakul, 2007) ฤทธิ์ในการไล่แมลง ฤทธิ์ลดอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดข้อ ด้านการอักเสบ แก้คลื่นไส้ขม และมียุทธิต้านอนุมูลอิสระ (นิยดา และคณะ, 2522; Jeenapongsa *et al.*, 2003) เมื่อศึกษาเชิงคุณภาพของไพลเป็นการหาปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในเหง้าไพล ศึกษาปริมาณสาร 2 ชนิด คือ terpinen-4-ol และ (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) (ภาพที่ 1) พบว่าปริมาณสาร terpinen-4-ol ในไพล

เหลืองและไพลปลุกเสกไม่แตกต่างกันคือมี 24.3 เปอร์เซ็นต์ และ 23.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าไพลดำ (16.79 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วนสาร DMPBD พบว่าไพลดำมีปริมาณสาร DMPBD 0.46 เปอร์เซ็นต์ สำหรับไพลเหลืองและไพลปลุกเสกไม่มีสาร DMPBD หรือมีในปริมาณที่น้อยมากจนเครื่องมือไม่สามารถตรวจหาค่าได้ (วิเชียร, 2545)



ภาพที่ 1 สูตร โครงสร้างของ terpinen-4-ol (A) และ (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)butadiene (DMPBD) (B)

แต่อย่างไรก็ตาม น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ ซึ่งชวลิต (2541) กล่าวว่า เมื่อทำการตรวจสอบจะพบว่าปริมาณและคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยสามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้ ชนิดของพืช ลักษณะทางพันธุกรรม สิ่งแวดล้อมในการเจริญเติบโต ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ระยะเวลาที่พืชได้รับแสง กระแสลม เป็นต้น ระยะการเจริญเติบโตของพืช เช่น อายุ และฤดูกาลเก็บเกี่ยว ส่วนของพืชที่ใช้ ลักษณะของพืชวัตถุดิบ เช่น เป็นพืชสดหรือแห้ง วิธีการสกัด หรือวิธีการเก็บรักษา เป็นต้น

การใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต หรือบ่งชี้ลักษณะที่แตกต่างบางประการระหว่างสิ่งมีชีวิต จำเป็นต้องมีสิ่งที่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างดังกล่าวซึ่งก็คือ เครื่องหมาย (markers) เครื่องหมายที่ดีต้องมีความผันแปรทาง

พันธุกรรมสูง สามารถตรวจสอบและติดตามได้ง่ายในทุกชั่วรุ่น (สุรินทร์, 2552; อมรา, 2542; Grechko, 2002; Kumar, 1999)

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) หรือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) เป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอทั้งส่วนที่เป็นยีนและไม่ใช่นยีน สามารถตรวจสอบได้ทั่วทั้งจีโนมโดยไม่มีอิทธิพลจากปฏิกริยามาเกี่ยวข้อง เครื่องหมายดีเอ็นเอยังจำแนกออกได้เป็น 2 แบบ คือ

1. Hybridization-based DNA markers เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในยุคแรก ๆ โดยจะตรวจสอบโดยวิธีการไฮบริไดเซชัน (hybridization) กล่าวคือ นำ genomic DNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดดีเอ็นเอในกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) จากนั้นย้ายดีเอ็นเอไปยังแผ่นเมมเบรน แล้วนำไปไฮบริไดซ์กับโพรบซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ มักออกแบบมาจากส่วนของยีนที่คิดค้นไว้ การตรวจสอบผลจะตรวจสอบบนแผ่นฟลอม หากดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมีความคล้ายคลึงกับโพรบก็จะปรากฏสัญญาณบนแผ่นฟลอม เราอาจเรียกการตรวจสอบแบบนี้ว่า RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) วิธีการนี้เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมาก สามารถระบุความแตกต่างระหว่างจีโนมไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัสและโฮโมไซกัสได้ แต่ค่อนข้างใช้แรงงานและค่าใช้จ่ายมากและยังมีอันตรายจากการใช้สารกัมมันตรังสีด้วย อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

2. PCR-based DNA markers ในปีค.ศ. 1985 Kary Mullis ได้คิดค้นปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) ขึ้นซึ่งเป็นปฏิกริยาที่เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในส่วนที่ต้องการได้หลายเท่าตัวในระยะสั้น ๆ โดยเป็นเทคนิคที่เลียนแบบปฏิกริยาการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase โดยมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นต้นแบบ ซึ่งสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยาพีซีอาร์ นั้นจะอาศัยหลักการคล้ายกัน คือ มีดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นสายต้นแบบ เอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนอุณหภูมิสูง (*Taq* DNA polymerase) ซึ่งได้มาจากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (dATP dGTP dCTP และ dTTP) และดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับบริเวณส่วนปลายของส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณเพื่อเข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองดีเอ็นเอเรียกว่าไพรเมอร์ (primer) อยู่ในหลอดทดลอง การทำ PCR จะทำโดยสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ใส่ในหลอดทดลองร่วมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ *Taq* DNA polymerase และ Deoxyribonucleoside triphosphate

ทั้ง 4 ชนิด ใช้ความร้อนเพื่อให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturing) แล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่มีลำดับเบสคู่สม (annealing) เป็นจุดเริ่มการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จากนั้นจึงปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เพื่อเริ่มต้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ ทำให้ได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น โดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะปล่อยให้ปฏิกิริยาคำเนินไปหลายรอบทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากในเวลาอันรวดเร็ว โดยประกอบด้วยปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ

1. การทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบเสียสภาพแยกออกเป็นสายเดี่ยว (denaturation)
2. การลดอุณหภูมิลงให้พอเหมาะเพื่อให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจับกับไพรเมอร์ (annealing)
3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (extension)

หลังจากปฏิกิริยาพีซีอาร์เสร็จสมบูรณ์ดีเอ็นเอเป้าหมายจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น 2^n โดย n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ปฏิกิริยาพีซีอาร์นี้มีบทบาททางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลเป็นอย่างมาก และทำให้เกิดการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ตรวจสอบจีโนมของสิ่งมีชีวิตหลากหลายรูปแบบ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้สามารถเป็นได้ทั้งแบบสุ่มและแบบจำเพาะขึ้นอยู่กับชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้และวิธีการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันออกไป (สุรินทร์, 2545) ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้พีซีอาร์ เช่น

เทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA: RAPD)

อาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่อาศัยหลักการของพีซีอาร์ชนิดหนึ่ง พัฒนาขึ้นโดย William *et al.* (1990) อาร์เอพีดีอาจมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไปอีก เช่น Arbitrary-Primed PCR (AP-PCR), DNA Amplification Fingerprint (DAF) หรือเราอาจเรียกเทคนิคเหล่านี้โดยรวมๆ ว่า Multiple Arbitrary Amplicon Profiling (MAAP) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นการใช้ไพรเมอร์อย่างสุ่มเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเป้าหมายที่จำเพาะแต่ไม่ทราบบริเวณในจีโนม โดยแต่ละเทคนิคก็จะมีขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้ ความเข้มงวดในปฏิกิริยาและวิธีการตรวจสอบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันออกไป เทคนิค AP-PCR จะใช้ไพรเมอร์ขนาด 18-24 นิวคลีโอไทด์ ส่วน DAF จะใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นๆ เพียง 5-8 นิวคลีโอไทด์และใช้สัดส่วนของไพรเมอร์ต่อดีเอ็นเอต้นแบบสูงกว่าวิธีการอื่น การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของเทคนิค DAF จะตรวจสอบโดยใช้เจ

ลพอลิอะคริลาไมด์ (Kumar, 1999) สำหรับอาร์เอฟดีจะใช้ไพรเมอร์ขนาด 9-10 นิวคลีโอไทด์ที่มีองค์ประกอบของเบส GC ก่อนข้างสูงคือประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์จะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบอย่างสุ่ม กล่าวคือมีการสุ่มหาลำดับเบสเป้าหมายที่กระจายอยู่ทั่วจีโนม โดยการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับลำดับเบสเป้าหมายมี 2 กรณีคือจับกันได้ทั้งหมดและจับได้บางส่วน เมื่อมีการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับบริเวณเป้าหมายแล้วจะมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นได้เป็นผลิตภัณฑ์ซีอาร์ นำไปตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งจะปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใดๆ สามารถนำมาเปรียบเทียบเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างๆ (ปรีชา, 2543) การเกิดแถบดีเอ็นเอหลายแถบนั้นเป็นผลจากการที่ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ 2 บริเวณที่ไม่ไกลกันมากนัก โดยจับกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางที่หันปลาย 3' เข้าหากันก็สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงบริเวณดังกล่าวได้ แต่ถ้าไพรเมอร์หันไปในทิศทางอื่นก็จะไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคอาร์เอฟดีอาจเกิดจากบริเวณที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบอาจมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับได้จึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ หรืออาจเกิดจากระยะห่างระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองอาจมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสทำให้แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลักษณะนี้จะตรวจสอบได้ยาก ทั้งนี้ระยะห่างระหว่างไพรเมอร์ที่มากเกินไปก็อาจไม่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ (สุรินทร์, 2552)

อาร์เอฟดีมีข้อที่ได้เปรียบเครื่องหมายโมเลกุลอื่น ๆ คือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อยกว่าเทคนิคอื่น สามารถให้ข้อมูลมากพอสมควร และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ได้ศึกษามากนัก อาร์เอฟดีจะให้ข้อมูลพื้นฐานได้ในระดับหนึ่ง แต่อาร์เอฟดีก็มีข้อด้อยอยู่ เนื่องจากการสุ่มเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทั้งจีโนมและอาร์เอฟดีเป็นเทคนิคที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะต่าง ๆ มาก บางครั้งจึงทำซ้ำไม่ได้ผลเหมือนเดิม (Penner *et al.*, 1993) นอกจากนี้อาร์เอฟดียังเป็นเครื่องหมายชนิด dominant marker ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจะเป็นลักษณะการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอเท่านั้นทำให้ไม่สามารถแยกลักษณะฮอโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสออกจากกันได้ (สุรินทร์, 2552; William *et al.*, 1990)

ถึงแม้ปัจจุบันจะมีเครื่องหมายดีเอ็นเอใหม่ๆ ที่มีความจำเพาะเจาะจงและให้ข้อมูลที่ดีกว่า และอาร์เอฟดีก็ยังมีข้อด้อยที่สำคัญดังที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่อาร์เอฟดีก็ยังเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยังใช้กันอย่างแพร่หลาย การใช้ประโยชน์จากเทคนิคอาร์เอฟดี นอกจากจะใช้ศึกษาเกี่ยวกับการ

จำแนกชนิด การตรวจหาหรือบ่งชี้สายพันธุ์ (Liu *et al.*, 2008) การทำแผนที่ยีน การติดตามหรือตำแหน่งยีน (Jourden *et al.*, 1996) บอกความหลากหลายทางพันธุกรรม (Bua in และ Paisooksantivatana, 2009) ซึ่งมีประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์ในการตัดสินใจเลือกคู่ผสม (คัดเลือกพ่อแม่) หรือทดสอบเพื่อต้องการลักษณะที่แสดง heterosis สูง (William *et al.*, 1990)

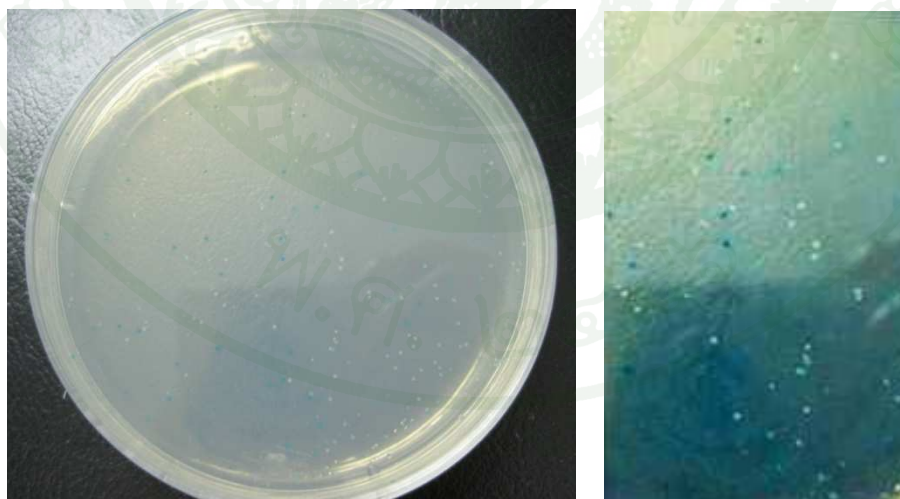
SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)

เป็นเทคนิคที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ประยุกต์จากเทคนิคอาร์เอพีดีหรือเอเอฟแอลพี (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism) โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ไปโคลน (clone) และหาลำดับเบสที่มีความแตกต่าง เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งหนึ่งในจีโนมพืชสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวโดยเทคนิคพีซีอาร์ จึงสามารถระบุลักษณะที่สนใจได้ อีกทั้งเทคนิคนี้มีความแม่นยำ คงที่ สม่ำเสมอ และตรวจสอบได้เมื่อทำการทดลองซ้ำ และสามารถนำเทคนิค SCAR มาใช้ในการเชื่อมโยงกับตำแหน่งยีนเช่น โรคราน้ำค้างในแตงกวา (Paran and Michelmore, 1993) ยีน *Mi* ที่ต้านทาน nematode ในมะเขือเทศ (Williamson *et al.*, 1994) การใช้บ่งชี้เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ (มนัสวี และคณะ, 2552) ยีน *Ph-3* ที่ต้านทานเชื้อรา *Phytophthora infestans* (Truong *et al.*, 2012) เป็นต้น หรือการทำแผนที่ยีนหรือจีโนม เช่น โรคราแป้งในข้าวบาร์เลย์ และการทำเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection) (Mohan *et al.*, 1997) เป็นต้น

การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจเพื่อนำไปศึกษาหน้าที่ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือถ่ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นเข้าสู่สิ่งมีชีวิต โดยจะเริ่มจากการเตรียมดีเอ็นเอที่ต้องการซึ่งได้จากการสกัดแยกดีเอ็นเอทั้งหมดจากสิ่งมีชีวิต (genomic DNA) หรือสังเคราะห์จาก mRNA (cDNA) แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ (vector) ได้เป็นดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) แล้วนำไปถ่ายเข้าเซลล์ผู้รับ (host) ซึ่งได้จากการเตรียมเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ให้อยู่ในลักษณะ competent cell มักทำในแบคทีเรียเนื่องจากเลี้ยงง่ายและเจริญเติบโตเร็ว (Sambrook *et al.*, 2001) จากนั้นทำการทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้เกิดช่องว่างขึ้นชั่วคราวบนเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) จึงทำให้พลาสมิดสามารถเข้าสู่เซลล์ได้อย่างรวดเร็ว โดยการอาศัย

ความร้อน (heat shock) ทำให้ผนังเซลล์เปิดออกเพื่อให้ดีเอ็นเอสามารถเข้าไปในเซลล์ได้ และทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเพื่อให้ผนังเซลล์ปิด แล้วนำแบคทีเรียที่ได้ไป spread plate บนอาหารแข็ง Luria Bertani Agar ที่เติม Ampicillin เพื่อทำการคัดเลือกโดยวิธี blue white selection (ภาพที่ 2) โดยเลือกเฉพาะ โคลนสีขาวซึ่งคาดว่าเป็นแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด เนื่องจากเมื่อเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ได้รับพลาสมิดเข้าไปทำให้มีการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ และปรากฏลักษณะที่ต่างไปจากเดิม คือถ้าพลาสมิดมีส่วนของยีนแลคซี (*lacZ*) ซึ่งกำหนดการสังเคราะห์เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) ตำแหน่งที่ใช้ในการสอดใส่ดีเอ็นเอที่สนใจอยู่ในยีนนี้ เมื่อมีการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้าไปภายในยีนจะทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้ ดังนั้นเมื่อนำพลาสมิดมาถ่ายโอนเข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* แล้วเลี้ยงในอาหารที่ใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและสารเหนี่ยวนำทำให้มีการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสพร้อมกับสาร X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นหรือซับสเตรทของเอนไซม์ชนิดนี้ลงไปด้วย เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเท่านั้นที่จะสามารถเจริญเติบโตได้ แบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมจะไม่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ทำให้ X-gal ไม่ถูกย่อยโคโลนีจึงมีสีขาว แต่แบคทีเรีย *E. coli* ที่ไม่มีดีเอ็นเอลูกผสมจะยังคงมีความสามารถในการย่อย X-gal โดยเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส โคลนจึงเป็นสีฟ้า (ภาพที่ 2) (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)



ภาพที่ 2 ลักษณะการแสดงผลของโคลนที่ใช้ในการคัดเลือกโดยวิธี blue-white selection

อย่างไรก็ดีการตรวจสอบเครื่องหมายในระดับโมเลกุลอาร์เอพีดี มีบทบาทในงานหลายๆ ด้าน เช่น การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ การตรวจสอบลูกผสมในงานปรับปรุงพันธุ์ รวมถึง การตรวจหาลักษณะที่ต้องการ โดยใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกลักษณะที่มีลักษณะตามต้องการ แล้วสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดหรือสายพันธุ์จากแถบดีเอ็นเอจำนวนมากที่ได้ จะมีแถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะชนิดหรือสายพันธุ์นั้นๆ ซึ่งสามารถนำวิเคราะห์ลำดับเบส และนำลำดับเบส ที่ได้ไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่จำเพาะต่อแถบดีเอ็นเอที่เรียกว่า SCAR ดังนั้น จึงสามารถพัฒนา RAPD marker ให้เป็น SCAR marker ที่มีความจำเพาะสูงและสามารถทำซ้ำได้ดี ซึ่งมีผู้รายงานความสำเร็จการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจหาเครื่องหมายที่มีความจำเพาะเจาะจง กับพืชต่าง ๆ ในพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่นเดียวกับงานวิจัยที่พัฒนา SCAR marker เพื่อใช้ในการ แยกความแตกต่างของต้นชิงเฮาสองชนิด คือ *Artemisia princeps* และ *Artemisia argyi* ออกจาก ชิงเฮาชนิดอื่นๆ พบว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 254 คู่เบสมีประสิทธิภาพที่สามารถใช้แยก *Artemisia princeps* และ *Artemisia argyi* ออกจาก *Artemisia* ชิงเฮาชนิดอื่นๆ ได้ (Mi et al., 2006) การศึกษา การจำแนก *Atractylodes japonica* และ *Atractylodes macrocephala* ซึ่งเป็นสมุนไพรจีนที่มีลักษณะ ที่คล้ายคลึงกันแต่สารสำคัญในพืชนั้นๆ มีความแตกต่างกัน โดยใช้ RAPD and SCAR markers พบว่า SCAR ไพรเมอร์ AjR1 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับ *Atractylodes japonica* ที่ขนาด 1,117 คู่เบส และไพรเมอร์ AmR1 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ *Atractylodes macrocephala* ที่ขนาด 1,325 คู่เบส จาก 18 ไพรเมอร์ที่พัฒนาจากเทคนิคอาร์เอพีดี (Huh และ Bang, 2006) การศึกษาการพัฒนา SCAR ไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus*) ทั้ง 3 ชนิดเพื่อจำแนก สมุนไพรชนิดนี้ โดยใช้ SCAR marker พบแถบดีเอ็นเอขนาด 408, 501 และ 319 คู่เบสที่ได้จาก เทคนิคอาร์เอพีดีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus debilis* และ *Phyllanthus urinaria* ตามลำดับ แสดงว่าเทคนิคนี้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ที่มีความใกล้เคียงกันได้ (Piyada และคณะ, 2008) การพัฒนา SCAR marker จากเทคนิคอาร์เอพีดี และ multiplex-PCR เพื่อจำแนกชนิดสมุนไพร 3 ชนิด *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum*, and *Polygonum multiflorum* (Fallopia multiflorum) พบว่ามี 6 SCAR primer ที่ สามารถพัฒนาจากเทคนิคอาร์เอพีดี คือ SCAR primer HC18-2, HC20-4, และ HA13-5 ได้แสดง แถบดีเอ็นเอขนาด 407 คู่เบสให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับ *Cynanchum wilfordii* และ *Cynanchum auriculatum* แถบดีเอ็นเอขนาด 340 คู่เบสให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับ *Polygonum multiflorum* และ แถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับ *Cynanchum auriculatum* (Byeong et al., 2010) การจำแนกชนิดของผักบุ้งริ้ว (*Ipomoea mauritiana*

Jacq.) ด้วยเทคนิค RAPD และ SCAR marker พบว่า SCAR primer IM1F และ IM1R ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 323 คู่เบส ที่จำเพาะเจาะจงกับ *Ipomoea mauritiana* เท่านั้น (Kambiranda *et al.*, 2010) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SCAR เพื่อใช้จำแนกโสมเกาหลี (*Panax ginseng* C. A. Meyer) โดยเฉพาะพันธุ์ปลูกช้วนอน (Sunwon) ในระยะการจัดการเมล็ดพันธุ์และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือก (Lee *et al.*, 2011) การตรวจหาสายพันธุ์ดีเอ็นเอต้นโกษฐ กานพลู (*Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth.) และ *Lagotis cashmiriana* ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้องและการควบคุมคุณภาพสมุนไพร (Hussain และ Bedi, 2012) และในการศึกษา RAPD-SCAR เพื่อตรวจสอบชนิดของสมุนไพรจีน โกฎเขมา (*Atractylodes lancea*) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ *Atractylodes* 5 ชนิดด้วยอาร์เอพีดี พบว่ามี *Atractylodes lancea* และ *Atractylodes chinensis* มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากกว่าชนิดอื่น และที่ขนาดแถบดีเอ็นเอ 1,800 คู่เบสสามารถใช้แยกโกฎเขมา (*Atractylodes lancea*) ออกจากทั้ง 4 ชนิดได้ (Sun *et al.*, 2012) หรือสามารถนำมาใช้เชื่อมโยงกับลักษณะที่ต้องการเช่นเดียวกับงานวิจัยของในปี ค.ศ.2004 Xu และคณะ ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะเจาะจงกับพืชของต้นโด้วตั้ง (*Eucommia ulmoides* Oliv.) ซึ่งเป็นพืชที่พบในประเทศจีนโดยใช้เทคนิค RAPD พบแถบดีเอ็นเอขนาด 569 คู่เบสจากไพรเมอร์ OPF-08 ที่จำเพาะเจาะจงต่อ *Eucommia ulmoides* Oliv. เพศเมีย เรียกแถบดีเอ็นเอนี้ว่า MSDE ต่อมาได้มีการพัฒนา SCAR marker จากข้อมูลลำดับเบสของ MSDE จากการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค SCAR และ Southern hybridization พบว่าเครื่องหมายนี้สามารถใช้ตรวจสอบพืชของต้นโด้วตั้ง (*Eucommia ulmoides* Oliv.) ได้ตั้งแต่ เป็นต้นอ่อนซึ่งช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบได้เป็นอย่างดี

ปัจจุบันเทคโนโลยีดีเอ็นเอมีบทบาทสำคัญในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ทั้งนี้เนื่องมาจากประสิทธิภาพในการระบุถึงลักษณะสำคัญ ทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์พืชที่มีลักษณะที่ต้องการได้อย่างแม่นยำ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลจึงเปรียบเสมือนเครื่องมืออย่างหนึ่งของกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ จึงมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตลอดจนมีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในหลายด้านอย่างกว้างขวาง เช่น การจำแนกสายพันธุ์ หรือ ความบริสุทธิ์ของพันธุ์พืช การบอกความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช การสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม การหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจและการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือก เป็นต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุพันธุ์พืช : ต้นไพลเหลือง ไพลปลุกเสกและไพลดำ
2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ (DNA isolation)
3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทำพีซีอาร์
4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD
5. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเตรียมเซลล์คอมพิเทนต์ (competent cell) เชื่อมเวกเตอร์เข้ากับดีเอ็นเอ และทรานสฟอร์มเมชัน (transformation)

1. รวบรวมไพล 2 กลุ่ม

กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีสาร terpinen-4-ol สูง ได้แก่ ไพลเหลือง (*Zingiber montanum* ‘Lueng’) และไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* ‘Plooksake’) กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่มีสาร terpinen-4-ol ต่ำ ได้แก่ ไพลดำ (*Zingiber ottensii*) ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้มาจากจังหวัดราชบุรี มาใช้ทดสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (ภาพที่ 3) และตัวอย่างประชากรไพลที่นำมาทดสอบด้วยเทคนิคสการ์ (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 3 ลักษณะใบไพลทั้ง 2 กลุ่มที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ ไพลเหลือง (*Zingiber montanum* ‘Lueng’) (A) ไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* ‘Plooksake’) (B) และไพลดำ (*Zingiber ottensii*) (C)

ตารางที่ 1 ชนิดและแหล่งที่มาของตัวอย่างประชากรไพล (เสาวลักษณ์, 2552)

ลำดับ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ภาค	แหล่งที่มา (อำเภอ/จังหวัด)
1	<i>Z. montanum</i>	ตะวันออกเฉียงเหนือ	หัวตะพาน/อำนาจเจริญ
2	<i>Z. montanum</i>	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เมือง/อำนาจเจริญ
3	<i>Z. montanum</i>	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสนางคนิคม/อำนาจเจริญ
4	<i>Z. montanum</i>	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ปากช่อง/นครราชสีมา
5	<i>Z. montanum</i>	ตะวันออกเฉียงเหนือ	นิคมคำสร้อย/มุกดาหาร
6	<i>Z. montanum</i>	ตะวันออกเฉียงเหนือ	นิคมคำสร้อย/มุกดาหาร
7	<i>Z. montanum</i>	กลาง	เมือง/ชัยนาท
8	<i>Z. montanum</i>	เหนือ	เชียงดาว/เชียงใหม่
9	<i>Z. montanum</i>	เหนือ	เมือง/แม่ฮ่องสอน
10	<i>Z. montanum</i>	ตะวันออก	สระแก้ว
11	<i>Z. montanum</i>	ใต้	จะนะ/สงขลา
12	<i>Z. montanum</i>	ใต้	นาทวี/สงขลา
13	<i>Z. montanum</i>	ใต้	กาญจนดิษฐ์/สุราษฎร์ธานี
14	<i>Z. montanum</i>	ใต้	พนม/สุราษฎร์ธานี
15	<i>Z. montanum</i>	ใต้	ยะรัง/ปัตตานี
16	<i>Z. montanum</i>	ใต้	นาทวี/สงขลา
17	<i>Z. montanum</i>	ใต้	จะนะ/สงขลา
18	<i>Z. montanum</i>	ใต้	บางกล่ำ/สงขลา
19	<i>Z. ottensii</i>	ตะวันตก	ศรีสวัสดิ์/กาญจนบุรี
20	<i>Zingiber sp.</i>	ตะวันตก	แม่สอด/ตาก

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการที่ปรับปรุงมาจากวิธีการของ Molecular Biology Laboratory Protocols (2002) โดยเตรียมสารละลายของ 4X CTAB (CTAB 4 เปอร์เซ็นต์, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, PVP 4 กรัม) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และ beta-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปอ่อน (ใบแรกนับจากยอด) อายุประมาณ 2 เดือนที่ปลูกในสภาพเปิด (ภาพที่ 3) มาประมาณ 2 กรัมบดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วตัดใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุสารละลายอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยพลิก microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรทุก 10 นาที เติมสารละลาย chloroform : isoamyl (24:1) 5 มิลลิลิตร พลิก microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรไปมาให้สารละลายเข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที คูณสารละลายส่วนบน 500 ไมโครลิตร มาใส่ลงใน microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตรใหม่ เติมสารละลาย chloroform : isoamyl (24:1) 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที คูณสารละลายส่วนบน 500 ไมโครลิตร มาใส่ลงใน microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตรแล้วเติม isopropanol 500 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นนำไปล้างตะกอนด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และเอธิลแอลกอฮอล์ 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปล่อยให้ตะกอนแห้ง หลังจากนั้นเติม TE buffer และเติม RNase A (TE buffer 100 ไมโครลิตร ต่อ RNase A 1.5 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงและเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

หลังจากสกัดดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการวัดการดูดกลืนคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตรและตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยการใส่เจล agarose ที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

3. การวิเคราะห์คุณภาพและความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสง(absorbance) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ถ้าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.6 - 1.8 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ หากมีค่าต่ำกว่า 1.6 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอลปนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอ แต่ถ้าค่าสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอในสารละลายดีเอ็นเอ

4. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

4.1 การเตรียมสารละลายพีซีอาร์

ใช้ random primer ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ (Operon Technologies, USA) จำนวน 46 ชนิด (ภาคผนวกตารางที่ 1) มาคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยมีสารละลายต่างๆในปฏิริยาดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารละลายพีซีอาร์ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร

สารที่ใช้ในปฏิริยา	ปริมาตร (μl)
จีโนมิกดีเอ็นเอ 50 ng/μl	0.5
อาร์เอพีดีไพรเมอร์ (100 mM)	2.0
10X PCR buffer	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	4.0
dNTP mix (10 mM)	2.0
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.3
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	13.7
ปริมาตรรวม	25.0

4.2 การตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ (Thermo cycler)

ตั้งกระดาษดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องพีซีอาร์รุ่น C1000 (BIORAD) ตั้งโปรแกรมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} จำนวน 35 รอบ
Annealing อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	

4.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

เพื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอและทำการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับลักษณะต่างๆของไฟล ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจล agarose ที่มีความเข้มข้น 1.8 เปอร์เซ็นต์ ใน Tris-Borate-EDTA buffer (TBE) ความเข้มข้น 0.5 เท่า โดยใช้กระแสไฟระดับ 90 โวลต์ให้สม่ำเสมอเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide; EtBr) แล้วตรวจดูดีเอ็นเอด้วย UV light box ถ่ายรูป และบันทึกผล โดยแต่ละไพรเมอร์จะทำซ้ำสามครั้ง

5. การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัด QIA quick gel extraction kit (QIAGEN)

5.1 ใช้มีดตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ นำมาใส่หลอดเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม QG buffer ลงไป 3 เท่าของปริมาตรเจล (โดยเทียบน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม เติม QG buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยพลิกหลอดเป็นระยะทุกๆ 2-3 นาที เพื่อให้เจลละลาย เมื่อเจลละลายหมดจึงเติมไอโซโพรพานอล ให้มีปริมาตรเป็น 1 เท่าของน้ำหนักเจล แล้วผสมให้เข้ากัน

5.2 คูดสารละลายใส่หลอดเพื่อแยกดีเอ็นเอออกจากสารละลาย มีหลอดเซนตริฟิวจอยู่ด้านล่าง และมีหลอดขนาดเล็กที่มีแผ่นเมมเบรนอยู่ด้านบน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หมุนเหวี่ยงซ้ำด้วยความเร็วเท่าเดิม 1 นาทีเพื่อให้

สารละลายไม่ค้ำอยู่บนแผ่นเมมเบรน หลังจากนั้นย้ายหลอดขนาดเล็กที่มีดีเอ็นเอติดบนแผ่นเมมเบรนมาใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจะถูกชะลงมาด้านล่าง แล้วนำไปตรวจ สอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

6. การโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ

6.1 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (competent cell)

เกลี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ให้ได้โคโลนีเดี่ยว บนอาหารแข็งสูตร Luria Bertani agar (LB) (ภาคผนวก 1) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นปลูกเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารสูตร LB ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เขย่า 250 รอบต่อนาทีที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำมา 500 ไมโครลิตร ปลูกเชื้อลงในอาหาร LB และเลี้ยงต่อ นาน 3-4 ชั่วโมง หรือเมื่อค่า OD = 0.4 - 0.6 จากนั้นย้ายเชื้อใส่หลอด 50 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็ง นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นละลายเซลล์ด้วยสารละลาย TSS ที่เย็นจัด 10 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็ง นาน 5 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย TSS 0.5-1 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็ง 5 นาที แบ่งเชื้อ 100 ไมโครลิตร (ต่อการถ่ายยีน 1 ตัวอย่าง) ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ที่แช่น้ำแข็ง แล้วแช่หลอดในไนโตรเจนเหลวก่อนนำไปเก็บรักษาที่ -70 องศาเซลเซียส

6.2 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์

นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยเชื่อม (ligation) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับเวกเตอร์ pGEM[®]-T easy (Promega, USA) ด้วยอาศัยเอนไซม์ ligase เติม pGEM[®]-T ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10X ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ T₄ DNA ligase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

6.3 การนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเข้าสู่ *E.coli* (transformation) โดยวิธี heat shock

นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เชื่อมกับเวกเตอร์ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเซลล์คอมพีเทนต์จากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 45 นาที แล้วให้ความร้อนทันที (heat shock) โดยนำไปจุ่มลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และนำไปแช่ลงในน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB broth (ภาคผนวก 2) 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเกลี่ย x-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ IPTG (Isopropyl thio- β -D-galactoside) ความเข้มข้น 0.2 กรัมในน้ำ 1 มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ 1 ชั่วโมงมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูอาหารด้านบน ออก เหลือไว้ประมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมส่วนที่เหลือกับตะกอนให้เข้ากัน แล้วเกลี่ยลงบนอาหารที่เตรียมไว้ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตรวจสอบโคโลนีของแบคทีเรียสีขาว และสีฟ้าที่เจริญบนอาหาร เลือกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก 1) ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin แล้วเกลี่ยด้วย x-gal ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 0.2 กรัมในน้ำ 1 มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก 2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะ ampicillin 5 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที 16 ชั่วโมง

7. การสกัดพลาสมิด (plasmid isolation)

7.1 นำเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย Alkaline lysis I (ภาคผนวก 3) 100 ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากัน จนกระทั่งไม่มีตะกอนเซลล์เหลือติดอยู่ที่ก้นหลอด

7.2 เติมสารละลาย Alkaline lysis II (ภาคผนวก 4) 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ จนสารละลายใส หลังจากนั้นนำมาแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วเติมสารละลาย Alkaline lysis III (ภาคผนวก 5) 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา แล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที จะเห็นตะกอนสีขาวของแบคทีเรียกระจายอยู่ในสารละลาย นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อแยกชั้นของสารละลายดูสารละลายใสด้านบนซึ่งมีดีเอ็นเออยู่ใล้นหลอดใหม่

7.3 เติมเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ที่แช่เย็นจัดปริมาณ 2 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เพื่อล้างพลาสติกอีกครั้ง เทส่วนสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วตากตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนใน TE buffer และ RNase A เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

7.4 ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (Digestion)

7.4.1 ตรวจสอบพลาสมิดด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำพลาสมิดปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร ใล้นหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม PCR buffer (100mM Tris-HCl pH 8.0 และ 500mM KCl) ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร 10mM dNTP ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 25mM MgCl₂ ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร และ *Taq* DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร แล้วจึงเติมไพรเมอร์ forward และ reverse อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปตั้งเครื่องดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องพีซีอาร์รุ่น C1000 (BIORAD) ตั้งโปรแกรมพีซีอาร์ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที (สำหรับการ denaturation), 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที (สำหรับการ annealing), 72 องศาเซลเซียส 1 นาที (สำหรับการ primer extension) รวมทั้งหมด 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยการใส่เจล agarose ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

7.4.2 ตรวจสอบพลาสมิดด้วยการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดปริมาณ 3 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ มาเติมบัฟเฟอร์สำหรับเอ็นไซม์ *EcoRI* ปริมาตร 1 ไมโครลิตรและเอ็นไซม์ *EcoRI* ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำมาตรวจสอบหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยการใส่เจล agarose ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

8. การวิเคราะห์ลำดับเบส

ทำการยืนยันผลโดยการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ หลังจากได้ลำดับเบสแล้ว จึงนำมาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสกับดีเอ็นเออื่นๆ ในฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST เป็นโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์สายดีเอ็นเอหรือโปรตีนที่กำลังศึกษาว่ามีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับยีนหรือโปรตีนชนิดใดบ้างในฐานข้อมูล

9. การออกแบบไพรเมอร์

นำลำดับเบสชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่คัดเลือกมาวิเคราะห์หาตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับออกแบบสการ์ไพรเมอร์ (SCAR primer) ที่ลำดับเบสมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของไพล โดยใช้โปรแกรม nucleotidecalculator และ fastpcr

10. ทดสอบประสิทธิภาพของสการ์ไพรเมอร์ (SCAR primer)

ทดลองใช้สการ์ไพรเมอร์ที่ออกแบบกับประชากรไพลจำนวน 20 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) เพื่อดูประสิทธิภาพของไพรเมอร์ว่าสามารถใช้จำแนกหรือบ่งชี้ลักษณะตามที่ต้องการได้ถูกต้องแม่นยำหรือไม่ ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยมีสารละลายต่างๆ ในปฏิกิริยาดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของสารละลายพีซีอาร์ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (μl)
จิโนมิกดีเอ็นเอ 50 ng/μl	0.5
สการ์ไพรมอร์ (100 mM)	2.0
10X PCR buffer	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	4.0
dNTP mix (10 mM)	2.0
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.3
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	13.7
ปริมาตรรวม	25.0

10.1 การตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ (Thermo cycler)

ตั้งเครื่องพีซีอาร์ด้วยเครื่องพีซีอาร์รุ่น C1000 (BIORAD) ตั้งโปรแกรมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} จำนวน 35 รอบ
Annealing อุณหภูมิ ~50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	

ตรวจสอบผลพีซีอาร์ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเจล agarose ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน Tris-Borate-EDTA buffer (TBE) ความเข้มข้น 0.5 เท่า โดยใช้กระแสไฟระดับ 90 โวลต์ให้ส้อมเสมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide; EtBr) แล้วตรวจดูดีเอ็นเอด้วย UV light box ถ่ายรูป และบันทึกผล

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

1. สถานที่ทำการวิจัย

1. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี
2. ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ
3. ห้องปฏิบัติการกลาง อาคารวชิรานุสรณ์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

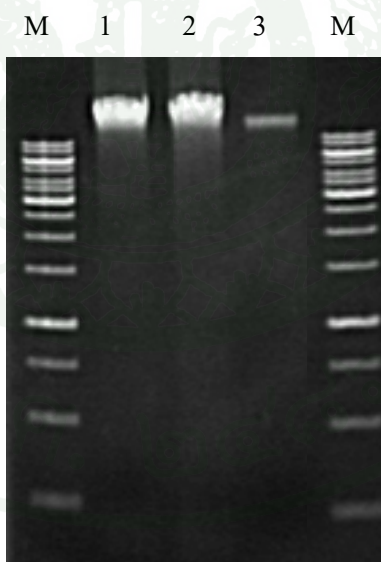
2. ระยะเวลาทำการวิจัย

ทำการวิจัยตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2553 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2553

ผลและวิจารณ์

1. การสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนของใบอ่อนโดยใช้วิธีการที่ประยุกต์จาก Molecular Biology Laboratory Protocols (2002) นำมาตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีวัดการดูดกลืนแสงและตรวจสอบในเจล agarose ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 260 กับ 280 นาโนเมตร (A260/A280) พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ระหว่าง 1.6 -1.8 ซึ่งถือว่าดีเอ็นเอมีคุณภาพค่อนข้างดี ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่เกิดลักษณะ smear band แต่ยังมีกรปนเปื้อนของโปรตีนและสารจำพวกพอลิแซคคาไรด์บริเวณที่ใส่ตัวอย่างอยู่บ้างเล็กน้อย และปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากแต่ละตัวอย่างที่สกัดได้มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4) จึงปรับความเข้มข้นให้ได้ 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4 จีโนมิกดีเอ็นเอของไพลเหลือง (*Zingiber montanum* 'Lueng') (1), ไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* 'Ploksake') (2), ไพลดำ (*Zingiber ottensii*) (3) และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)

2. การวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี

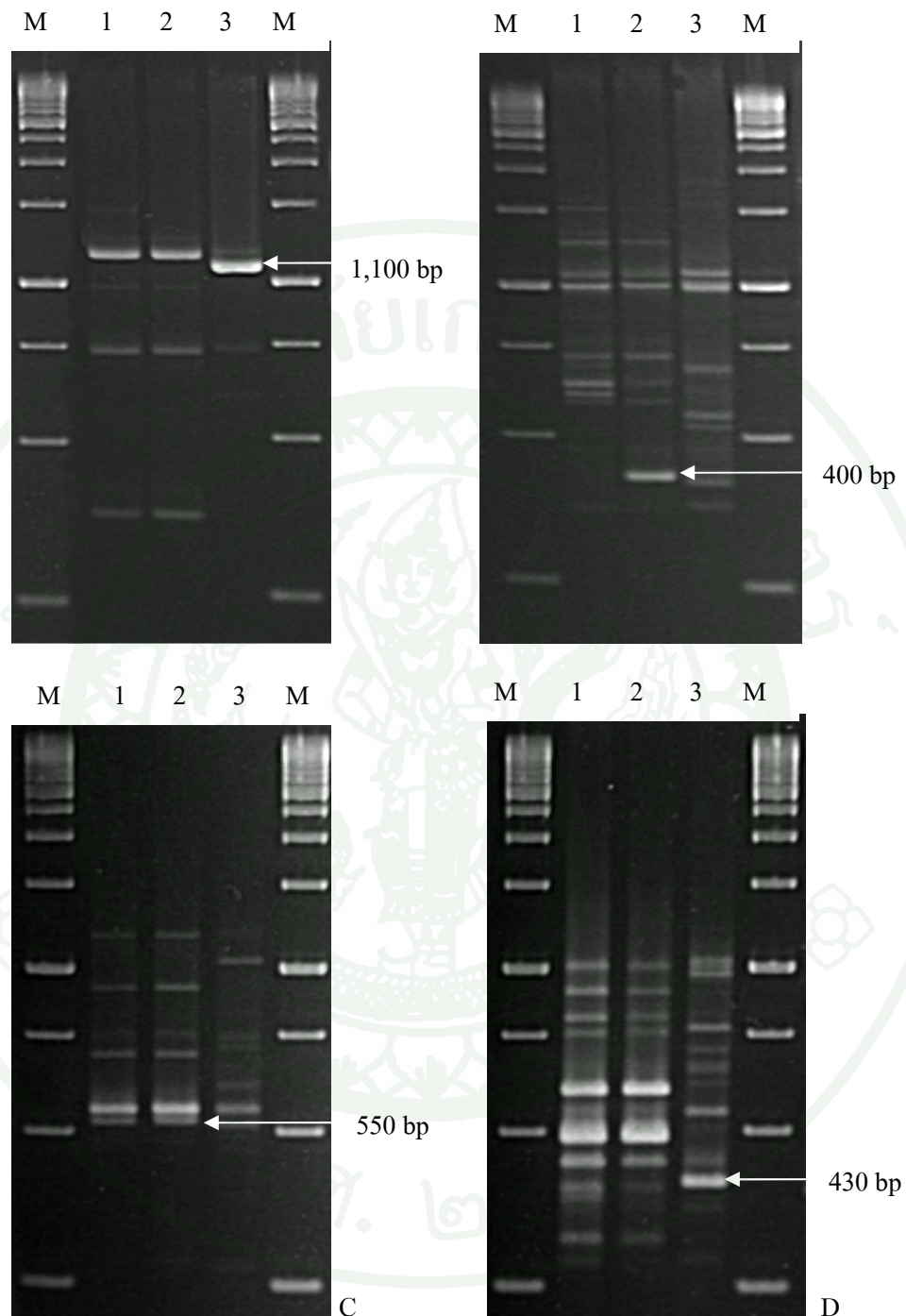
จากการทดสอบไพรเมอร์แบบคู่ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์จำนวน 46 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยไพรเมอร์แต่ละชนิดมีลำดับของนิวคลีโอไทด์และเปอร์เซ็นต์ของ guanine และ cytosine (G+C เปอร์เซ็นต์) 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเลือกไพรเมอร์ใดที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอกับไพลเหลียง (*Zingiber montanum* 'Lueng') ไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* 'Plooksake') และ ไพลคำ (*Zingiber ottensii*) จากการคัดเลือกและทำซ้ำสามครั้ง พบว่ามีไพรเมอร์ 16 ชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์ OPC01, OPC18, OPQ02, OPQ05, OPR01, OPR02, OPR06, OPS02, OPX06, OPY07, OPY11, OPY14, OPZ11, OPZ15, OPZ16 และ OPZ18 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดี คงที่ มีแถบดีเอ็นเอชัดเจน (major band) และแถบดีเอ็นเอที่จาง (minor band) ซึ่งแถบดีเอ็นเอเหล่านั้นสามารถแสดงความแตกต่างในหลายพิมพ์ดีเอ็นเอจนเกิดเป็นพหุสัณฐาน (polymorphism)

รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับไพลเหลียง (*Zingiber montanum* 'Lueng') ไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* 'Plooksake') และไพลคำ (*Zingiber ottensii*) คาดว่าสามารถใช้ซึ่งชนิดของไพลทั้ง 2 ชนิดได้ โดยพิจารณาจากลักษณะของการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในชนิดหนึ่ง แต่ไม่ปรากฏในอีกชนิดหนึ่ง พบว่าสามารถคัดเลือกแถบดีเอ็นเอได้ 23 แถบจากไพรเมอร์ 16 ชนิดดังตารางที่ 4

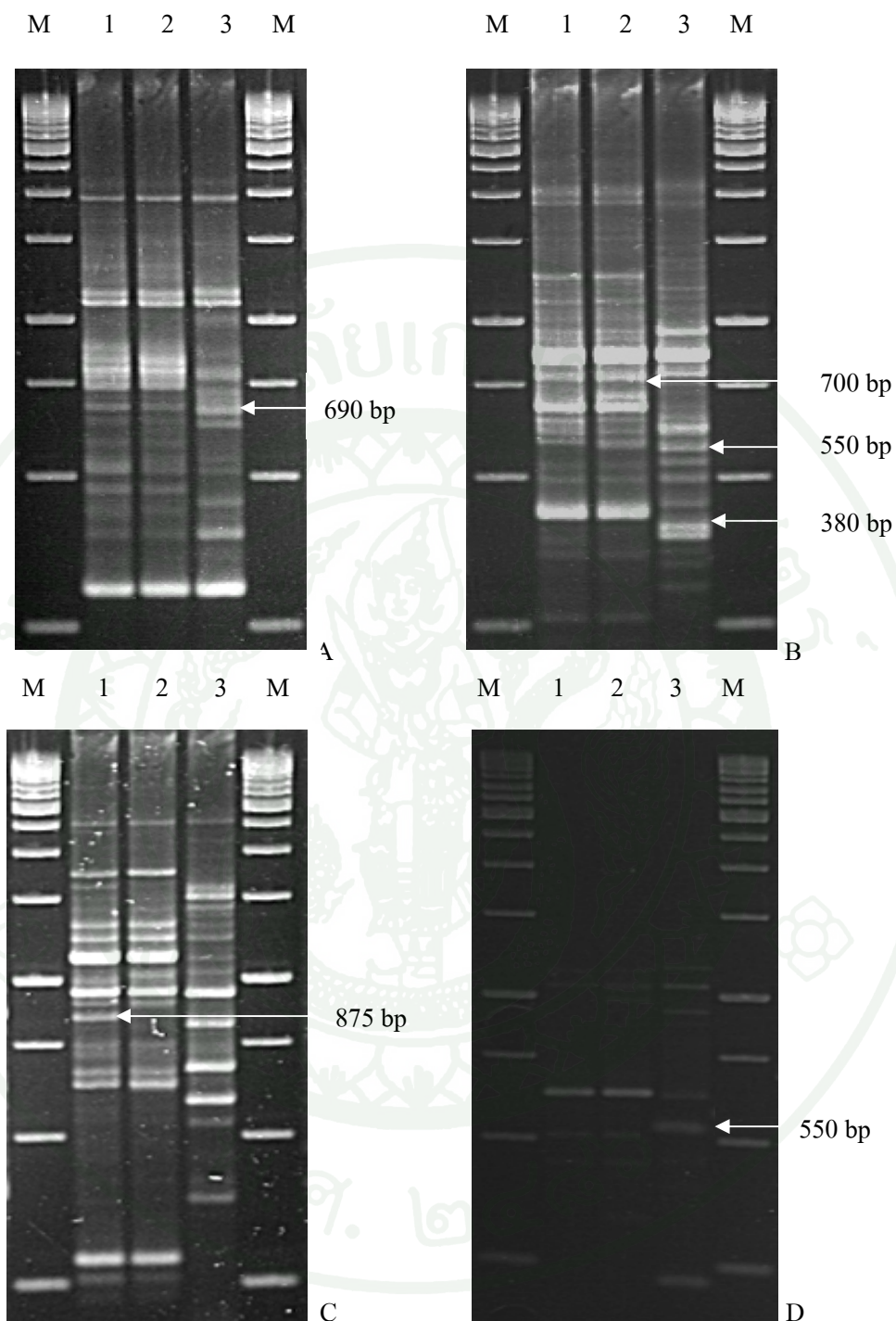
ไพรเมอร์ OPC01 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบสในไพลคำ (ภาพที่ 5A) ไพรเมอร์ OPC18 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบสในไพลปลุกเสก (ภาพที่ 5B) ไพรเมอร์ OPQ02 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 550 คู่เบสทั้งในไพลเหลียงและไพลปลุกเสก (ภาพที่ 5C) ไพรเมอร์ OPQ05 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 430 คู่เบสในไพลคำ (ภาพที่ 5D) ไพรเมอร์ OPR01 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 690 คู่เบสในไพลคำ (ภาพที่ 6A) ไพรเมอร์ OPR02 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบสในไพลปลุกเสก แถบดีเอ็นเอขนาด 550 และ 380 คู่เบสในไพลคำ (ภาพที่ 6B) ไพรเมอร์ OPR06 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 875 คู่เบสในไพลเหลียง (ภาพที่ 6C) ไพรเมอร์ OPS02 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 550 คู่เบสในไพลคำ (ภาพที่ 6D) ไพรเมอร์ OPX06 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบสในไพลคำ (ภาพที่ 7A) ไพรเมอร์ OPY07 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,125 คู่เบสในไพลเหลียงและไพลปลุกเสก (ภาพที่ 7B) ไพรเมอร์ OPY11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 740 คู่เบสในไพลเหลียงและไพลปลุกเสก และแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบสในไพลคำ

(ภาพที่ 7C) ไพรเมอร์ OPY14 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 260 คู่เบสในไฟลเหลืองและไฟลปลุกเสก (ภาพที่ 7D) ไพรเมอร์ OPZ11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสในไฟลเหลืองและแถบดีเอ็นเอขนาด 550 คู่เบสไฟลดำ (ภาพที่ 8A) ไพรเมอร์ OPZ15 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบสในไฟลดำ (ภาพที่ 8B) ไพรเมอร์ OPZ16 แถบดีเอ็นเอขนาด 730 คู่เบสในไฟลเหลืองและไฟลปลุกเสกและแถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบสในไฟลดำ (ภาพที่ 8B) และไพรเมอร์ OPZ18 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบสในไฟลดำ (ภาพที่ 8D)

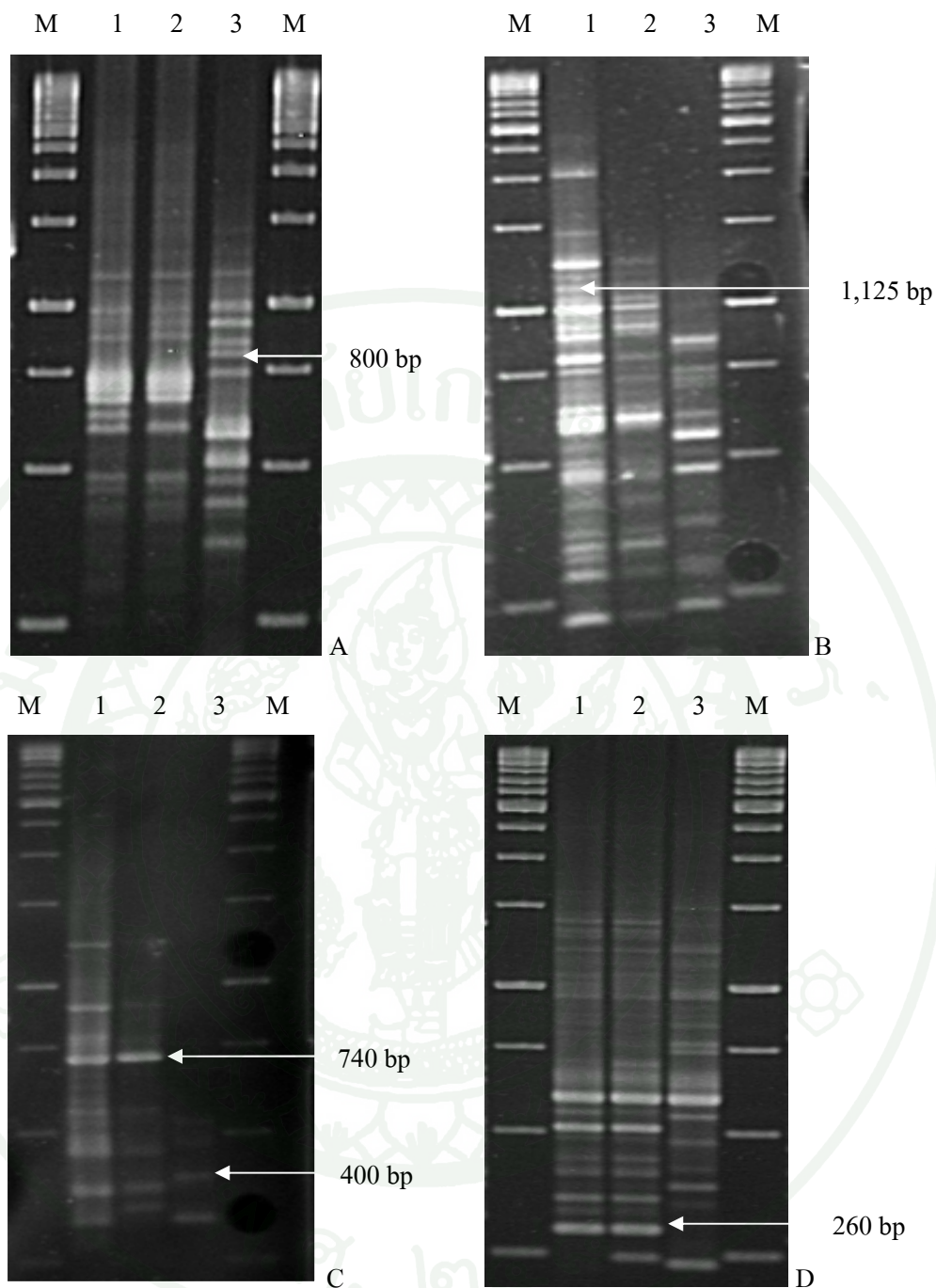
การที่ไพรเมอร์เหล่านี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไฟลในแต่ละชนิดได้ เนื่องจากไพรเมอร์สามารถเข้าเกาะกับจีโนมของดีเอ็นเอต้นแบบได้ โดยไพรเมอร์จะต้องจับอยู่บนดีเอ็นเอทั้งสองเส้นในตำแหน่งที่ใกล้กันและในทิศทางเข้าหากัน จึงจะเกิดปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่และสามารถเพิ่มปริมาณได้ (William *et al.*, 1990) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ เสาวลักษณ์ (2552) ที่สามารถใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (Random primer) ชุด Operon Technologies สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในไฟล ส่วนการที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นที่เกาะกับไพรเมอร์หายไปหนึ่งตำแหน่งหรือทั้งสองตำแหน่ง หรือมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่มาสอดแทรกในระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะ ทำให้ไพรเมอร์ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และอาจเกิดจากการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายจึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (William *et al.*, 1990) การเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ที่เป็นผลมาจากการที่ไพรเมอร์เกาะในตำแหน่งที่ต่างกันทำให้ได้จำนวนและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เปลี่ยนไป หรือเกิดจากดีเอ็นเอส่วนที่ไพรเมอร์เกาะได้หายไป หรือมีการแทนที่ หรือเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่ไพรเมอร์เกาะจึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ หรือเกิดการหายไปหรือเพิ่มขึ้นมาของดีเอ็นเอบริเวณที่อยู่ระหว่างตำแหน่งของไพรเมอร์ 2 ตำแหน่ง ทำให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมีขนาดเปลี่ยนแปลงไป โดยจะแสดงผลในลักษณะการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่าง ๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ (วาริน, 2545) เทคนิคอาร์เอพีดีนั้นถูกนำมาใช้ในการจำแนกพืชสกุล *Pyrus* (Oliveira *et al.*, 1999) และในปี ค.ศ. 2000 Nicolosi และคณะ พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากส้ม (*citrus*) บางส่วนมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์บางสายพันธุ์ สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล ในการคัดเลือกสายพันธุ์ได้ต่อไปในอนาคตได้เช่นกัน



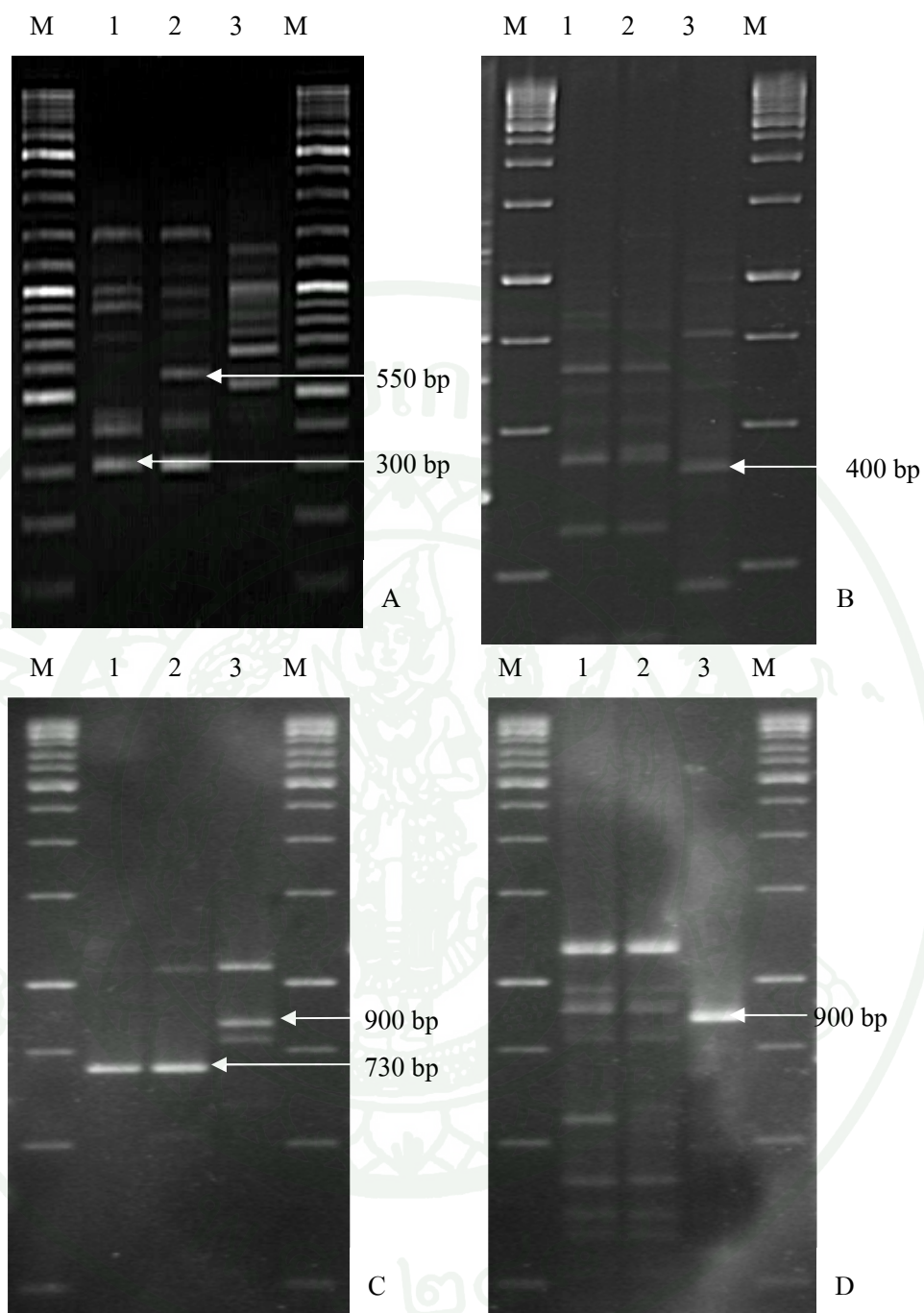
ภาพที่ 5 ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของไพลเหลือง (*Zingiber montanum* 'Lueng')(1) ไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* 'Plooksake') (2) และไพลดำ (*Zingiber ottensii*)(3) จากการใช้ไพรเมอร์ OPC01 (A), OPC18 (B), OPQ02 (C), OPQ05 (D), และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)



ภาพที่ 6 ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของไพลเหลือง (*Zingiber montanum* 'Lueng') (1) ไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* 'Plooksake') (2) และไพลดำ (*Zingiber ottensii*) (3) จากการใช้ไพรเมอร์ OPR01 (A), OPR02 (B), OPR06 (C), OPS02 (D), และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)



ภาพที่ 7 ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของไพลเหลือง (*Zingiber montanum* ‘Lueng’) (1) ไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* ‘Plooksake’) (2) และไพลดำ (*Zingiber ottensii*) (3) จากการใช้ไพรเมอร์ OPX06 (A), OPY07 (B), OPY11 (C), OPY14 (D), และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)



ภาพที่ 8 ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของไพลเหลือง (*Zingiber montanum* 'Lueng') (1) ไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* 'Plooksake') (2) และไพลดำ (*Zingiber ottensii*) (3) จากการใช้ไพรเมอร์ OPZ11 (A), OPZ15 (B), OPZ16 (C), OPZ18 (D), และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)

ตารางที่ 4 ชนิดของไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3') และขนาดของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ
 เจาะจงกับไพลเหลือง (*Zingiber montanum* 'Lueng') ไพลปลูกเสก (*Zingiber montanum*
 'Plooksake') และ ไพลดำ (*Zingiber ottensii*)

ลำดับแถบ ดีเอ็นเอ	ไพรเมอร์	ลำดับ นิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (คู่เบส)	ไพล เหลือง (PY)	ไพล ปลูกเสก (PPS)	ไพลดำ (PB)
1	OPC01	TTCGAGCCAG	1,100	-	-	+
2	OPC18	TGAGTGGGTG	400	-	+	-
3	OPQ02	TCTGTCGGTC	550	+	-	-
4			550	-	+	-
5	OPQ05	CCGCGTCTTG	430	-	-	+
6	OPR01	TGCGGGTCCT	690	-	-	+
7	OPR02	CACAGCTGCC	700	-	+	-
8			550	-	-	+
9			380	-	-	+
10	OPR06	GTCTACGGCA	875	+	-	-
11	OPS02	CCTCTGACTG	550	-	-	+
12	OPX06	ACGCCAGAGG	800	-	-	+
13	OPY07	AGAGCCGTCA	1,125	+	-	-
14	OPY11	AGACGATGGG	740	+	+	-
15			400	-	-	+
16	OPY14	GGTCGATCTG	260	+	+	-
17	OPZ11	CTCAGTCGCA	300	+	-	-
18			550	-	+	-
19	OPZ15	CAGGGCTTTC	400	-	-	+
20	OPZ16	TCCCCATCAC	730	+	+	-
21			730	-	+	-
22			900	-	-	+
23	OPZ18	AGGGTCTGTG	900	-	-	+

การทำปฏิกิริยาเทคนิคพีซีอาร์นั้น ดีเอ็นเอที่ใช้ต้องไม่มีสิ่งเจือปนมากนัก เพราะถ้าดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของสารอื่น เช่น โพลีแซคคาไรด์ หรือสารประเภทฟีนอลิก ก็จะทำให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากอาร์เอฟดีไม่ชัดเจน เนื่องจากโพลีแซคคาไรด์ หรือสารประเภทฟีนอลิก จะไปมีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด (Demeke และ Adams, 1992) ทำให้ผลที่ได้มีความคลาดเคลื่อน ดังนั้นการลดโพลีแซคคาไรด์ปริมาณสามารถทำได้ได้โดยการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (Ram *et al.*, 1996) และดีเอ็นเอต้องไม่แตกหัก (sheered DNA) หรือ degrade เพราะจะมีผลต่อการทำปฏิกิริยาซ้ำและการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Godard *et al.*, 1994) และการเติมสาร PVP (polyvinyl pyrrolidone) จะทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์มากขึ้น เนื่องจากไบอ่อนของโพลีเมอร์การสะสมทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งเป็นสารจำพวก polyphenol จะทำให้ดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อน โดยสาร PVP จะจับกับพวก polyphenolic แล้วอยู่ในสภาพที่ไม่ละลายน้ำแล้วแยกชั้นออกมา ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของสาร ซึ่งจะทำให้สารละลายดีเอ็นเอเป็นสีน้ำตาลและมีผลไปยังยังการทำงานของเอ็นไซม์ต่าง ๆ (Sue *et al.*, 1997) ในขณะที่เดียวกันความเข้มข้นของดีเอ็นเอก็มีความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยา ถ้าน้อยเกินไปก็จะไม่สามารถทำซ้ำได้ (มะลิวัลย์, 2546) ส่วนความเข้มข้นของ $MgCl_2$ จะมีผลต่อการเกาะของไพรเมอร์บนเส้นดีเอ็นเอต้นแบบ ในสถานะที่ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ สูงและสภาพความเข้มงวดต่ำ (stringency) จะทำให้เกิดการจับคู่ที่ผิดพลาด (miss-matching) ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (มะลิวัลย์, 2546)

ตัดแถบดีเอ็นเอที่คาดว่าสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของโพลีทั้ง 2 กลุ่มดังแสดงในตารางที่ 4 จำนวน 23 แถบ โดย “+” หมายถึงการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงและได้รับการคัดเลือกเพื่อนำไปทดลองต่อไป และ “-” หมายถึงการไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงในโพลีชนิดนั้นๆ แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด AxyPrep DNA Gel Extraction (Axygen, USA) แล้วทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว เพื่อเพิ่มปริมาณจากชิ้นดีเอ็นเอเหล่านั้น ชิ้นดีเอ็นเอที่จะใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดจะนำมาเชื่อมกับพลาสมิด pGEM-T และเพิ่มปริมาณในเชื้อ *E.coli* เมื่อคัดเลือกโคลนที่ต้องการได้แล้วจึงนำพลาสมิดไปวิเคราะห์ลำดับเบสและนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับเบสที่ได้มีความเหมือนกับข้อมูลในฐานข้อมูล ยกเว้น C01_PB, Y11_PPS และ Z11_PY ไม่มีความเหมือนกับข้อมูลในฐานข้อมูล (ตารางที่ 5) และไม่ใช้ส่วนเริ่มต้นของยีน (open reading frame) (ภริตา, 2554) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งสองแถบดีเอ็นเอนี้ไม่ได้อยู่ในตำแหน่ง coding แต่ RAPD marker มักจะให้ลำดับเบสที่เฉพาะกับ intron ซึ่ง intron จะมีหน้าที่ควบคุมการแสดงและไม่แสดง

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอจำนวน 22 แถบกับฐานข้อมูล NCBI

No.	Clone	Sizes (bp)	Homology		Nucleotide identity (bp)	E-Value	Accession no.
			Name	Activity			
1	OPC01_PB	1,100	<i>Marinomonas sp.</i>	Complete genome	24/24 (100%)	1.3	CP000749.1
2	OPC18_PPS	400	<i>Punica granatum</i>	Microsatellite sequence clone ABR11-MP33	38/43 (89%)	0.003	GU950625.1
3	OPQ02_PY	550	<i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i>	Complete sequence clone KBrB042J11	29/33 (88%)	2.1	AC189344.2
4	OPQ02_PPS	550	<i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i>	Complete sequence clone KBrB042J11	29/33 (88%)	2.1	AC189344.2
5	OPQ05_PB	430	<i>Zingiber officinale</i>	Genomic sequence clone ZoP92	118/171 (70%)	1e-07	AY856502.1
6	OPR01_PB	690	<i>Hordeum vulgare subsp.</i>	Clones BAC 799C8, 122A5 hardness locus region	37/45 (83%)	0.22	AY643844.1

ตารางที่ 5 (ต่อ)

No.	Clone	Sizes (bp)	Homology		Nucleotide identity (bp)	E-Value	Accession
			Name	Activity			
7	OPR02_PPS	700	<i>Daucus carota subsp. Sativus</i>	Genomic sequence clone BAC C127D12	445/621 (72%)	1e-81	FJ149679.1
8	OPR02_PB	550	<i>Daucus carota subsp. Sativus</i>	Genomic sequence clone BAC C123I08	70/80 (88%)	9e-18	FJ148933.1
9	OPR02_PB	380	<i>Zingiber officinale</i>	Genomic sequence clone ZoP52	203/257 (79%)	3e-53	AY856492.1
10	OPR06_PY	875	<i>Vitis vinifera</i>	Genome shotgun sequence contig VV78X126231.15	46/58 (80%)	0.083	AM464567.1
11	OPS02_PB	550	<i>Fragaria vesca</i>	Complete sequence clone fosmid 11D02	45/48 (94%)	1e-09	EU024828.1
12	OPX06_PB	800	<i>Oryza glaberrima</i>	Complete sequence clone OG_BBa0083I10	26/28 (93%)	3.3	AC210489.1

ตารางที่ 5 (ต่อ)

No.	Clone	Sizes (bp)	Homology		Nucleotide identity (bp)	E-Value	Accession
			Name	Activity			
13	OPY07_PY	1,125	<i>Vitis vinifera</i>	Whole genome shotgun sequence contig VV78X170229.2	39/47 (83%)	0.32	AM431676.2
14	OPY11_PPS	740	<i>Plasmodium knowlesi</i> strain H	Complete genome chromosome 12	33/38 (87%)	0.84	AM910994.1
15	OPY11_PB	400	<i>Cicer arietinum</i>	Partial mitochondrial tRNA-Lys gene	194/211 (92%)	1e-76	AJ630374.1
16	OPY14_PPS	260	<i>Brassica oleracea</i>	Genomic sequence clone B21F5	24/25 (96%)	3.7	AC152123.1
17	OPZ11_PY	300	<i>Medicago truncatula</i>	Chromosome 8 clone mth2-22h8	30/34 (89%)	3.8	AC124971.15
18	OPZ11_PPS	550	<i>Artemisia annua</i> strain <i>Artemis</i>	mRNA sequence Contig7722.Ac	33/37 (90%)	0.18	EZ184246.1
19	OPZ15_PB	400	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>Pekinensis</i>	Clone KBrS004A14	27/29 (94%)	0.45	AC189633.2

ตารางที่ 5 (ต่อ)

No.	Clone	Sizes (bp)	Homology		Nucleotide identity (bp)	E-Value	Accession
			Name	Activity			
20	OPZ16_PY	730	<i>Drakaea concolor</i>	tRNA-Leu gene for transfer RNA-Leu and trnL-F intergenic spacer	28/29 (97%)	0.067	AJ409405.1
21	OPZ16_PPS	730	<i>Drakaea concolor</i>	tRNA-Leu gene for transfer RNA-Leu and trnL-F intergenic spacer	28/29 (97%)	0.067	AJ409405.1
22	OPZ16_PB	900	<i>Riedelia aff. wrayii</i>	18S small subunit ribosomal RNA gene	258/300 (86%)	1e-94	AF168872.1
23	OPZ18_PB	900	<i>Carica papaya</i>	Complete sequence clone 90D06	444/635 (70%)	6e-67	FJ429371.1

ออกของยีน (gene expression) อย่างไรก็ตามลำดับเบสเหล่านี้อาจมีลำดับเบสบางส่วนที่เป็นส่วนที่แสดงออกของยีน หรือมีผลต่อที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารสำคัญ (Lubbers *et al.*, 1994; Hisatsune *et al.*, 2005) ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

จากผลการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่อชนิดด้วย SCAR ที่ได้มาจากเทคนิคอาร์เอพีดี (ตารางที่ 6) นำคู่ SCAR ไพรเมอร์ไปทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์กับตัวอย่างไพลทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าจาก 23 ไพรเมอร์มีเพียง 6 ไพรเมอร์ที่ให้ผลของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอมีความจำเพาะกับไพลชนิดนั้นๆ ดังนี้ ไพรเมอร์ Y07_PY₁₁₂₅ แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส ที่จำเพาะกับไพลเหลือง (ภาพที่ 9) ไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅, Y11_PPS₆₂₆, และ Z16_PPS₇₃₀ แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 721, 595 และ 654 คู่เบส ตามลำดับ ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลเหลืองและไพลปลูกเสก โดยในไพรเมอร์ Y11_PPS₆₂₆ และ Z16_PPS₇₃₀ แสดงแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบในทั้งไพลเหลืองและไพลปลูกเสก แต่ไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅ ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบที่จำเพาะเจาะจงกับไพลเหลือง แต่ในไพลปลูกเสกนั้นแสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ (double band) (ภาพที่ 10) และไพรเมอร์ S02_PB₅₅₀ และ X06_PB₈₀₀ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 465 และ 756 คู่เบส ตามลำดับ ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลดำ (ภาพที่ 11) ส่วนไพรเมอร์ C01_PB₁₁₀₀, C18_PB₄₀₀, Q02_PY₅₅₀, Q02_PPS₅₅₀, C05_PB₄₃₀, R01_PB₆₉₀, R02_PPS₇₀₀, R02_PB₅₅₀, R02_PB₃₈₀, Y11_PB₄₀₀, Y14_PPS₂₆₀, Z11_PY₃₀₀, Z11_PPS₅₅₀, Z16_PB₉₀₀, Z16_PY₇₃₀, และ Z18_PB₉₀₀ ให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในไพลทั้ง 3 ชนิดแต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับไพลชนิดใดๆ ดังนั้นไพรเมอร์เหล่านี้จึงไม่สามารถนำมาใช้บ่งชี้ชนิดของไพลได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Byeong และคณะ. (2010) ได้พัฒนา SCAR marker จากเทคนิคอาร์เอพีดี และ multiplex-PCR เพื่อจำแนกสายพันธุ์สมุนไพรร 3 ชนิดได้แก่ *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum*, และ *Polygonum multiflorum* (Fallopia multiflorum) พบว่าจากอาร์เอพีดีไพรเมอร์ 16 ชนิด ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 45 แถบ แล้วนำมาออกแบบ SCAR ไพรเมอร์ ได้ 12 ไพรเมอร์ มีเพียง 6 SCAR ไพรเมอร์ ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดได้ คือ SCAR ไพรเมอร์ HC18-2, HC20-4, HA13-5, HC15-4, HC15-3, และ HC14-2 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 407 และ 196 คู่เบสให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับ *Cynanchum wilfordii* และ *Cynanchum auriculatum* แถบดีเอ็นเอขนาด 340 และ 460 คู่เบสให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับ *Polygonum multiflorum* และแถบดีเอ็นเอขนาด 300 และ 325 คู่เบสให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับ *Cynanchum auriculatum*

ตารางที่ 6 SCAR ไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3') Forward primer และ Reverse primer และ
ขนาดของแถบดีเอ็นเอ

ลำดับ	SCAR ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (คู่เบส)
1	C01 PB_1100	F 5'CGACGTCAAGATGGTTCAGCAG3' R 5'GGGTCTGAATAATCCTACAGGG3'	883
2	C18 PPS_400	F 5'CTCGGATGAGGATCCCTA3' R 5'GCAATGAATAGGTCACGG3'	322
3	Q02 PY_550	F 5'GGTCCATTTGAG ATCTCTAAGC3' R 5'GATCGAAGGTCTTCGAAGC3'	488
4	Q02 PPS_550	F 5'GGTCCATTTGAG ATCTCTAAGC3' R 5'GATCGAAGGTCTTCGAAGC3'	488
5	Q05 PB_430	F 5'TGGGCTCATCGTACCACACC3' R 5'CAGATAGTAGACTCTTGAGCGG3'	318
6	R01 PB_690	F 5'GGGTAGATTAGAAGCTTCCCC3' R 5'GGTAGCTCATCAGGGAAGACTGC3'	624
7	R02 PPS_700	F 5'CCCATGTAGACGGTTATCTCTCC3' R 5'CTGAGGGAACACCCGTAAGGG3'	595
8	R02 PB_550	F 5'CCTTTGTAGCATTGCCCATG3' R 5'CCTCGTGCCAAGCTCCC3'	489
9	R02 PB_380	F 5'CGACAGCAGTAGTCTTCAGC3' R 5'GCACAACCTTAGAGTACCATCC3'	311
10	R06 PY_875	F 5'GAGAGGAAGAACTTGGCTCCG3' R 5'CCTAGGTCCTGAACACAATAAAGC3'	721
11	S02 PB_550	F 5'ACGAAGAAGGAGTACCAC3' R 5'CCTACACGCTTACCTATCTAT3'	465

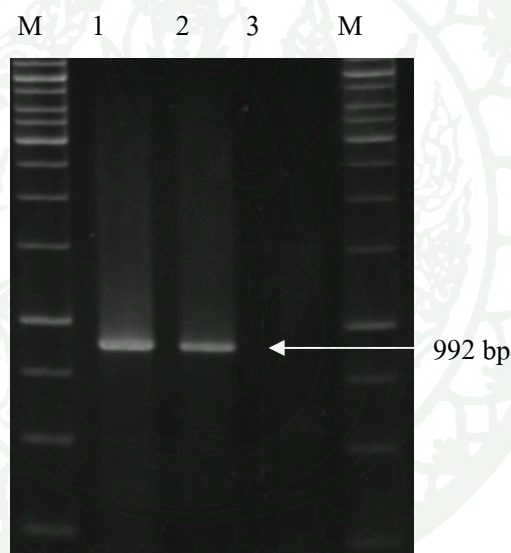
ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับ	SCAR ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (คู่เบส)
12	X06_PB_800	F 5'CGCACAGGAGCAGAAATGG3' R 5'ATCGACCACCCTTTCTCCC3'	756
13	Y07 PY_1125	F 5'GGCGAAGTGGCGACATAAGG3' R 5'CCACTTCTTGGTCTTGGGC3'	992
14	Y11 PPS_740	F 5'GTAGTTGGATCAAGGGCAAGGC3' R 5'CACTCTTATTCAAAACACCCCC3'	626
15	Y11 PB_400	F 5'TCTACAATTACCTCAAGGACGGG3' R 5'CCATCAAAGGAGTGGAGCTG3'	299
16	Y14 PPS_260	F 5'ATGGTAAGAGGCAAAGTCCA3' R 5'GTCCGATAGATGCCTGC3'	268
17	Z11 PY_300	F 5'GGGCTAGGGATCATAGAGTC3' R 5'CGACCTCTGCCTTCTCCTCT3'	255
18	Z11 PPS_550	F 5'GCCAGAGGTGGAGAAACCT3' R 5'CAGAAGCCCTCCCAATCAAT3'	527
19	Z15 PB_400	F 5'GTAAAG GCGGTTAACATGAC3' R 5'CATGTG TCTAGCTTCACTCA3'	380
20	Z16 PB_900	F 5'ATCGGCCAAGGCAACAGACT3' R 5'CTGCAGACACAGCTCCAGCC3'	793
21	Z16 PY_730	F 5'CAACCACGGTAAATCATGAAGC3' R 5'CAGTGAGAAAGAACCTTGCC3'	667
22	Z16 PPS_730	F 5'CAGTGAGAAAGAACCTTGCC3' R 5'TCATGAAGCTTGCTGGCC3'	654

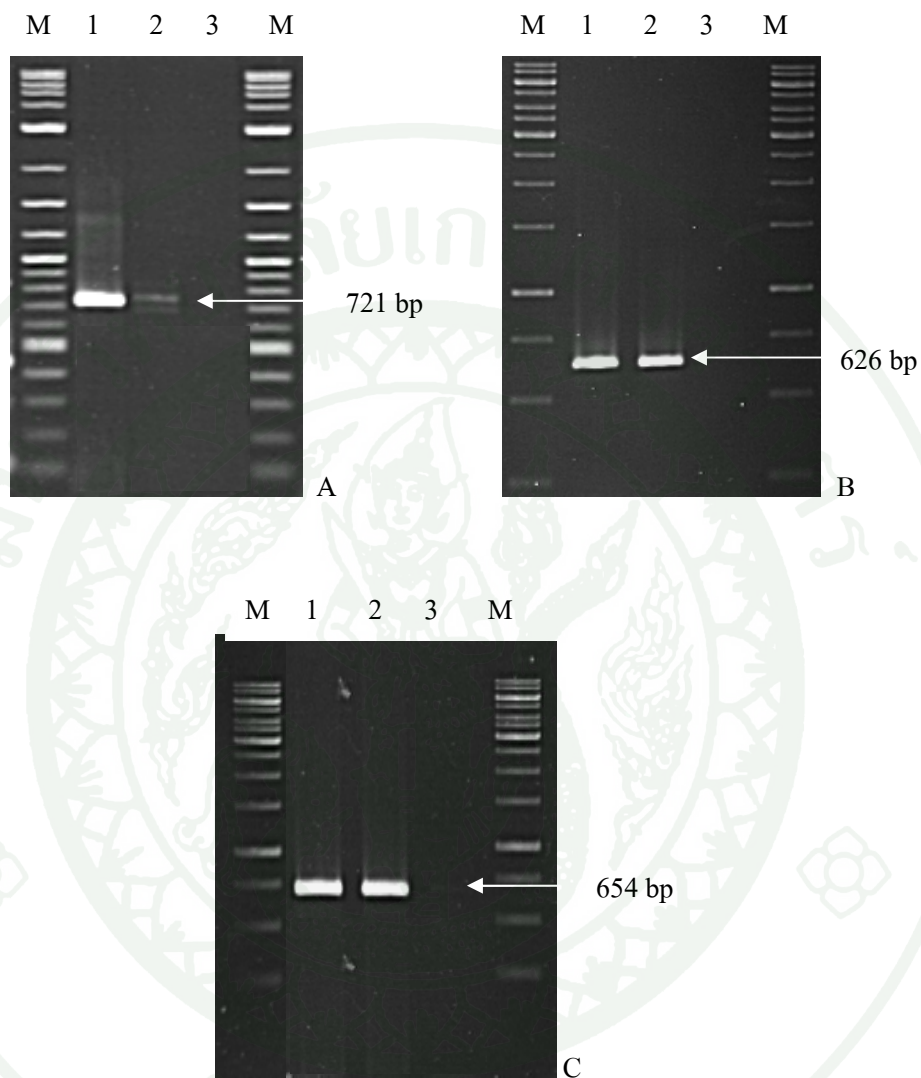
ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับ	SCAR ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (คู่เบส)
23	Z18 PB_900	F 5'CCAGCTCAGGAGGAATTACGG3' R 5'TGGCGGATCTGCTGGATG GC3'	807

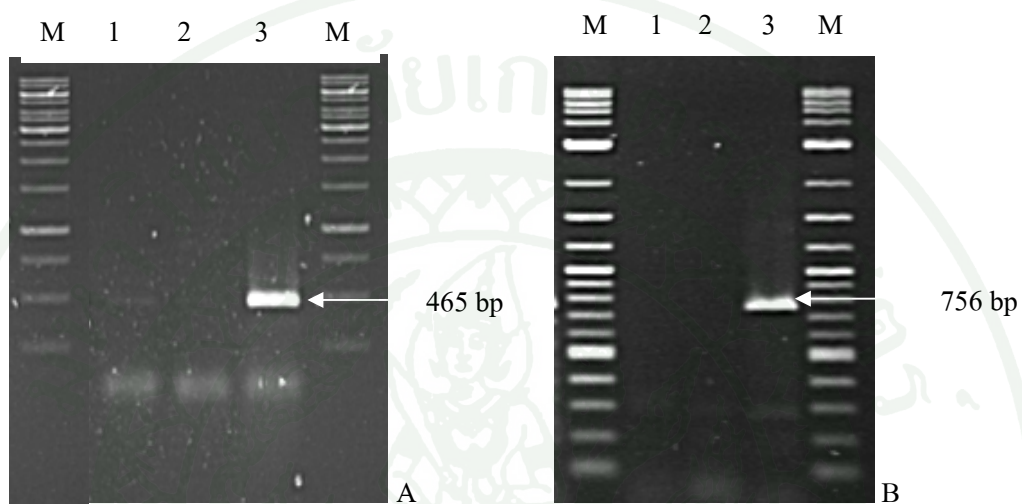
“F” หมายถึง Forward primer และ “R” หมายถึง Reverse primer



ภาพที่ 9 ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SCAR ของไพลเหลือง (*Zingiber montanum* ‘Lueng’) (1) ไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* ‘Plooksake’) (2) และไพลดำ (*Zingiber ottensii*) (3) จากการใช้ SCAR ไพรเมอร์ Y07_PY₁₁₂₅ ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลเหลืองและไพลปลุกเสก และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)



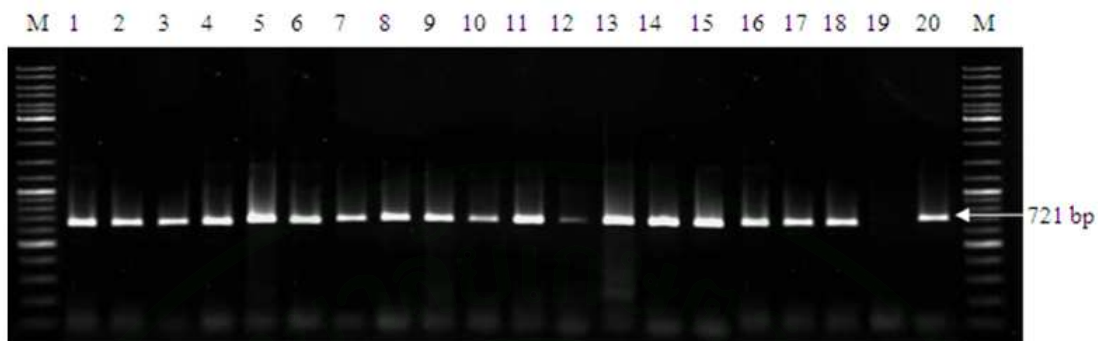
ภาพที่ 10 ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SCAR ของไพลเหลือง (*Zingiber montanum* 'Lueng') (1) ไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* 'Plooksake') (2) และไพลดำ (*Zingiber ottensii*) (3) จากการใช้ SCAR ไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅ (A), Y11_PPS₇₄₀ (B), Z16_PPS₇₃₀ (C) ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลเหลืองเท่านั้นและ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)



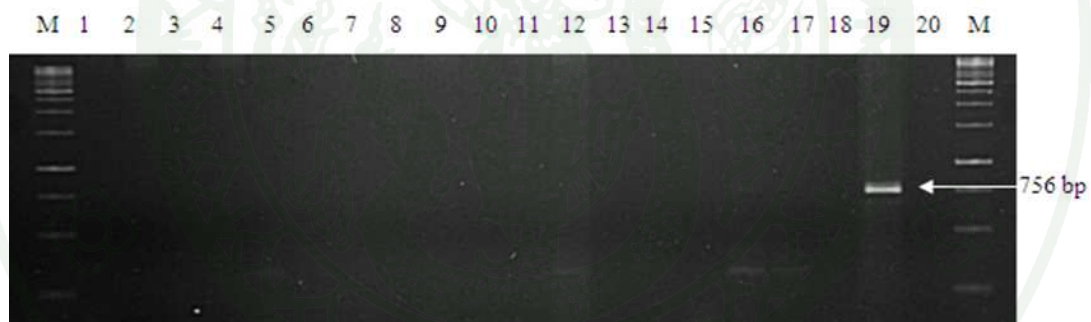
ภาพที่ 11 ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SCAR ของไพลเหลือง (*Zingiber montanum* 'Lueng') (1) ไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* 'Plooksake') (2) และไพลดำ (*Zingiber ottensii*) (3) จากการใช้ SCAR ไพรเมอร์ S02_PB₅₅₀ (A) และ X06_PB₈₀₀ (B) ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลดำเท่านั้นและgene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)

เมื่อนำ SCAR ไพรเมอร์ทั้ง 6 ที่คัดเลือกได้ไปทดสอบประสิทธิภาพกับประชากรไพลทั้งหมด 20 ตัวอย่างจาก 6 แหล่งต่างๆในประเทศไทย ดังตารางที่ 1 พบว่ามีเพียง 2 ไพรเมอร์ที่สามารถนำมาพัฒนาเพื่อบ่งชี้ชนิดของไพลได้คือ ไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅ และ X06_PB₈₀₀ โดยไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 721 คู่เบสที่จำเพาะเจาะจงกับ *Zingiber montanum* จากแหล่งต่างๆและ *Zingiber sp.* ทางภาคตะวันตก ที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตากและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไพลดำ (*Zingiber ottensii*) ทางภาคตะวันตก ที่อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี (ภาพที่ 11) ไพรเมอร์ X06_PB₈₀₀ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 756 คู่เบสที่จำเพาะเจาะจงกับไพลดำ (*Zingiber ottensii*) ทางภาคตะวันตก ที่อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน *Zingiber montanum* จากแหล่งต่างๆและ *Zingiber sp.* ทางภาคตะวันตก ที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก (ภาพที่ 12) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของเสาวลักษณ์ (2552) ที่รายงานว่าเมื่อใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมกลุ่มพืชในไพลและเครือญาติพบว่าพืชทั้ง 2 ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับไพล (*Zingiber montanum*) สูง มีค่า Bootstrab ที่แยกออกจากไพล เท่ากับ 58 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชชนิดนี้ เพราะมีลักษณะหลายลักษณะที่คล้ายคลึงกับไพลมาก (เสาวลักษณ์ (2552) อ้างโดยปราโมทย์, ติดต่อบุคคล)

การปรากฏของอาร์เอพีดีเกิดจากไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแบบสุ่มและกระจายทั่วจีโนม ทำให้ได้แถบที่มีลักษณะเป็นพหุสัณฐาน (polymorphism) โดยพหุสัณฐานเหล่านี้เกิดจากจำนวนของตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะไม่เท่ากันหรือบริเวณที่ไพรเมอร์เกาะได้หายไปหรือเพิ่มเข้ามาหรือมีการเปลี่ยนแปลงเบสในบริเวณที่ไพรเมอร์เกาะหรือเกิดการขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นมาของดีเอ็นเอบริเวณที่อยู่ระหว่างตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ ในขณะที่แถบดีเอ็นเอของการใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงหรือ SCAR ดังไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅ และ X06_PB₈₀₀ มีลักษณะเป็น monomorphic band ที่มีขนาดและเบส เฉพาะกับไพรเมอร์ที่ใช้ นอกจากนี้ยังพบว่าเกือบทุกไพรเมอร์ที่ถูกพัฒนามาใช้ จะให้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบหรือไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์นี้ไม่สามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างของไพลทั้ง 3 ชนิดได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liao และคณะ (2009) ที่ได้ศึกษาการจำแนกเพศในต้นแปะก๊วย (*Ginkgo biloba* L.) โดยเทคนิค RAPD และ SCAR เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับตำแหน่งของเพศ จากตัวอย่างต้นเพศผู้ 6 ต้น และเพศเมีย 3 ต้นพบว่าจากอาร์เอพีดีไพรเมอร์ทั้งหมด 48 ไพรเมอร์ มีเพียงไพรเมอร์ S10 ที่ให้แถบ



ภาพที่ 12 ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอของการทดสอบสกรีนไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅ กับประชากรไพลทั้งหมด 20 ตัวอย่างจาก 6 แหล่งในประเทศไทย โดยตัวอย่างเรียงตามลำดับดังตารางที่ 1 และ gene ruler 100 bp DNA ladder (Fermentas) (M)



ภาพที่ 13 ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอของการทดสอบสกรีนไพรเมอร์ X06_PB₈₀₀ กับประชากรไพลทั้งหมด 20 ตัวอย่างจาก 6 แหล่งในประเทศไทย โดยตัวอย่างเรียงตามลำดับดังตารางที่ 1 และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)

ดีเอ็นเอขนาด 550 คู่เบสในเพศผู้และขนาด 650 คู่เบสในเพศเมีย เมื่อนำไปพัฒนาเทคนิค SCAR พบว่าจากการทดสอบ 2 SCAR ไพรมเมอร์ด้วย 25 ตัวอย่างที่ทราบและไม่ทราบเพศ โดยให้แถบ ดีเอ็นเอขนาด 571 คู่เบสจำเพาะกับเพศผู้และขนาด 688 คู่เบสจำเพาะกับเพศเมีย ซึ่ง 2 SCAR ไพรมเมอร์เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่น่าเชื่อถือ ไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อมและสามารถใช้ตรวจสอบ เพศในต้นแปะก๊วยได้

เทคนิคอาร์เอพีดีมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้งในพืชและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (William และคณะ, 1990) ซึ่งเทคนิคนี้มีประโยชน์มากมาย ทั้งรวดเร็ว ง่าย ไม่ใช้สารกัมมภาพรังสี และสามารถ ใช้ตัวอย่างจำนวนมาก อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้จะไวต่อสภาพ ความหลากหลายของรูปแบบแถบดี เอ็นเอระหว่างตัวอย่างดีเอ็นเอ และให้หลายตำแหน่งแถบดีเอ็นเอ (multi locus) (Mohan และคณะ, 1997) เทคนิคอาร์เอพีดีเป็น dominant marker ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ในการแยกความแตกต่าง ระหว่างโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ (Ohmori และคณะ, 1996) การเปลี่ยน RAPD marker เป็น SCAR marker จึงสามารถแก้ปัญหานี้ได้ ซึ่ง SCAR marker มีข้อดีหลายอย่างมากกว่า RAPD marker ทั้งคงที่ต่อสภาพ สามารถทำซ้ำได้และให้แถบดีเอ็นเอแถบเดียว (single locus) อีกทั้งไพรมเมอร์ที่ใช้มีความยาวมากกว่า (19-25 คู่เบส) และอุณหภูมิ annealing สูงกว่า จึงทำให้แถบดีเอ็นเอที่ ได้มีความแน่นอนและเชื่อถือ (Paran and Michelmore, 1993; Jiang and Sink 1997) SCAR marker เป็น co-dominant marker ที่มีประโยชน์สำหรับการศึกษาทางพันธุกรรมในการแยกความแตกต่าง เฮเทอโรไซกัสออกจากโฮโมไซกัสได้ (Ohmori และคณะ, 1996) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Truong และคณะ (2011) ที่สามารถหาเครื่องหมายโมเลกุล RAPD และ SCAR ที่เชื่อมโยงกับตำแหน่งของยีน โรครากเน่า (*Frl*) ในมะเขือเทศ โดยพบว่าที่แถบดีเอ็นเอขนาด 480 คู่เบสมีความเชื่อมโยงกับยีน *Frl* ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลนี้จึงสามารถใช้ในการคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่ต้านทาน โรครากเน่าและ ยังใช้คัดเลือกต้นเฮเทอโรไซกัสได้ และ Duan และคณะ (2011) ใช้เทคนิค RAPD และ SCAR หา ความแตกต่างของชนิดของ *Penthorum* คือ *Penthorum sedoides* L. and *Penthorum chinense* Push. เป็นลักษณะ aneuploids ซึ่ง *Penthorum sedoides* L. (2n = 18) and *Penthorum chinense* Push. (2n = 16) ที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมกัน พบแถบดีเอ็นเอขนาด 555 คู่เบสที่จำเพาะเจาะจงกับ *Penthorum sedoides* L. และขนาด 760 คู่เบสที่จำเพาะเจาะจงกับ *Penthorum chinense* Push. แสดงให้เห็นว่าทั้งสองเทคนิคนี้สามารถใช้หาความแตกต่างของชนิดที่มีความใกล้เคียงกันได้

สำหรับแนวทางการหาเครื่องหมายอาร์เอพีดีที่จำเพาะเจาะจงต่อชนิดของไพลและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในไพล โดยหาลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่บ่งชี้ไพลแต่ละชนิด และนำมาเปรียบเทียบเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแถบดีเอ็นเอที่อาจเกี่ยวข้องกับการสร้างสารสำคัญในไพล เพื่อนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดและกระบวนการสร้างสารสำคัญของไพลมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ควรเพิ่มชนิดของไพรเมอร์ให้มากขึ้น เพื่อเป็นการเพิ่มความหลากหลายของไพรเมอร์ที่จะเข้าไปสู่มัจฉับกับบริเวณต่าง ๆ ของจีโนมให้มากขึ้น หรืออย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ก็ให้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับไพลมากในระดับหนึ่ง โดยเฉพาะในเรื่องการบ่งชี้ชนิด และลำดับเบสที่เกี่ยวข้องกับสารสำคัญในไพล

การควบคุมคุณภาพสมุนไพรเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตยานั้นเป็นสิ่งจำเป็นทั้งการตรวจสอบและจำแนกความแตกต่างของพืชสมุนไพรแท้ ชนิดและสารสำคัญ ซึ่งมีเครื่องหมายโมเลกุลมากมายที่เหมาะสมต่อการจำแนกพืชสมุนไพร อีกทั้งข้อจำกัดทางสรรพคุณทางยาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงจำเป็นต้องหาวิธีใหม่ในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพร SCAR เป็นเทคนิคหนึ่งที่จะแสดงแถบดีเอ็นเอเพียงตำแหน่งเดียวจากไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง ซึ่งอาจจะมีหลายซ้ำและกระจายทั่วทั้งจีโนมภายในบริเวณที่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงมีประโยชน์กับการตรวจสอบตัวอย่างปริมาณมากและมีตำแหน่งที่จำเพาะ เช่น เป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกรเบียงต้น (marker assisted screening) เช่น การคัดเลือกรเบียงต้นกล้า เป็นต้น ซึ่งจะช่วยย่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ การตรวจสอบการปลอมปน หรือ แพนที่ยีน เป็นต้น SCAR marker เกิดจากบริเวณพหุสัณฐาน (polymorphism) ที่แตกต่างกันระหว่างชนิดของตัวอย่างที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆ เช่น RAPD และ AFLP เป็นต้น ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้เวลามากและไม่เป็นที่น่าเชื่อถือมากนักแต่ SCAR marker จะทำให้เครื่องหมายโมเลกุลนี้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น และยังสามารถพัฒนาให้สอดคล้องกับปริมาณหรือยีนที่ควบคุมกระบวนการสร้างสารสำคัญของพืชชนิดนั้นๆ ก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งในการควบคุมคุณภาพและการผลิตสมุนไพร โดยเครื่องหมายเหล่านี้จะสามารถเป็นเครื่องมือวัดคุณภาพและปริมาณทั้งชนิดและสารสำคัญในสมุนไพรนั้นๆ โดยสามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่ต้นกล้าซึ่งช่วยย่นระยะเวลา และนำไปใช้พัฒนาการปรับปรุงพืชสมุนไพร รวมถึงการอนุรักษ์อีกด้วย

สรุป

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะเจาะจงต่อไพล 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นไพลที่มีสาร terpinen-4-ol สูง ได้แก่ไพลเหลือง (*Zingiber montanum* ‘Lueng’) และไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* ‘Plooksake’) และกลุ่มที่สองเป็นไพลที่มีสาร terpinen-4-ol ต่ำ ได้แก่ไพลดำ (*Zingiber ottensii*) โดยเทคนิคอาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ 46 ชนิด พบว่าแถบดีเอ็นเอจำนวน 23 แถบจากไพรเมอร์ 16 ชนิด ได้แก่ไพรเมอร์ OPC01, OPC18, OPQ02, OPQ05, OPR01, OPR02, OPR06, OPS02, OPX06, OPY07, OPY11, OPY14, OPZ11, OPZ15, OPZ16 และ OPZ18 ทำให้เกิดการตั้งคราะห์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) ได้ระหว่างไพลทั้ง 2 กลุ่ม จากการนำโคลนที่ได้จากการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างไพลทั้ง 2 กลุ่ม ด้วย 23 SCAR ไพรเมอร์มีเพียง 6 ไพรเมอร์ที่ให้ผลของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอมีความจำเพาะเจาะจงกับไพลแต่ละสายพันธุ์ ดังนี้ ไพรเมอร์ Y07_PY₁₁₂₅ ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลเหลือง ไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅, Y11_PPS₆₂₆, และ Z16_PPS₇₃₀ ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 721, 595 และ 654 คู่เบส ตามลำดับ ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลเหลืองและไพลปลุกเสก และไพรเมอร์ S02_PB₅₅₀ และ X06_PB₈₀₀ ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 465 และ 756 คู่เบส ตามลำดับ ที่จำเพาะเจาะจงกับไพลดำ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพกับประชากรไพลทั้งหมด 20 ตัวอย่างจาก 6 แหล่งในประเทศไทยพบว่ามี 2 ไพรเมอร์คือ ไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅ และ X06_PB₈₀₀ โดยไพรเมอร์ R06_PY₈₇₅ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 721 คู่เบสที่จำเพาะเจาะจงกับ *Zingiber montanum* จากแหล่งต่างๆและ *Zingiber sp.* ทางภาคตะวันตก ที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตากและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไพลดำ (*Zingiber ottensii*) ทางภาคตะวันตก ที่อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี และไพรเมอร์ X06_PB₈₀₀ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 756 คู่เบสที่จำเพาะกับไพลดำ (*Zingiber ottensii*) ทางภาคตะวันตก ที่อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน *Zingiber montanum* จากแหล่งต่างๆและ *Zingiber sp.* ทางภาคตะวันตก ที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ซึ่งทั้ง 2 ไพรเมอร์สามารถตรวจสอบและแยกความแตกต่างระหว่างไพลทั้ง 2 กลุ่มที่มีปริมาณสารสำคัญต่างกันได้ ดังนั้นไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ แต่ไม่พบเครื่องหมายโมเลกุลใดที่สามารถใช้แยกไพลเหลือง (*Zingiber montanum* ‘Lueng’) กับไพลปลุกเสก (*Zingiber montanum* ‘Plooksake’) ได้ และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้พบส่วนดีเอ็นเอที่อาจจะสอดคล้องกับตำแหน่งในจีโนมหรือยีนควบคุมกระบวนการสร้างของสารสำคัญของไพล อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชวลิต สิทธิสมบัติ. 2541. เครื่องเทศและน้ำมันหอมระเหย. ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

นัยดา เกียรติยิ่งอังสุลี, มนต์ หวังหมัด, กมล สวัสดิมงคล และ มงคล โมกขะสมิต. 2522. การศึกษาทางเภสัชวิทยาของสารสำคัญจากไพล. วิทยาศาสตร์การแพทย์. 21(1): 13-23.

ปรีชา ประเทพา, 2543. การคัดเลือกไพโรเมอร์เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายของดีเอ็นเอของพืชสกุลกระเจียวโดยเทคนิค RAPD-PCR. วารสารสงขลานครินทร์. 22(1): 7-13.

ภริตา ต้นสายเพชร. 2554. การวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับไพล 3 ชนิด. ปัญหาพิเศษ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มนต์วี สุริยวานากุลม, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, และปิยะดา ชีระกุลพิศุทธิ์. 2552. การใช้เทคนิค RAPD ในการบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคเหียงเหลืองของมะเขือเทศ. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 14(9): 882-892.

มะลิวัลย์ กอสกุล. 2546. ความผันแปรของสัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยาและรูปแบบดีเอ็นเอของหม่อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2540. พืชเครื่องเทศและสมุนไพร.: โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ

เรวดี วงศาโรจน์. 2539. ไพลสมุนไพรที่มีศักยภาพ. องค์การเภสัชกรรม. 22(1): 15-23.

วาริน วรรณประ โปธิ. 2545. การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรวจสอบยาดราด ยางพวงและยางที่คาดว่าเป็นลูกผสม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิเชียร เองวนิช. 2545. ลักษณะทางสัณฐาน กายวิภาค สรีรวิทยา ผลผลิตและคุณภาพของไพล (*Zingiber spp.*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วันดี กฤษณพันธ์. 2538. สมุนไพรสารพัดประโยชน์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเกษตรวิจิตร
มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศศิธร วสุวัต . 2532. การวิจัยและพัฒนาการรักษาอาการอักเสบชนิดใหม่จากไพล รายงานฉบับที่ 2.
75.

สมภพ ประชานธรรักษ์. 2543. ไพล (*Cassumunar ginger*). จุลสารข้อมูลสมุนไพร. 17(2): 3-8.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 116.

_____. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.

สุรพล แสนสุข. 2543. การศึกษาสัณฐานวิทยา โครโมโซม และละอองเรณูของพรรณไม้วงศ์ขิงใน
อุทยานแห่งชาติภูพาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 201.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2546. เครื่องสำอางจากสมุนไพร.
ซีเอ็ดยูเคชั่น, กรุงเทพฯ.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย.
2548. สารานุกรมพันธุศาสตร์. เท็กซ์แอนด์เจอร์นัลพับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.

เสาวลักษณ์ บัวอิน. 2552. ความหลากหลายทางพันธุกรรม สารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ในไพลและเครือญาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 98.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, สถาบันการแพทย์แผนไทย และ ศูนย์ฝึกอบรมและ
พัฒนาการสาธารณสุข. 2537. ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. กรุงเทพฯ.

อมรา คัมภีรานนท์. 2542. พันธุศาสตร์มนุษย์. เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น. กรุงเทพฯ. 308.

Bua-in, S. and Paisooksantivatana, Y. 2009. Study of clonally propagated cassumunar ginger
(*Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr.) and its relation of wild *Zingiber* species
from Thailand revealed by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**.
57(3): 405-414.

Byeong, C. M., Byung, K. C., Myeong, S. C., Taesook, Y., Yunui, J., Bo, B. K., A, Y. L., and
Ho, K. K. 2010. Rapid molecular authentication of three medicinal plant species,
Cynanchum wilfordii, *Cynanchum auriculatum*, and *Polygonum multiflorum* (*Fallopia*
multiflorum), by the development of RAPD-derived SCAR markers and multiplex-PCR.
Plant Biotechnol Rep 4:1-7

Demeke, T. and Adams, P.R. 1992. The effect of plant polysaccharide and buffer additive on
PCR. **Biotechniques** 12 : 332-334

Duan, C., Mei, Z., Gong, S., and Yu, H. 2011. Genetic Characterization and Authentication
of *Penthorum* Species Using RAPD and SCAR Markers. **Research Journal of Botany** 6: 87-94.

- Godard, G., Francois, J.C.M., Duroux, I., Asseline, U., Chassignol, M., Thuong, N., Helene, C. and Saison-Behomaras, T. 1994. Photochemically and chemically activatable antisense oligonucleotide: comparison of their reactivity toward DNA and RNA target. **Nucleic Acids Research** 22: 4789-4795.
- Grechko, V.V. 2002. Molecular DNA markers in phylogeny and systematics. **Russ. J. Genet.** 38: 851-868.
- Hussain, M.A. and Bedi, Y.S. 2012. Authentication of *Picrorhiza kurrooa* Royle ex Benth. using DNA fingerprint. **International Journal of AgriScience** Vol. 2(6): 511-521.
- Hisatsune, H., Matsumura, K., Ogawa, M., Uemura, A., Kondo, N., Yamashita, JK., Katsuta, H., Nishikawa, .S, Chiba, .T, and Nishikawa, SI. 2005. **A high level of endo-thelial cell-specific gene expression by a combination of 5' flanking region and 5' half of the first intron of VE-cadherin gene.** *Blood* 105 (12):4657-4663
- Huh MK, Bang KH (2006). Identification of *Atractylodes japonica* and *A. macrocephala* by RAPD analysis and SCAR markers. **Silvae Gen.**, 55(3): 101-105.
- Jeenapongsa, R, Yoovathaworn, K. and Sriwatanakul, K. M. 2003. Anti-inflammatory activity of (*E*)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb. **J.Ethnopharmacology** 87: 143-148.
- Jiang, C. and Sink, KC. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus. **Euphytica** 94: 329-333.
- Jourdren, c., Barret, P., Horvais, R., Delourme, R., and Renard, M. 1996. Identification of RAPD markers linked to linolenic acid genes in rapeseed. **Euphytica** 90: 351-357.

- Kumar, L.S. 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. **Biotechnol. Adv.** 17: 143-182.
- Lee, J., Kim, Y., Jo, I., Seo, A., Lee, J., Kim, O., Hyun, D., Cha, S., Bang, K. and Cho, J. 2011. Development of an ISSR-Derived SCAR Marker in Korean Ginseng Cultivars (*Panax ginseng* C. A. Meyer). **Journal of Ginseng Research**. Vol. 35: 52-59.
- Liao, L.Q., J. Liu, Y.X. Dai, Q. Li and M. Xie. 2009. Development and application of SCAR markers for sex identification in the dioecious species *Ginkgo biloba* L. **Euphytica**. 169: 49-55.
- Liu, T., Lin, H., and Wu, R. 2008. Identification of Astragalus medicines using SCAR markers. **J Food Drug Anal** 16(5):57-62.
- Lubbers, E.L., Arthur, L., Hanna, W.W. and Ozias, A.P. 1994. Molecular markers shared by diverse apomictic *Pennisetum* species. **Theor. Appl. Genet.** 89: 636-642.
- Mi, Y. L., Eui, J. D., Chae, H. P., Young, H. K., Eung, S. K., Byong, S. K., and Seung-E, O. 2006. Development of SCAR Marker for Discrimination of *Artemisia princeps* and *A. argyi* from Other *Artemisia* Herbs. **Biol. Pharm. Bull.** 29(4): 629-633.
- Huh, M. K. and Bang, K. H. 2006. Identification of *Atractylodes japonica* and *A. macrocephala* by RAPD analysis and SCAR Markers. **Silvae Genetica** 55(3): 101-105.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Yano, M., Bhatia, C.R. and Takuji, S. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding** 3: 87-103.

- Nicolosi, E., Deng, N.Z., Gentile, A., Malfa, La S., Continella, G. and Tribuloto, E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of importance species as investigated by molecular marker. **Theor. Appl. Genet.** 100 : 115-116.
- Oliveira, M.C., Moto, M., Monte-Corvo, L., Goulao, L., and Silva, M.D. 1999. Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. **Scientia Horticulturae** 79: 163-174.
- Ohmori, T., M. Murata and F. Motoyoshi, 1996. Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the *Tm-1* locus in tomato. **Theor. Appl. Genet.** 92: 151-156.
- Paran I, Michelmore RW. 1993. Development of reliable PCRbased markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theor Appl Genet.** 85: 985-993.
- Penner, G.A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K. Laroche, A., Scoles, G., Monlhar, S. J. and Fedak, G. 1993 Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. **PCR Methods Appl.** 2: 341-345.
- Piyada, T., Nantawan. K., Duangkamol, M., Sumontip. B., and Pranom. C. 2008. Development of species-specific SCAR markers for identification of three medicinal species of *Phyllanthus*. **Journal of Systematics and Evolution** 46 (4): 614–621.
- Ram, J. L., Ram, M. L., and Baidoun, F. 1996. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 44: 2460-2467.
- Sambrook , J., and Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual., 3rd ed, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York.

Sue, P., Grant, L. B., and Bernard, R. B. 1997. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components.

Plant Molecular Biology Reporter. 15 : p.8-15.

Sun, X., Guo, J., Ge, B., and Hang, Y. 2012. Study of specific random amplification of polymorphic DNA- sequence characterized amplified region (RAPD-SCAR) marker for the endangered Chinese endemic herb *Atractylodes lancea*. **Journal of Medicinal Plants Research** Vol. 6 (21): 3774-3780.

Tewtrakul, S. and Subhadhirasakul, S. 2007. Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family. **Journal of Ethnopharmacology** 109: 535-538.

The International Potato Center (CIP). 2002. **Molecular Biology Laboratory Protocols.**

Available Source <http://www.cipotato.org/training/Materials/Molecular/Molecular.htm>, April, 2004.

Theilade, I. 1999. A synopsis of the genus *Zingiber* (Zingiberaceae) in Thailand. Nord. **J. Bot.** 19(4): 389-410.

Theilade, I. and M. L. Maersk Moller. 1991. **Taxonomic and palynological studies on**

Zingiber Boehm. In Thailand and west Malaysia. Cand. Scient. Thesis. University of Aarhus, Denmark.

Triboun, P. 2006. **Doctor of Philosophy Thesis in Biology**, Khon Kaen University, Khon Kaen. 140-144.

- Truong, H. T. H., Tran, H. N., Choi, H. S., Park, P. H., and Lee, H. E. 2011. Conversion of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker UBC#116 linked to *Fusarium* crown and root rot resistance gene (*Frl*) into a co-dominant sequence characterized amplified region (SCAR) marker for marker-assisted selection of tomato. **African Journal of Biotechnology** Vol. 10 (54): 11130-11136
- Truong, H. T. H., Tran, H. N., Choi, H. S., Park, P. H., and Lee, H. E. 2012. Development of a co-dominant SCAR marker linked to the *Ph-3* gene for *Phytophthora infestans* resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Eur J Plant Pathol**.
- William, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.I, Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acid. Res.** 18: 6231-6235.
- Williamson, V.M., Ho, J.Y., Wu, F.F., Miler, N. and Kaloshian, I. 1994. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, *Mi*, in tomato. **Theoretical and Applied Genetics** 87: 757-793.
- Xu, W., Wang, X., and Cui, K. 2004. RAPD and SCAR markers linked to sex determination in *Eucommia ulmoides* Oliv. **Euphytica**. 136: 233-238.



ภาคผนวก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย

1. Luria Bertani agar (LB)

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	10 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 เติมน้ำ 15 กรัม และปริมาตรสุทธิด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละ 15-20 มิลลิลิตร

2. Luria Bertani broth (LB)

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	10 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 และปริมาตรสุทธิด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การเตรียมสารที่ใช้ในการสกัดพลาสมิด

3. Alkaline lysis I

500 mM Glucose	10 มิลลิลิตร
500 mM EDTA pH 8.0	2 มิลลิลิตร
1 M Tris pH 8.0	2.5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	85.5 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

4. Alkaline lysis II

0.2 M NaOH 20 มิลลิลิตรและ 1% SDS 20 มิลลิลิตรซึ่งสารทั้ง 2 นี้ต้องเตรียมก่อนใช้เท่านั้น

5. Alkaline lysis III

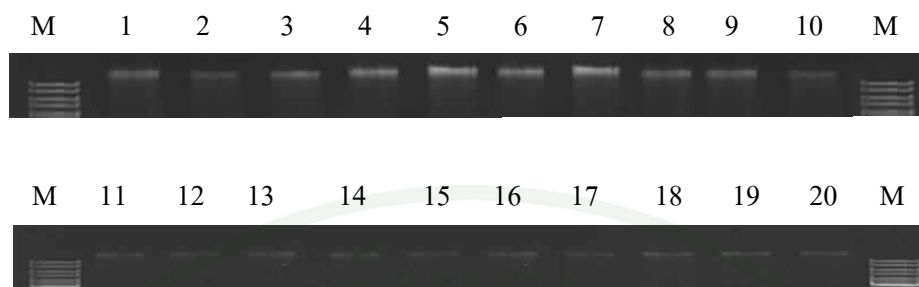
5 M CH_3COOK (potassium acetate 49.07 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร)	60 มิลลิลิตร
glacial acetate	11.5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	28.5 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ 1 ลำดับเบสของอาร์เอพีดีไพรเมอร์

ลำดับที่	ไพรเมอร์	ลำดับเบส
1	OPC-01	TTCGAGCCAG
2	OPC-02	GTGAGGCGTC
3	OPC-07	GTCCCGACGA
4	OPC-09	CTCACCGTCC
5	OPC-12	TGTCATCCCC
6	OPC-14	TGCGTGCTTG
7	OPC-15	GACGGATCAG
8	OPC-18	TGAGTGGGTG
9	OPD-05	TGAGCGGACA
10	OPD-06	ACCTGAACGG
11	OPD-08	GTGTGCCCCA
12	OPQ-02	TCTGTCCGGTC
13	OPQ-05	CCGCGTCTTG
14	OPQ-10	TGTGCCCGAA
15	OPQ-12	AGTAGGGCAC
16	OPR-01	TGCGGGTCCT
17	OPR-02	CACAGCTGCC
18	OPR-06	GTCTACGGCA
19	OPR-11	GTAGCCGTCT
20	OPR-19	CCTCCTCATC
21	OPS-02	CCTCTGACTG
22	OPS-10	ACCGTTCCAG
23	OPT-13	AGGACTGCCA
24	OPT-14	AATGCCGCAG
25	OPT-20	GACCAATGCC

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับที่	ไพรเมอร์	ลำดับเบส
26	OPU-17	ACCTGGGGAG
27	OPV-01	TGACGCATGG
28	OPV-04	CCCCTCACGA
29	OPV-08	GGACGGCGTT
30	OPV-09	TGTACCCGTC
31	OPV-10	GGACCTGCTG
32	OPW-14	CTGCTGAGCA
33	OPW-15	ACACCGGAAC
34	OPX-03	TGGCGCAGTG
35	OPX-06	ACGCCAGAGG
36	OPX-10	CCCTAGACTG
37	OPY-04	GGCTGCAATG
38	OPY-07	AGAGCCGTCA
39	OPY-11	AGACGATGGG
40	OPY-14	GGTCGATCTG
41	OPY-19	TGAGGGTCCC
42	OPZ-10	CCGACAAACC
43	OPZ-11	CTCAGTCGCA
44	OPZ-15	CAGGGCTTTC
45	OPZ-16	TCCCCATCAC
46	OPZ-18	AGGGTCTGTG



ภาพผนวกที่ 1 จีโนมิกดีเอ็นเอของประชากรไพลทั้งหมด 20 ตัวอย่างจาก 6 แห่งในประเทศไทย โดยตัวอย่างเรียงตามลำดับตารางที่ 1 และ gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas) (M)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ	นางสาวกรिता ดันสายเพชร
เกิดวันที่	6 ตุลาคม พ.ศ. 2530
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนา บัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี บัณฑิตวิทยาลัย