



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชสวน)

ปริญญา

พืชสวน

พืชสวน

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหงส์เหินในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค
เอเอฟแอลพี

Genetic Relationships of Globba in Thailand using AFLP Technique

نامผู้วิจัย

นางสาวปิติมา พุ่มพวง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เฉลิมมัลย์ วงศ์ชาวจันทร์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พัชรียา บุญก้อแก้ว, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณัฐ พิษกรรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ _____ เดือน _____ พ.ศ. _____

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหงส์เหินในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

Genetic Relationships of *Globba* in Thailand using AFLP Technique

โดย

นางสาวปิติมา พุ่มพวง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชสวน)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปีติมา พุ่มพวง 2557: ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหงส์เหินในประเทศไทย
โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชสวน) สาขาพืชสวน
ภาควิชาพืชสวน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
เฉลิมมัลย์ วงศ์ชาวจันทน์, Ph.D. 71 หน้า

ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหงส์เหินซึ่งทำการรวบรวมไว้ที่สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ เชียงใหม่ และ โรงเรือน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 45 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) พบไพรเมอร์ชนิด *EcoRI* และ *MseI* จำนวน 10 คู่ จากไพรเมอร์ 15 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้ดี ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และแสดงความแตกต่างของสกุลหงส์เหินแต่ละชนิด โดยพบจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 624 แถบ เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) และสร้างแผนภาพทางพันธุกรรม สามารถแบ่งกลุ่มของสกุลหงส์เหินที่ศึกษาได้ 5 กลุ่มใหญ่ และ 3 กลุ่มย่อย สามารถอธิบายความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างหงส์เหินได้ ซึ่งผลการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลทางดีเอ็นเอส่วนใหญ่สอดคล้องกับการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เคยถูกรายงานมาในงานวิจัยก่อนหน้านี้ เช่น จำนวนรยางค์อับเรณู รูปร่างรยางค์อับเรณู และรูปร่างช่อดอก นอกจากนี้ยังสามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหงส์เหิน *Globba* sp. ต่าง ๆ ที่ทำการเก็บรวบรวมมาศึกษาวิจัยในครั้งนี้ซึ่งยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับรายละเอียดของลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยเทคนิค AFLP สามารถช่วยในการจัดกลุ่มสกุลหงส์เหินในที่ยังไม่มีข้อมูลการจัดกลุ่มอย่างชัดเจนในอดีตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเหล่านี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชสกุลนี้ต่อไปในอนาคต

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Pitima Pumpuang 2014: Genetic Relationships of *Globba* in Thailand using AFLP Technique. Master of Science (Horticulture), Major Field: Horticulture, Department of Horticulture. Thesis Advisor: Assistant Professor Shermarl Wongchaochant, Ph.D.
71 pages.

The genetic relationships among 45 taxa of *Globba* were collected from the Queen Sirikit Botanic Garden, the botanical garden organization, Chaingmai and greenhouse of Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiangmai were investigated using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers. AFLP analysis was performed using *EcoRI* and *MseI* primer combinations. The ten primer combinations of fifteen primer combinations were selected as the suitable primer pairs for successful DNA amplification. In total 624 putative loci were scored. The similarity index and cluster analysis (UPGMA) of the collected taxa were carried out using NTSYS-pc version 2.2 program. The results showed that dendrogram was clustered into five main groups 3 subgroups. The results of phylogenetic relationships based on DNA fragment data among *Globba* taxa in the present study almost all agreed with that inferred from previous classification based on morphological characteristics e.g. anther appendage number, anther appendage shape, and inflorescence bract shape. Moreover, the phylogenetic dendrogram could also use for clarifying genetic relationships among the collected unknown *Globba* sp. in this studies. Therefore, AFLP technique could be the good tool for grouping *Globba* taxa even unknown morphological characteristic taxon. The background genetic information will be really useful for *Globba* breeding program in the future.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เมธมาลย์ วงศ์ชาวจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชรียา บุญก้อแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. ยิ่งยง ไพสุขสานติวัฒนา ผู้ทรงคุณวุฒิซึ่งเป็นผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย และอาจารย์ อาจารย์ ดร.เบญญา มะโนชัย ประธานในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอพระคุณอาจารย์ภาควิชาพืชสวนทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ขอขอบคุณสำนักคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัยในครั้งนี้และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาพืชสวน และห้องปฏิบัติการกลางของคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่เอื้ออำนวยสถานที่สถานที่ปฏิบัติการ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และวัสดุอุปกรณ์ต่าง ตลอดจนสารเคมีในการทดลอง รวมถึงคณาจารย์ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาพืชสวนทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำต่างๆและในกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เล่ม

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวพุ่มพวง ที่ได้อบรมและให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

ปีติมา พุ่มพวง

กรกฎาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	33
สรุปและข้อเสนอแนะ	56
สรุป	56
ข้อเสนอแนะ	57
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	58
ภาคผนวก	63
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	71

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การจัดกลุ่มตามรูปวิธานของพืชสกุลหงส์เหิน ตาม ปิยะเกษตร และคณะ (2555)	8
2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของหงส์เหินชนิดต่างๆ	10
3 ตัวอย่างหงส์เหินจำนวนตัวอย่างสำหรับงานวิจัยซึ่งถูกที่เก็บรวบรวมจากสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ องค์การสวนพฤกษศาสตร์และคณะผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ. เชียงใหม่	23
4 Selective primer ของไพรเมอร์ <i>EcoRI</i> กับ <i>MseI</i> ที่ใช้ในขั้น Selective amplification	30
5 โปรแกรมพีซีอาร์แบบ touch down PCR ในขั้นตอน selective amplification	31
6 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกทั้งหมดไพรเมอร์ 15 คู่	36
7 คู่ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในการทดลอง จำนวน 10 คู่	37
8 แสดงค่า similarity index ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับค่าความคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอหงส์เหิน 45 ตัวอย่าง	47
ตารางผนวกที่	
1 รายชื่อตัวอย่างหงส์เหินที่มีการเปลี่ยนแปลง	64

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงส่วนต่าง ๆ ของสกุลหงส์เหิน	5
2 ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของหงส์เหินจำนวน 45 ตัวอย่าง	33
3 ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบที่เชื่อมต่อกับ adapter	34
4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างหงส์เหิน 45 ตัวอย่าง ในขั้นตอนคัดเลือกลูโพรเมอร์ที่เหมาะสม (selective amplification)	38
5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 1 E-AAC/M-CTA	39
6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 2 E-AAG/M-CTC	39
7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 3 E-ACA/M-CTC	40
8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 4 E-ACA/M-CTG	40
9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 5 E-AGC/M-CTT	41
10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 6 E-ACT/M-CTC	41
11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 7 E-AGC/M-CAA	42
12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 8 E-AGG/M-CAA	42
13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 9 E-ACC/M-CAC	43
14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 10 E-ACT/M-CAA	43
15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 11 E-AGC/M-CTA	44
16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 12 E-AAG/M-CAG	44
17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 13 E-AGG/M-CTT	45
18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 14 E-ACC/M-CTC	45
19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากลูโพรเมอร์ที่ 15 E-ACG/M-CTG	46
20 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหงส์เหินทั้ง 45 ตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA และวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมด้วยวิธี Dice	54
21 การวิเคราะห์ค่า Cophenetic correlation (r) และกราฟการกระจายตัวของตัวอย่างหงส์เหินทั้ง 45 ตัวอย่าง	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่

1	รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 1.1	65
2	รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 1.2	67
3	รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 1.3	68
4	รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 2	68
5	รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 3	69
6	รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 4	69
7	รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 5	70

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหงส์เหินในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค เอเอฟแอลพี

Genetic Relationships of *Globba* in Thailand using AFLP Technique

คำนำ

หงส์เหินเป็นพืชดอกประเภทหัวที่มีมากกว่า 100 ชนิด โดยเป็นสกุลที่มีความหลากหลายมากเป็นอันดับ 3 ของพืชวงศ์ Zingiberaceae (Kress *et al.*, 2002) หงส์เหินมีถิ่นกำเนิดกระจายอยู่บริเวณแถบเอเชีย ตั้งแต่อินเดียไปยังตอนใต้ของจีน ทางใต้และทางตะวันออกของฟิลิปปินส์ และนิวเกินี (Schumann, 1904) โดยมีการกระจายตัวอยู่หนาแน่นที่สุดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศไทย (Larsen, 1996) และพม่า (Kress *et al.*, 2003) โดยมีรายงานว่าสำรวจพบในประเทศไทย ถึง 40 ชนิด ส่วนมากมีดอกสีเหลือง สีขาวและสีม่วง หงส์เหินพบได้ทุกภาคในประเทศไทย มีการเรียกชื่อแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น เช่น ดอกเข้าพรรษา (สระบุรี), กล้วยจี่ก่า (ตาก), กล้วยเครือคำ (เชียงใหม่), วานดอกเหลือง (เลย), และปุดนอย (ภาคใต้) หงส์เหินเริ่มออกดอกตั้งแต่เดือน พ.ค.-ก.ย. โดยจะออกมากในช่วงวันเข้าพรรษา ซึ่งชาวบ้านจะตัดดอกหงส์เหินมาใช้ในประเพณีพิธีตักบาตรดอกไม้ ในวันเข้าพรรษาที่วัดพระพุทธรบาท อ.พระพุทธรบาท จ.สระบุรี (อรรณพ และสุนทร, ม.ป.ป.) จึงเป็นที่มาของชื่อสามัญอีกชื่อหนึ่งว่า “ดอกเข้าพรรษา”

การจำแนกพืชสกุลหงส์เหินนั้น มีข้อมูลการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไป และมีการศึกษาในส่วนของเซลล์วิทยาเพียงบางชนิด (Takano, 2001) ในการจำแนกพันธุ์พืชโดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะภายนอกหรือด้านสัณฐานวิทยา เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่ยยากสลับซับซ้อน แต่บางครั้งก็เกิดความผิดพลาดได้ในกรณีของสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน การตรวจสอบด้วยวิธีนี้อาจไม่สามารถยืนยันได้ ต้องเป็นผู้ที่มีความชำนาญเท่านั้นจึงแยกความแตกต่างได้ อีกทั้งลักษณะต่าง ๆ อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม สภาพพื้นที่ปลูก ปัจจุบันจึงมีการนำเอาเทคนิคทางด้านเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาใช้เพื่อช่วยในการจำแนกหรือตรวจสอบสายพันธุ์ มีการนำเทคนิค Nuclear internal transcribed spacer (ITS) และข้อมูล Plastid *trnK-matK* มาใช้ในการจำแนกสกุลหงส์เหิน และชนิดที่เกี่ยวข้อง (Williams *et al.*, 2004) แต่ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสกุลหงส์เหินที่พบในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลยังไม่ครบถ้วนชัดเจน

งานวิจัยใช้เทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสกุลหงส์เหินในประเทศไทย เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีข้อดีมากกว่าเทคนิคอื่นเพราะไม่ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอ สามารถทำได้รวดเร็ว ทำซ้ำๆ ได้ผลเหมือนเดิม และการทำงานปฏิกิริยาในหนึ่งครั้งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง สามารถทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการวิเคราะห์ dendrogram หรือ phylogenetic tree ทำให้การจำแนกหรือการจัดกลุ่มพืชมีความแม่นยำมากขึ้น และในปัจจุบันเทคนิค AFLP ก็เป็นวิธีการหนึ่งซึ่งประสบความสำเร็จในการใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ Zingiberaceae (Keeratinijakal *et al.*, 2010 และ Kladmook *et al.*, 2010)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อจัดกลุ่มพืชสกุลหงส์เหินจำนวน 45 ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจากภายในประเทศไทย โดยใช้เทคนิคเอฟแอลพี
2. ทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคเอฟแอลพีในการจำแนกพืชสกุลหงส์เหิน



การตรวจเอกสาร

หงส์เหินเป็นพืชดอกประเภทหัวที่มีมากกว่า 100 ชนิด โดยเป็นสกุลที่มีความหลากหลายมากเป็นอันดับ 3 ของพืชวงศ์ Zingiberaceae (Kress *et al.*, 2002) หงส์เหินมีถิ่นกำเนิดกระจายอยู่บริเวณแถบเอเชีย ตั้งแต่อินเดียไปยังตอนใต้ของจีน ทางใต้และทางตะวันออกของฟิลิปปินส์ และนิวกีนิ (Schumann, 1904) โดยมีการกระจายตัวอยู่หนาแน่นที่สุดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะที่ประเทศไทย (Larsen, 1996) และพม่า (Kress *et al.*, 2003) โดยมีรายงานว่าสำรวจพบในประเทศไทย ถึง 40 สายพันธุ์ ส่วนมากมีดอกสีเหลือง สีขาวและสีม่วง หงส์เหินพบได้ทุกภาคในประเทศไทย มีการเรียกชื่อแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น เช่น ดอกเข้าพรรษา (สระบุรี), กล้วยจี่ก่า (ตาก), กล้วยเครือคำ (เชียงใหม่), วานดอกเหลือง (เลย), และปุดนกงู (ภาคใต้) หงส์เหินเริ่มออกดอกตั้งแต่เดือน พ.ค.-ก.ย. โดยจะออกมากในช่วงวันเข้าพรรษา ซึ่งชาวบ้านจะตัดดอกหงส์เหินมาใช้ในประเพณีพิธีตักบาตรดอกไม้ ในวันเข้าพรรษาที่วัดพระพุทธรบาท อ.พระพุทธรบาท จ.สระบุรี (อรรรรณ และสุนทร, ม.ป.ป.) จึงเป็นที่มาของชื่อสามัญอีกชื่อหนึ่งว่า “ดอกเข้าพรรษา”

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลหงส์เหิน ปิยะเกษตร และคณะ (2555)

หงส์เหินเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae (จิง, ข่า) อยู่ในสกุล *Glozza* เป็นพืชที่มีลำต้นใต้ดิน (tuberous rhizome) เหง้า รูปร่างกลมหรือเกือบกลม ราก เรียวยาว อวบน้ำคล้ายกระชาย ลำต้นเหนือดิน เกิดจากกาบใบอัดรวมตัวกัน สูง 10-150 ซม. ใบ เดี่ยว มี 3-13 ใบ แผ่นใบ รูปรี รูปขอบขนาน ปลายใบแหลมถึงเรียวแหลม ฐานใบสอบเรียวหรือรูปหัวใจ หลังใบ ผิวเรียบหรือมีขนสั้น ๆ ก้านใบ สั้นหรือไม่มี ลิ่นใบ แคบ ยาว 1-5 มม. เกือบเรียบหรือมีขน ช่อดอก ออกที่ปลายยอดของลำต้นเหนือดิน ชูตั้งขึ้น เอียงในแนวระนาบ หรือโค้งงอขึ้นพื้นดิน ช่อดอกแบบ ช่อกระจุกแน่น ช่อเชิงลด ช่อกระจุก หรือช่อแยกแขนง ก้านช่อดอกยาวหรือสั้น ผิวเกลี้ยงหรือมีขนสั้น ๆ ในบางชนิดสร้างหน่อย่อยที่โคนช่อดอก ช่อดอกย่อย เรียงเวียนรอบแกนช่อดอก รองรับด้วยใบประดับ ใบประดับ รูปรีหรือรูปไข่ หลุดร่วงง่ายหรือติดทน มีสีหลากหลาย เช่น สีเขียว เหลือง ขาว แดง ชมพู ใบประดับย่อย รูปร่างคล้ายใบประดับ บางชนิดเชื่อมเป็นหลอด หลุดร่วงง่ายหรือติดทน ดอก ขนาดเล็กหลุดร่วงง่าย สีเหลือง สีส้ม หรือสีขาว กลีบเลี้ยง เชื่อมเป็นหลอดที่โคน ปลายแยกเป็น 3 พู ปลายพู่มีลักษณะเป็นติ่ง กลีบดอก เชื่อมเป็นหลอดยาวกว่ากลีบเลี้ยงมาก มีขนสั้น ๆ ทั่วหลอดดอก พูกลีบดอก แผ่กระจายหรือโค้งงอ ขนาดของพู่ใกล้เคียงกัน ปลายของพู่บนมีลักษณะเป็นเคียวโค้งเข้าข้างใน ขอบพับเข้าข้างในคล้ายรูปเรือ กลีบปาก รูปไข่กลับเชื่อมติดกับก้านเกสรเพศผู้เหนือ

เกสรเพศเมียรูปกรวย ผล รูปกลมหรือเกือบกลม ผิวเกลี้ยง เป็นดุ่ม หรือเป็นหนามสั้น ๆ เมื่อ
ออก เมล็ด ขนาดเล็ก สีน้ำตาล (ภาพที่ 1)



ที่มา: ปิยะเกษตร และคณะ (2555)

ที่มา: ปิยะเกษตร และคณะ (2555)

การปลูกและการขยายพันธุ์

ลำต้นหงส์เหินจะเป็นหัวอยู่ใต้ดิน ในการเจริญเติบโตต้องการแสงประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อได้รับน้ำตั้งแต่เดือนมีนาคม และเริ่มออกดอกในเดือน พ.ค.-ก.ย. หลังจากเดือน ก.ย. การเจริญเติบโตของต้นเริ่มลดลง ส่วนของลำต้นเทียมจะเหี่ยวตาย คงเหลือส่วนหัวที่อยู่ใต้ดินจะพักตัวจนถึงเดือน มี.ค.จะเริ่มเจริญเติบโตเป็นต้นต่อไป

การขยายพันธุ์หงส์เหินสามารถทำได้หลายวิธีการเช่น การแยกเหง้า และการเพาะเมล็ด แต่ที่วิธีที่สะดวกรวดเร็วและได้ผลดี คือวิธีการแยกเหง้า โดยการขุดเหง้าใต้ดินในระยะพักตัวประมาณ ช่วงฤดูหนาวเข้าฤดูแล้ง (ลักษณะที่แสดงว่าสามารถเก็บเหง้าได้นั้นสามารถสังเกตจากลำต้นเทียมเหนือดินได้ยุบตัวลงไปแล้ว) นำมาปลิดแยกเหง้าเป็นหัวๆ แล้วลงปลูกในแปลงโดยฝังลึกประมาณ 5 เซนติเมตร ใช้ระยะปลูก 30 x 30 เซนติเมตร วิธีการที่ไม่เหมาะสำหรับการขยายพันธุ์หงส์เหินคือวิธีการแยกหน่อ เพราะหน่อที่แยกมาปลูกจะชะงักการเจริญเติบโตได้ (อรวรรณ และสุนทร, ม.ป.ป.)

วงจรการเจริญของหงส์เหิน วีระอนงค์ (2545)

วงจรการเจริญเติบโตของหงส์เหิน เริ่มการเจริญเติบโตโดยงอกจากหัวข้อที่ผ่านระยะพักตัวแล้วในช่วงเดือนเมษายน ถึงพฤษภาคม ออกดอกในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึง ตุลาคม และพักตัวจากเดือนพฤศจิกายน ถึงเดือนเมษายนหรือพฤษภาคม การเจริญเติบโตเป็นแบบแตกกอโดยมีจำนวนหน่อต่อกอ 3 – 6 หน่อโดยเฉลี่ย ต้นพืชที่เจริญเติบโตจากหน่อที่มีขนาดใหญ่สามารถให้ดอกได้ตั้งแต่ 1 ช่อดอก โดยมีจำนวนช่อดอกต่อกอเฉลี่ย 1 – 6 ช่อ ต้นพืชที่ปลูกจากหัว 1 หัว ให้จำนวนหัวใหม่ต่อกอเท่ากับจำนวนหน่อต่อกอ เนื่องจากต้น 1 ต้นให้หัวใหม่ 1 หัว และได้หัวย่อย 10 – 18 หัวต่อกอโดยเฉลี่ย

การจำแนกทางพฤกษศาสตร์ Kress et al. (2002)

พืชสกุลหงส์เหินอยู่ในสกุล *Globba* เผ่า (tribe) *Globbeae* จัดอยู่ในวงศ์ (family) *Zingiberaceae* วงศ์ย่อย (subfamily) *Zingiberoideae*

การจำแนกและการจัดกลุ่มของพืชสกุลหงส์เหิน

การจำแนกหงส์เหินเริ่มขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1862 Horaninow ใช้จำนวนรยางค์อับเรณูในการจำแนก โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ มีจำนวนรยางค์เท่ากับ 0, 2 และ 4 ซึ่งต่อมอดงานจำแนกมาจากการใช้ลักษณะรยางค์อับเรณูของ Lestiboudois (1841) ในปี ค.ศ. 1904 Schumann ได้จำแนก Genera Globbeae โดยใช้ลักษณะตำแหน่งช่อดอก รยางค์อับเรณู อับเรณู ดอก ใบ ลำต้น ใต้ดิน ช่วงระยะการบานของดอก และการกระจายตัว ออกเป็น 4 Section ได้แก่ Section *Globba* มีสมาชิกในกลุ่ม 100 สปีชีส์ Section *Mantisia* มีสมาชิกในกลุ่ม 4 สปีชีส์ Section *Hemiorchis* มีสมาชิกในกลุ่ม 3 สปีชีส์ และ Section *Gagnepainia* มีสมาชิกในกลุ่ม 3 สปีชีส์

Schumann (1904) ได้แบ่งพืชสกุลหงส์เหินใหม่โดยจำแนกตามจำนวนของรยางค์อับเรณู แบ่งเป็น 3 section คือ *Haplanthera* มีจำนวนรยางค์เท่ากับ 0, *Ceratanthera* มีจำนวนรยางค์เท่ากับ 2 และ *Globba* มีจำนวนรยางค์เท่ากับ 4 นอกจากนี้ยังแบ่งย่อย Section *Ceratanthera* เป็น 3 series จำแนกตามตำแหน่งของรยางค์อับเรณูบนอับเรณู คือ *Basicalcaratae* รยางค์อับเรณูอยู่บริเวณฐานของอับเรณู, *Mediocalcaratae* รยางค์อับเรณูอยู่บริเวณตรงกลางของอับเรณู, และ *Apicalcaratae* รยางค์อับเรณูอยู่บริเวณยอดของอับเรณู แบ่ง section *Globba* เป็น 2 series แบ่งตามลักษณะของใบประดับและ bulbil แต่แบ่งย่อยใน section นี้ ยังไม่ชัดเจนนัก จากนั้น Larsen (1972) จำแนก Section *Nudae* ขึ้นมาสำหรับหงส์เหินทางภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการลดขนาดของใบประดับและใบ มีช่อดังตรง โปรง และยาว ผลมีผิวขรุขระ แต่มีจำนวนรยางค์อับเรณูเท่ากับ 4 เช่นเดียวกับ Section *Globba*

งานวิจัยของ Takano and Okada (2002) เป็นงานวิจัยแรกที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกพืชสกุลหงส์เหิน โดยใช้วิธีการทางชีวโมเลกุล มีการจำแนกดีเอ็นเอจากนิวคลีอัสโดยใช้เทคนิค ITS และดีเอ็นเอจาก chloroplast (*matK* และ *trnK* gene) มีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิคเดียวกันพบว่าสามารถพืชสกุลหงส์เหินแบ่งได้ 7 section และ 2 subsection ได้แก่ Section *Sempervirens*, Section *Nudae* subsection *Mediocalcaretae*, Section *Nudae* subsection *Nudae*, Section *Globba*, Section *Mantisia*, Section *Haplanthera*, Section *Substrigosa* และ Section *Ceratanthera* (Williams et al., 2004)

รูปวิธานจำแนกชนิดหงส์เหิน

ในปี 2555 ปิยะเกษตร และคณะ ได้สร้างรูปวิธานจำแนกชนิดหงส์เหินโดยใช้ลักษณะทาง
สัณฐานวิทยา (ตารางที่ 1) ดังนี้

ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มตามรูปวิธานของพืชสกุลหงส์เหิน ตาม ปิยะเกษตร และคณะ (2555)

กลุ่ม	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ชนิด
A	ไม่มีรยางค์อับเรณู	<i>Globba substrigosa</i> King ex Baker <i>Globba racemosa</i> Sm. <i>Globba sessilifora</i> Sims.
B	รยางค์อับเรณู 2 รยางค์	<i>Globba albiflora</i> Ridl. <i>Globba xantholeuca</i> Craib <i>Globba</i> sp. น้ำพุตกบิลาว <i>Globba leucantha</i> Mig <i>Globba paniculata</i> Valenton <i>Globba pendula</i> Roxb. <i>Globba expansa</i> Wall. Ex Horan
C	รยางค์อับเรณู 4 รยางค์	<i>Globba marantina</i> L. <i>Globba geoffrayi</i> Gagnep. <i>Globba flagellaris</i> K. Larsen <i>Globba</i> sp. น่าน <i>Globba purpurascens</i> Craib <i>Globba nisbetiana</i> Craib <i>Globba fragilis</i> S.N. Lim. <i>Globba</i> sp. แคระ <i>Globba patens</i> <i>Globba atrosanguinea</i> <i>Globba globulifera</i> Gagnep. <i>Globba laeta</i> K. Larsen

ตารางที่ 1 (ต่อ)

กลุ่ม	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ชนิด
C	รยางค์อับเรณู 4 รยางค์	<i>Globba rosea</i> Gagnep. <i>Globba annamensis</i> <i>Globba winitii</i> C.H.Wright <i>Globba magnifica</i> M.F. Newman <i>Globba</i> sp. ต้นสูง <i>Globba williamsiana</i> M.F. Newman <i>Globba colpicola</i> K. Schum <i>Globba schomburgkii</i> Hook. f. <i>Globba reflexa</i> Craib <i>Globba</i> sp. ภูหิน <i>Globba adhaerens</i> Gagnep. <i>Globba</i> sp. หนองคาย <i>Globba siamensis</i> Hemsl

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหงส์เหินบางชนิด

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของหงส์เหินชนิดต่างๆ

ชนิด	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา		จำนวน รยางค์ (รยางค์)	แหล่งอ้างอิง
	ทรงช่อดอก	สีใบประดับ		
<i>Globba adhaerens</i> Gagnep.	กระจุกแยกแขนง	สีขาวหรือ สีชมพูอ่อน	4	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba annamensis</i> Gagnep.	กระจุกแยกแขนง	สีแดง	4	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba barthi</i>	กระจุกแยกแขนง	สีแดง	4	กำป็น, 2541
<i>Globba colpicola</i> K. Schum.	กระจุกแยกแขนง	สีเขียวยอ่อน	4	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba flagellaris</i> K. Larsen	กระจุกแยกแขนง	สีเขียว	4	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba fragilis</i> S.N. Lim	กระจุกแยกแขนง	สีเหลืองอม ส้ม	4	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba geoffrayi</i> Gagnep.	กระจุกแยกแขนง	สีขาว	4	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba globulifera</i> Gagnep.	กระจุกแยกแขนง	สีขาว	4	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba lancangensis</i>	กระจุกแยกแขนง		4	Qian, 1994
<i>Globba leucantha</i> Miq.	กระจุกแยกแขนง	สีขาวอม ม่วง	2	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba marantina</i> L.	เชิงลดคล้าย ช่อกระจุก	สีเขียวยอ่อน	4	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba nisbetiana</i> Craib	กระจุกแยกแขนง	สีเขียว	4	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba obscura</i> K. Larsen	กระจุกแยกแขนง	สีเขียว	4	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba purpurascens</i> Craib	กระจุกแยกแขนง	สีเขียวยอ่อน	4	อารมณ, 2537
<i>Globba pendula</i> Roxb.	กระจุกแยกแขนง	สีเหลืองอม ส้ม	2	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba racemosa</i> Sm.	กระจุกแยกแขนง หูดร้งง่าย	สีเหลืองอม ม่วง	0	ปราโมทย์ และ พัชรียา, 2556
<i>Globba reflexa</i> Craib	กระจะแยกแขนง	สีเขียว	4	อารมณ, 2537

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชนิด	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา			แหล่งอ้างอิง
	ทรงช่อดอก	สีใบประดับ	จำนวน รยางค์ (รยางค์)	
<i>Globba rosea</i> Gagnep.	กระจุก	สีม่วงแดง	4	กัลยา, 2546
<i>Globba schomburgkii</i> Hook.f.	กระจุกแยกแขนง	สีเขียว	4	ปราโมทย์ และ พชรียา, 2556
<i>Globba siamensis</i> Hemsl.	กระจุกแยกแขนง	สีชมพู	4	ปราโมทย์ และ พชรียา, 2556
<i>Globba substrigosa</i> King ex Baker	กระจุกแยกแขนง	สีขาวหรือ สีม่วง	0	ปราโมทย์ และ พชรียา, 2556
<i>Globba villosula</i> Gagnep.	แยกแขนงโค้งลง	สีม่วงอ่อน	4	กำป็น, 2541
<i>Globba winitii</i> C.H. Wright	กระจุกแยกแขนง	สีชมพูอม ม่วง	4	ปราโมทย์ และ พชรียา, 2556
<i>Globba xantholeuca</i> Craib	กระจุกแยกแขนง	สีขาว	2	ปราโมทย์ และ พชรียา, 2556

เครื่องหมาย (marker) ที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สุรินทร์ (2545)

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker)

การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือทางสรีรวิทยา ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะขึ้นกับสภาพแวดล้อม ทำให้ตรวจสอบผลผิดพลาดได้ บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ และต้องมีวิธีอธิบายจีโนไทป์ (genotype) ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ (phenotype)

การจำแนกหงส์เหินโดยใช้สัณฐานวิทยาทั่วไปเริ่มขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1862 Horaninow ใช้จำนวนรยางค์อับเรณูในการจำแนก โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ มีจำนวนรยางค์เท่ากับ 0, 2 และ 4 ต่อมาได้มีการศึกษาเพิ่มเติม โดยใช้ลักษณะตำแหน่งช่อดอก รยางค์อับเรณู อับเรณู ดอก ใบ ลำต้น ใต้ดิน ช่วงระยะการบานของดอก และการกระจายตัว (Schumann, 1904)

การศึกษาในประเทศไทย เนตรวิไล (2548) ได้รวบรวมหงส์เหินที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันได้ 30 ตัวอย่าง จากเขตอำเภอ ดอยสะเก็ด และกิ่งอำเภอแม่ออน จังหวัดเชียงใหม่ ศึกษาความแตกต่างกันของส่วนลำต้น สีของกาบหุ้มต้น ความสูงของต้น การเรียงตัวของใบ รูปร่างใบ ขนาดใบ สีของใบ ลักษณะของช่อดอก ความแตกต่างของกลีบดอก ลักษณะของรยางค์ ลักษณะของผล และการมีหัวย่อย รวมทั้งยังศึกษาทางด้านกายวิยาของหงส์เหินที่เก็บรวบรวมด้วย

2. เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker)

เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

2.1 เครื่องหมายโปรตีน (protein marker)

การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีนใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะ โดยใช้สารที่เหมาะสม เช่น การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนในเลือด โปรตีนสะสมในเมล็ดพืช เป็นต้น นอกจากนี้ยังนิยมตรวจสอบรูปแบบของเอนไซม์บางชนิดหรือไอโซไซม์ต่างๆ ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีน คือ สามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์นี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ codominant ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้

ข้อจำกัดของการตรวจสอบโปรตีนหรือไอโซไซม์ คือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และต้องมีการแสดงของยีนที่ศึกษาจึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้โปรตีนหรือไอโซไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้นานได้ ในแง่ของโอกาสการตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากอัลลีลหรือรูปแบบของยีนที่แตกต่างกันนั้น นิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน หรือบางครั้งแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งแล้วก็ตาม อาจจะไม่มียผลต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลเมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำให้ไม่

สามารถตรวจพบความแตกต่างนั้นๆ ได้ พบว่าการตรวจสอบระดับโปรตีนนี้ตรวจพบความแตกต่างของเครื่องหมายโปรตีนได้เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ของที่เกิดการแทนที่เบสทั้งหมดเท่านั้น ทำให้ผลที่ตรวจสอบได้ พบความแตกต่างต่ำกว่าที่เป็นจริง

ปี 2546 กัลยา ได้ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของพืชสกุลหงส์เหิน 12 ชนิด โดยวิเคราะห์รูปแบบเอนไซม์ทั้งหมด 18 ระบบ พบว่ามีเอนไซม์ 9 ระบบ แสดงรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกัน คือ acid phosphatase (ACP), diaphorase (DIA), esterase (EST), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), leucine aminopeptidase (LAP), malate dehydrogenase (MDH), peroxidase (POX), shikimate dehydrogenase (SKD), และ superoxide dismutase (SOD) เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ทั้ง 9 ระบบร่วมกัน สามารถจัดกลุ่มหงส์เหินได้จำนวน 12 กลุ่มที่ระดับความแตกต่าง 13 เปอร์เซ็นต์ ใช้เอนไซม์ SOD อย่างเดียวไม่สามารถใช้จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้อย่างสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่การจัดกลุ่มโดยใช้เอนไซม์ทั้ง 9 ระบบร่วมกันมีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งสามารถจำแนกได้ 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ หงส์เหินกาบหยก (*Globba* sp.), หงส์เหินละอองดาว (*Globba* sp.), หงส์เหินผีเสื้อ (*G. nuda* K. Lar.), หงส์เหินใบข้าวโพด (*Globba* sp.), หงส์เหินรวงข้าว (*Globba* sp.), หงส์เหินใบไผ่ (*Globba* sp.), หงส์เหินช่อทับทิม (*G. rosea* Gagnep.) และหงส์เหินช่อทับทิมเผือก (*G. candida* Gagnep.) กลุ่ม 2 คือ หงส์เหินดอกจิกก่า (*Globba* sp.) และกลุ่ม 3 ได้แก่ หงส์เหินช่ออำพัน (*G. schomburgkii* Hk.f.) และหงส์เหินช่อชมพู (*Globba* sp.)

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใดๆ ระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นอินหรือไม่ใช่ก็ได้ จะมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้ จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด ครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆ ให้เลือกมากมาย ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวาง ประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้ไม่จำกัด

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งต่างๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนั่นเอง

วิธีตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) ทำได้โดยการหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ การใช้ดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตมีที่มาจากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งปัจจุบันนี้ก็ยังใช้อยู่ โดยมีความคาบเกี่ยวกันอยู่

เทคนิคโมเลกุลเครื่องหมาย

ด้วยหลักการของเทคนิคโมเลกุลเครื่องหมาย โมเลกุลเครื่องหมายถูกแบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ hybridization-based marker และ PCR-based marker (อรรรัตน์, 2548)

1. Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายแบบดั้งเดิมที่มีมาก่อน ซึ่งต้องอาศัยเทคนิค DNA hybridization วิธีการสร้างเครื่องหมายชนิดนี้ ที่รู้จักกันดีคือ Restriction Fragment Length Polymorphism หรือ RFLP (อรรรัตน์, 2548)

เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism)

เป็นวิธีที่ใช้แยกความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอ ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) (สุรินทร์, 2552) การสร้างเครื่องมืออาร์เอฟแอลพีต้องมีโพรบ (probe) ได้แก่ 1) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนมที่ศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วโคลนเก็บไว้ในเวกเตอร์ (cloning vector) ซึ่งส่วนมากนิยมใช้ plasmid หรือ 2) cDNA library cDNA เป็น complementary DNA ของ mRNA ที่ได้จากยีนที่มีการแสดงออกในสภาพแวดล้อมหนึ่ง เมื่อยีนสร้าง mRNA สามารถแยกสกัด mRNA ออกจากเซลล์แล้วเปลี่ยนให้เป็น cDNA ได้ด้วยกระบวนการ reverse transcription หรือ 3) repetitive DNA

ความแตกต่างหรือ polymorphisms ของ RFLP ที่ปรากฏเป็นลักษณะของขนาดชิ้นส่วน ดีเอ็นเอแตกต่างกัน (length polymorphisms) ซึ่งหลักการพื้นฐานของการเกิด RFLP คือความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอในจีโนมที่ศึกษา ความแตกต่างของดีเอ็นเอนี้เป็นผลจากดีเอ็นเอกลายพันธุ์นั่นเอง ซึ่งอาจเป็น DNA deletion หรือ DNA insertion หรือ point mutation ก็ได้ RFLP probe ที่ใช้อาจเป็น microsatellite DNA ก็ได้ (อรรถรัตน์, 2548)

2. PCR-based marker อาศัยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ปฏิกิริยา PCR ใช้เอนไซม์ DNA polymerase และดีเอ็นเอสังเคราะห์ชิ้นสั้นๆ (10-24 นิวคลีโอไทด์) เรียกว่า ไพรมเมอร์ เพื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการ (อรรถรัตน์, 2548)

2.1 เครื่องหมาย RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (สุรินทร์, 2545)

RAPD เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์อีกแบบหนึ่ง โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอ เป้าหมายเนื่องจากไพรมเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) วิธีการนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่นๆ ได้อีก เช่น Arbitrarily Primed PCE (AR-PCR), DNA Amplification Fingerprinting (DAF) หรือ Multiple Arbitrarily Amplicon Profiling (MAAP) ซึ่งแต่ละวิธีที่เรียกนี้มีชื่อแตกต่างกันบ้าง คือ ขนาดของไพรมเมอร์ที่ใช้แต่หลักการไม่แตกต่างกัน คือ ใช้ไพรมเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียว เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม มีนักวิจัยบางกลุ่มใช้ไพรมเมอร์ 2 ชนิด พร้อมกันซึ่งก็ใช้ได้เช่นเดียวกัน แต่ที่นิยม คือ ใช้ไพรมเมอร์เพียงชนิดเดียว และใช้วิธีแบบที่เรียกว่าอาร์เอฟดีซึ่งตั้งขึ้นโดย William และคณะในปี ค.ศ.1990 โดยใช้ไพรมเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจลและย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอทیدیยมโบรไมด์

อย่างไรก็ตาม โพลีมอร์ฟิซึมของอาร์เอฟดีมักเกิดขึ้นในลักษณะการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอของพืชพบทั้งจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์อาร์เอฟดี แถบดีเอ็นเอเครื่องหมายอาร์เอฟดี (RAPD Marker) ส่วนใหญ่จึงมาจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส ซึ่งมีการถ่ายทอดมาจากทั้งฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่ แม้ว่าเทคนิคอาร์เอฟดีจะทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่ก็มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ บางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิม เนื่องจาก

อาร์เอพีดีมีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะต่างๆ จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากอาร์เอพีดียังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างไฮโมโซโกตและเฮเทอโรโซโกตได้

2.2 เครื่องหมาย AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

เป็นเทคนิคประยุกต์ของพีซีอาร์แบบหนึ่ง ซึ่งเทคนิค AFLP นี้ได้รวมเอาข้อดีของ 2 เทคนิคเข้าด้วยกัน คือ เอาความน่าเชื่อถือของเทคนิค RFLP รวมกับประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งเทคนิคเอเอฟแอลพีนี้พัฒนาขึ้นโดย Zabeau and Vos นักวิจัยของบริษัท Keygene N.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ และได้จดสิทธิบัตรในปี ค.ศ. 1993 (สุรินทร์, 2552) เป็นเทคนิคที่รวมเอาเทคนิค AFLP และเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) เข้าด้วยกัน เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นเอาดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ตามด้วยการเชื่อมต่อดัวย adapter ที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอ ที่ปลายของ adapter อีกข้างหนึ่งที่ไม่ได้เชื่อมกับอะไรจะเป็นที่สำหรับเกาะของไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นมานี้จะมีลำดับเบสเหมือนกับส่วนของ adapter ที่เชื่อมกับปลายของชิ้นดีเอ็นเอ ส่วนปลายด้าน 3' ของไพรเมอร์มีลำดับเบสที่เป็นส่วนตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ และเมื่อเพิ่มเบส 2-3 เบส เข้าที่ปลายด้าน 3' ของไพรเมอร์นี้ เพื่อให้เกิดการเลือกจับได้เฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้น ดังนั้นชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ จะมีเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ติดกับบริเวณจดจำของเอนไซม์เข้าคู่ได้กับไพรเมอร์ที่เลือกใช้นั้น จากนั้นจึงนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ในโพลีอะคริลาไมด์เจล ชนิดที่เป็น denaturing หรือ non-denaturing polyacrylamide gel วิธีนี้สามารถใช้แยกความแตกต่างได้โดยพิจารณาจากขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (Vos and Kuiper, 1997)

หลักการทำเอเอฟแอลพี สุรินทร์ (2552)

ขั้นแรก คือ การนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด นิยมใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ $4^6 (= 4,096)$ คู่เบส เรียกว่า Rare cutter ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ $4^4 (= 256)$ คู่เบส เรียกว่า frequent cutter แล้วเชื่อมต่อดีเอ็นเอ adapter ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด เพื่อให้เป็นที่ยึดของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้นต่อไป

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดจะทำให้ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอพอเหมาะ และมีข้อดีอีกหลายประการ ดังนี้

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น frequent cutter จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นขนาดเล็กซึ่งจะเพิ่มปริมาณได้ดีในการทำพีซีอาร์และอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับแยกตัวด้วยวิธี อิเล็กโตรโฟริซิส โดยใช้ denaturing polyacrylamide gel

2. เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น rare cutter มีตำแหน่งที่จะตัดดีเอ็นเอได้น้อยจึงช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจากการทำพีซีอาร์ลง เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมดหรือเกือบทั้งหมดเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่เป็น rare cutter และอีกด้านหนึ่งเป็น frequent cutter ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทั้ง 2 ด้านเป็นตำแหน่งของเอนไซม์แบบ frequent cutter เมื่อเชื่อมต่อกับ adapter แล้วจะมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำ (inverted repeat) เมื่อถูกทำให้เสียสภาพเป็นสายเดี่ยวจะสามารถกลับมาจับกันเองโดยเบสคู่สม เกิดเป็นโครงสร้างแบบ stem-loop ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้ามาจับได้ ส่วนชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ที่เป็น rare cutter ทั้ง 2 ด้านมักจะมีขนาดใหญ่มาก จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในสภาวะที่ใช้ทดลอง

3. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดในการทำพีซีอาร์ จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดเช่นเดียวกัน ทำให้สามารถเลือกติดฉลากที่ไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ ดังนั้น จึงมีดีเอ็นเอที่ติดฉลากเพียงสายเดียว เมื่อนำไปแยกขนาดโดย denaturing polyacrylamide gel ดีเอ็นเอทั้ง 2 สายอาจจะเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางไม่เท่ากัน เกิดเป็นแถบดีเอ็นเอ 2 แถบคู่กัน (double) การวิเคราะห์ผลจึงยุ่งยาก ในกรณีที่มีการติดฉลากเพียงสายเดียว จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวทำให้วิเคราะห์ได้ง่ายขึ้น

4. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ช่วยให้การปรับจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณมีความยืดหยุ่นดี โดยปรับจำนวนเบสเพื่อคัดเลือกที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน

5. สามารถทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้จำนวนมาก โดยใช้คู่ผสมของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด จำนวนน้อย เช่น มีไพรเมอร์ชนิดละ 5 แบบ จากการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ถึง 25 แบบ เป็นต้น

การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะอาจใช้ชนิดที่เป็น rare cutter ทั้ง 2 ชนิดก็ได้ แต่จะตรวจพบชิ้น

ดีเอ็นเอจำนวนน้อยเฉพาะชิ้นที่มีขนาดเล็กเท่านั้น เพราะชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเพิ่มปริมาณได้ดีกว่าจึงไม่ค่อยนิยม

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ได้มีหลายชนิด เช่น *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BglI*, *XbaI* (6-cutter) และ *Sse 8387I* (8-cutter) ร่วมกับ *MseI* หรือ *TaqI* ซึ่งเป็น 4-cutter เอนไซม์ *MseI* มีตำแหน่งจดจำเป็น 5'-TTAA-3' และ *TaqI* มีตำแหน่งจดจำเป็น 5'-TCGA-3'

ดีเอ็นเอของยูคาริโอตส่วนใหญ่จะมีองค์ประกอบเป็นเบส A และ T จำนวนมาก (AT rich) เอนไซม์ *MseI* จึงตัดเอนไซม์ได้ขนาดเล็กกว่าเอนไซม์ *TaqI* เมื่อใช้เอนไซม์ *TaqI* ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มักไม่ค่อยสม่ำเสมอ จะปรากฏเป็นแถบขนาดใหญ่ซึ่งอยู่ส่วนบนของเจล ดังนั้นจึงนิยมใช้เอนไซม์ *MseI* มากกว่า เพราะตัดดีเอ็นเอ ได้ขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ และการแยกโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วนเอนไซม์ที่เป็น rare cutter ใช้ได้ทั่วไป แต่ที่ใช้เอนไซม์ *EcoRI* กันมาก เนื่องจากมีราคาถูกและการตัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดี โดยมีโอกาสพบการตัดไม่สมบูรณ์ได้น้อย

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ได้กับ adapter สามารถทำพร้อมกันได้ เนื่องจาก adapter ที่สังเคราะห์ขึ้นมานั้น ออกแบบให้มีปลายที่เป็นดีเอ็นเอสายเดียวมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลายเหนียวของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ แต่เบสคู่ที่อยู่ในตำแหน่งถัดมาเป็นเบสคนละชนิดกับเบสที่บริเวณจดจำของเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อ adapter เข้าไปเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอแล้ว เอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะไม่สามารถตัดได้อีก แต่ถ้าชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดเชื่อมต่อกลับไปใหม่จะสามารถตัดได้อีก การเชื่อมต่อ adapter โดยมีเอนไซม์ตัดจำเพาะอยู่ด้วยจึงไม่มีผลเสียใดๆ และยังช่วยให้การตัดดีเอ็นเอเกิดได้สมบูรณ์อีกด้วย

ขั้นที่สอง คือ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5' เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' อีกส่วนหนึ่งเพื่อให้เกิดการคัดลอกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วน ส่วนของไพรเมอร์ที่เหมือนกับ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์เรียกว่า common part ส่วนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' เรียกว่า selective part จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้ต้องมีลำดับเบสที่อยู่ต่อกับตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป

ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกรวมมากขึ้น จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจะลดลงประมาณ 4 เท่าต่อทุก ๆ เบสที่เพิ่มขึ้น ในการศึกษาจีโนมขนาดเล็กหรือโคลนที่อยู่ในพลาสมิด คอสมิด หรือ BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ไม่จำเป็นต้องเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกรวมเนื่องจากจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีจำนวนน้อยอยู่แล้ว สิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็กไม่ใหญ่มาก เช่น แบคทีเรียหรือเชื้อรา จะเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกรวม 1-2 เบส ส่วนพวกที่มีจีโนมขนาดใหญ่จะเพิ่มเบสมากกว่า 2 เบสที่ไพรเมอร์ทั้งสองชนิด ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกรวมที่ปลาย 3' จะเรียกว่าเป็น ไพรเมอร์ +1, +2, +3 และ +4 ตามลำดับ เช่น ไพรเมอร์ทางปลาย *EcoRI* adapter จะเรียกว่า *EcoRI*+1, *EcoRI*+2, *EcoRI*+3 และ *EcoRI*+4 เป็นต้น

การทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3' มากกว่า 2 เบส จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification และการทำ PCR ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification

การทำปฏิกิริยา preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้น และช่วยให้เกิดการคัดเลือกรวมเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกต้อง มีการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพียงครั้งเดียวโดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกรวม +1, +2, +3 และ +4 เบสตามลำดับ พบว่าจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ลดลงเป็นลำดับจากการใช้ไพรเมอร์แบบ +1, +2 และ +3 แสดงถึงประสิทธิภาพในการคัดเลือกรวมที่ถูกต้อง แต่ไพรเมอร์ +4 ให้ผลไม่สอดคล้องกัน สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอจำนวนมากที่ไม่ตรงกับแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ +1, +2 และ +3 แสดงว่าเกิดการจับคู่ของเบสที่ไม่ถูกต้อง (mismatch) ในตำแหน่งที่อยู่ห่างจากปลาย 3' 3 เบสหรือเบสคัดเลือกรวมตัวแรกที่อยู่ติดกับตำแหน่งตัดจำเพาะนั่นเอง ในการทดลองต่อมาพบว่าการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกรวมครั้งเดียว 3 เบสก็ทำให้เกิดการจับคู่ที่ไม่ถูกต้องของเบสที่เพิ่มขึ้นตัวแรกสุดได้เช่นเดียวกัน แต่เกิดในความถี่ต่ำ ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกรวมตั้งแต่ 3 เบสขึ้นไปจึงต้องใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ครั้ง โดยครั้งแรกใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกรวมเพียง 1-2 เบส และครั้งที่ 2 จึงใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกรวมต่อจากไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในครั้งแรกอีก 1-2 เบส รวมเบสที่เพิ่มเพื่อคัดเลือกรวม 3-4 เบสตามที่ต้องการ

การทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 ขั้นตอน นอกจากเป็นการประกันว่าการคัดเลือกรวมเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไปอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุดแล้ว ยังช่วยลด background ที่เป็นพื้นค่าในลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย นอกจากนี้ยังอาจทำ preselective amplification โดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่มีเบสคัดเลือกรวม (ไพรเมอร์ +0) ได้ในกรณีการวิเคราะห์จีโนมขนาดเล็กที่ต้องใช้

ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกร้านน้อย เพื่อให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้น และสามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนขึ้น

ขั้นสุดท้าย คือ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel แบบเดียวกับที่ใช้หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการแยกโดยวิธีนี้อยู่ในช่วง 50 – 100 แถบ การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใช้วิธีติดฉลากไพรเมอร์ ชนิดใดชนิดหนึ่งด้วยสารกัมมันตรังสี หลังจากทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเสร็จแล้ว ตรวจสอบโดยการทำอโตเรดิโอกราฟ หรืออาจใช้วิธีติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) แล้วตรวจสอบโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (automated sequencer) ก็ได้ จากการที่ต้องตรวจสอบผลการทำเอเอฟแอลพีโดยใช้สารกัมมันตรังสีหรือใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ ทำให้เกิดข้อจำกัดในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง เนื่องจากขาดประสบการณ์และระบบการปฏิบัติงานที่ใช้สารกัมมันตรังสีหรือไม่สามารถซื้อเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติที่มีราคาแพงได้ จึงมีการประยุกต์ใช้วิธีตรวจสอบเอเอฟแอลพีด้วยการไฮบริไดเซชันโดยใช้โพรบ (probe) ที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี (non radioactive label) หรือวิธีย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (silver staining) ซึ่งให้ผลเป็นที่น่าพอใจและสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทางดีเอ็นเอทั่วไป

การจำแนกพืชสกุลหงส์เหินโดยเครื่องหมายโมเลกุลระดับดีเอ็นเอ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกพืชในวงศ์ Zingiberaceae โดยใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม มีการจำแนกดีเอ็นเอจากนิวเคลียสบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์ (*matK*) เริ่มจาก Kree *et al.* (2002) ได้แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 Siphonochiloideae มี 1 tribe คือ Siphonochileae)

กลุ่มที่ 2 Tamijioideae มี 1 tribe คือ Tamijieae

กลุ่มที่ 3 Alpinioideae มี 2 tribe ได้แก่

- Alpinieae มี 16 สกุล

- Riedelieae มี 4 สกุล

สกุล *Siliquamomum* ยังไม่สามารถจัดรวมอยู่ใน tribe ใดได้

กลุ่มที่ 4 Zingiberoideae มี 2 tribe ได้แก่

- Zingibereae มี 25 สกุล

- Globbeae มี 4 สกุล

สกุล *Caulokaempferia* ยังไม่สามารถจัดรวมอยู่ใน tribe ได้

ต่อมาการจำแนกโดยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอวิธีนี้ได้มีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น ในวงศ์ย่อย Alpinioideae tribe Alpinieae มีศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Alpinia* สามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มด้วยกัน (Kress *et al.*, 2002) และพืชสกุล *Amomum* สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ และยังทราบว่า พืชสกุล *Paramomum* มีความใกล้ชิดกับสกุล *Elettariopsis* บ่งบอกว่ามีความสัมพันธ์กันในทางวิวัฒนาการหรือมีบรรพบุรุษร่วมกับสกุล *Amomum* ซึ่งอยู่ใน tribe เดียวกัน (Xia *et al.*, 2004)

กลุ่ม Zingiberoideae ใน tribe Zingibereae พบรายงานการศึกษาลำดับดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์ส่วน *petA-psbJ* พืชสกุล *Boesenbergia* ในประเทศไทย แบ่งเป็นสองกลุ่มย่อย และพบสกุล *Boesenbergia* ที่มีบรรพบุรุษร่วมหนึ่งมาหนึ่งสาย (monophyletic) ส่วนพืชสกุล *Kaempferia* เป็นอีกสกุลที่ศึกษาลำดับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ในส่วน *psbA-trnH* และ *petA-psbJ* (Techaprasan *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังมีพืชสกุล *Caulokaempferia* ที่ไม่สามารถจัดไว้ใน tribe Zingibereae หรือ Globbeae ดวงกลมและคณะ (2548) ได้วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ไรโบโซมดีเอ็นเอ บริเวณ internal transcribed spacer (ITS-1, 5.8S และ ITS-2) พบว่า *Caulokaempferia* ชนิดที่มีดอกสีเหลืองอยู่ในกลุ่มเดียวกันแยกออกจากพืชอื่นในกลุ่ม Zingiberoideae ในขณะที่ชนิดที่มีดอกสีม่วงถูกจัดแยกออกไปจากกลุ่มดอกสีเหลือง

มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกพืชใน tribe Globbeae โดยใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม มีการจำแนกดีเอ็นเอจากนิวเคลียสโดยใช้เทคนิค ITS และดีเอ็นเอจาก chloroplast (*matK*) แบ่งได้ 7 Section และ 2 subsection ได้แก่ Section *Sempervirens*, Section *Nudae* subsection *Mediocalcaretae*, Section *Nudae* subsection *Nudae*, Section *Globba*, Section *Mantisia*, Section *Heplanthera*, Section *Substrigosa* และ Section *Ceratanthera* (Williams *et al.*, 2004)

สำหรับการใช้เทคนิคโมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการจัดจำแนกพืชในวงศ์ Zingiberaceae นั้น Vanijajiva *et al.* (2005) ใช้เทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสกุล *Boesenbergia* กับสกุลที่เกี่ยวข้องในประเทศไทย พบว่า *Boesenbergia* ความสัมพันธ์ความใกล้ชิดสกุล *Scaphochlamys* มากกว่าสกุล *Kaempferia* และเทคนิค

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ได้นำมาใช้ในสกุล *Boesenbergia* เช่นกัน จากการศึกษาพบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Techaprasan *et al.*, 2008) นอกจากนี้ AFLP ยังนำมาใช้จำแนกสายพันธุ์ข่า (*Alpinia galanga* (L.) Willd.) สามารถจัดจำแนกตัวอย่างข่าออกเป็น ข่าพันธุ์ปลูกที่มีเหง้าสีแดง ข่าพันธุ์ปลูกที่มีเหง้าสีขาว และข่าที่เป็นสายพันธุ์ป่า (กฤษณา, 2548) แต่สำหรับพืชสกุลหงส์เหิน (*Globba*) ยังไม่พบการนำเทคนิค AFLP มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม



อุปกรณ์และวิธีการ

การรวบรวมตัวอย่างพืช

ใช้ตัวอย่างแห้งที่เก็บรวบรวมโดยสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ และสถานที่เก็บรวบรวมของโรงเรียนของสาขาพืชสวนระดับ ภาควิชา พืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ. เชียงใหม่ รวมทั้งหมด 45 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างแห้งที่เก็บรวบรวมสำหรับงานวิจัยซึ่งถูกที่เก็บรวบรวมจากสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ และคณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ. เชียงใหม่

ลำดับที่	ตัวอย่าง	สถานที่เก็บรวบรวม
1	<i>Globba obscura</i> K. Larsen	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์
2	<i>Globba racemosa</i> Sm.	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์
3	<i>Globba</i> sp. No.1	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์
4	<i>Globba barthei</i> Gagnep.	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์
5	<i>Globba albiflora</i> Ridl.	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์
6	<i>Globba laeta</i> K. Larsen	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์
7	<i>Globba tricolor</i> Ridl.	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์
8	<i>Globba flagellaris</i> K. Larsen	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
9	<i>Globba paniculata</i> Valenton	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
10	<i>Globba adhaerens</i> Gagnep. No.1	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
11	<i>Globba adhaerens</i> Gagnep. No.2	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
12	<i>Globba sessiliflora</i> Sims.	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
13	<i>Globba reflexa</i> Craib	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
14	<i>Globba williamsiana</i> M.F. Newman	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
15	<i>Globba</i> sp. No.2	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
16	<i>Globba nisbetiana</i> Craib	มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับที่	ตัวอย่าง	สถานที่เก็บรวบรวม
17	<i>Globba</i> sp. No.3	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
18	<i>Globba siamensis</i> Hemsl No.1	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
19	<i>Globba pendula</i> Roxb.	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
20	<i>Globba yeatsiana</i> Craib	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
21	<i>Globba rosea</i> Gagnep. No.1	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
22	<i>Globba purpurascens</i> Craib	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
23	<i>Globba cernua</i> Baker	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
24	<i>Globba</i> sp. No.4	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
25	<i>Globba villosula</i> Gagnep.	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
26	<i>Globba expansa</i> Wall. Ex Horan	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
27	<i>Globba schomburgkii</i> Hook. f.	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
28	<i>Globba</i> sp. No.5	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
29	<i>Globba geoffrayi</i> Gagnep.	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
30	<i>Globba fragilis</i> S.N. Lim.	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
31	<i>Globba</i> sp. No.6	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
32	<i>Globba</i> sp. No.7	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
33	<i>Globba</i> sp. No.8	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
34	<i>Globba</i> sp. No.9	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
35	<i>Globba magnifica</i> M.F. Newman	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
36	<i>Globba xantholeuca</i> Craib	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
37	<i>Globba siamensis</i> Hemsl. No.2	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
38	<i>Globba leucantha</i> Mig.	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
39	<i>Globba rosea</i> Gagnep. No.2	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
40	<i>Globba</i> sp. No.10	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
41	<i>Globba marantina</i> L.	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
42	<i>Globba substrigosa</i> King ex Baker	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
43	<i>Globba colpicola</i> K. Schum	มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ตารางที่ (ต่อ)

ลำดับที่	ตัวอย่าง	สถานที่เก็บรวบรวม
44	<i>Globba globulifera</i> Gagnep.	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
45	<i>Globba winitii</i> C.H.Wright	มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค AFLP

1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของหงส์เหิน

การสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างใบหงส์เหินใช้ชุดสกัดของ DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) โดยมีขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอดังนี้

ชั่งตัวอย่างใบหงส์เหินที่ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป ให้ได้น้ำหนัก 0.08 กรัม นำมาบดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว เติมสารละลาย AP1 buffer 400 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ RNase 4 ไมโครลิตร นำไปบดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เมื่อครบเวลานำมาเติมสารละลาย AP2 buffer 130 ไมโครลิตร และแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที คัดสารละลายใส่ลงในคอลัมน์สีม่วง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ย้ายสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ (ปริมาตรประมาณ 450 ไมโครลิตร) เติมสารละลาย AP3/E buffer 1,000 ไมโครลิตร ผสมสารละลายเข้ากันโดยใช้ปิเปต แล้วดูดมา 700 ไมโครลิตร นำไปใส่ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง คัดสารละลายที่เหลือลงในคอลัมน์เดิม ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ย้ายคอลัมน์ไปหลอดขนาด 2 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมสารละลาย AW buffer 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์เดิม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง เติมสารละลาย AW buffer 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์เดิม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (ระวังอย่าให้สารละลายที่ผ่านคอลัมน์ สัมผัสกับคอลัมน์) เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง นำคอลัมน์วางลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เติมสารละลาย AE buffer 50 ไมโครลิตร นำไปบดที่อุณหภูมิห้อง เป็น

เวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านคอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

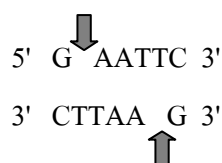
การวัดคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยเตรียมอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้อะกาโรส 0.4 กรัม ใน 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปละลายด้วยเตาอบไมโครเวฟจนกระทั่งผงอะกาโรสหลอมละลายจนหมด รอให้อะกาโรสอุ่นลงแล้วเทลงในถาดเจลที่มีหัวเสียไว้ แล้วปล่อยให้เย็นจนกระทั่งเจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึงหัวออกย้ายเจลที่ได้ลงใน horizontal chamber โดยให้ด้านที่มีช่องหัวอยู่ด้านซ้าย แล้วเท 1X TAE buffer ลงจนท่วมแผ่นเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างกับ loading buffer (6X loading buffer: 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วค่อยๆ หยดตัวอย่างลงในช่องหัวด้วยไมโครปิเปตต์ ปิดฝาเครื่องแล้วเปิดกระแสไฟฟ้า ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ และปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของโหลด loading buffer เคลื่อนที่ไปได้ระยะทางที่เหมาะสม นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลาย 3X gel red เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 นาโนกรัม แล้วบันทึกภาพ

3. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย AFLP

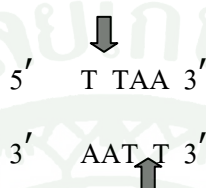
3.1. เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ

3.1.1 ใช้วิธีการของ Vos และคณะ (1995) เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) โดยนำดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดมาตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จำนวน 2 ชนิด คือ *EcoRI* และ *MseI* เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณในการทำพีซีอาร์ได้ และมีขนาดเหมาะสมในการแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในโพลีอะครีลาไมด์เจล

โดยที่ *EcoRI* มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบสและมีจุดตัดดังนี้

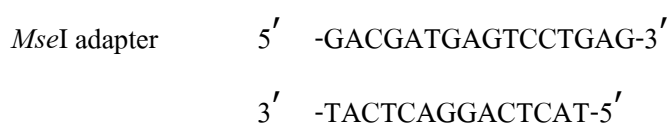
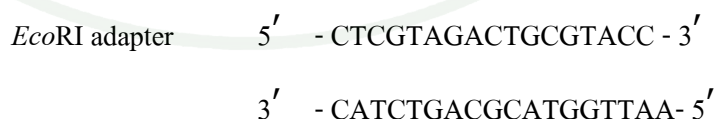


ส่วน *MseI* นั้นมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบสและมีจุดตัดดังนี้



โดยเติมดีเอ็นเอและสารละลายแต่ละชนิดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่าปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด คือ *EcoRI* ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และ *MseI* 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วให้ได้ 25 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

3.1.2 เชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับการเพิ่มปริมาณ โดย adapter ที่ต่อเข้ากับปลายของชิ้นดีเอ็นเอ จะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งจับเกาะของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ ซึ่ง adapter ที่ใช้ คือ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter มีลำดับเบสดังนี้



การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter นั้น ทำโดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิดแล้ว มาเติมสารต่างๆ ดังนี้ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 25.0 ไมโครลิตร *EcoRI* adapter (5 พิโคต่อไมโครลิตร) 1.0 ไมโครลิตร *MseI* adapter (25 พิโคต่อไมโครลิตร) 2.0 ไมโครลิตร 5x T4 ligase buffer 10.0 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 1.0 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 11.0 ไมโครลิตร โดยมีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายใส่ลงในหลอดใหม่ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำมาละลายใน TE buffer ปริมาตร 90 ไมโครลิตร แล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์

3.2.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัว ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ (preselective amplification) ได้แก่

EcoRI primer + 1 (E-A) 5' GACTGCGTACCAATTCA 3' และ
MseI primer + 1 (M-C) 5' GATGAGTCCTGAGTAAC 3'

เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ และให้มีความจำเพาะในขั้นหนึ่งก่อน โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางในขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อกับ adapter แล้ว ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมนลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส) เติมนำสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ *EcoRI* + A กับ *MseI* + C (5 พิโคต่อไมโครลิตร) อย่างละ 1 ไมโครลิตร เติมนำสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 2.50 ไมโครลิตร dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 2.50 ไมโครลิตร สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (50 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วให้ได้ 25 ไมโครลิตร นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ตั้งอุณหภูมิและเวลาของเครื่องจำนวน 20 รอบ ดังนี้ ขั้น denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้น annealing 56 องศาเซลเซียส 60 วินาที ขั้น extension 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอ

เอทีได้มาเจือจาง 50 เท่าด้วยสารละลาย TE เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณขึ้นไป ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัว ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ (selective amplification) เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ และเพื่อให้เกิดการคัดเลือกการเพิ่มปริมาณชนิดดีเอ็นเอบางส่วน ทำให้มีความจำเพาะมากขึ้น โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด (forward และ reverse primer) คือ ไพรเมอร์ *EcoRI* + 3(E-ANN) กับ *MseI* + 3 (M-CNN) (ตารางที่ 3) นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจาง 50 เท่าในขั้นตอน preselective amplification แล้ว ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส) เติมสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ *EcoRI* + 3(E-ANN) และ *MseI* + 3(M-CNN) (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) อย่างละ 1 ไมโครลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 2 ไมโครลิตร dNTP mix (ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (50 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วให้ได้ 20 ไมโครลิตร นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมพีซีอาร์แบบ Touch down PCR โดยลดอุณหภูมิขั้นตอน annealing ลงรอบละ 1 องศาเซลเซียส จำนวน 10 รอบ อีก 23 รอบ คงอุณหภูมิไว้ที่ 56 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 Selective primer ของไพรเมอร์ *EcoRI* กับ *MseI* ที่ใช้ในขั้น Selective amplification

คู่ที่	ไพรเมอร์ <i>EcoRI</i> + 3(E-ANN)	ไพรเมอร์ <i>MseI</i> + 3(M-CNN)
1	5' GACTGCGTACCAATTCA-AAC 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CTA 3'
2	5' GACTGCGTACCAATTCA-AAG 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CTC 3'
3	5' GACTGCGTACCAATTCA-ACA 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CTC 3'
4	5' GACTGCGTACCAATTCA-ACA 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CTG 3'
5	5' GACTGCGTACCAATTCA-AGC 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CTT 3'
6	5' GACTGCGTACCAATTCA-ACT 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CTC 3'
7	5' GACTGCGTACCAATTCA-AGC 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CAA 3'
8	5' GACTGCGTACCAATTCA-AGG 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CAA 3'
9	5' GACTGCGTACCAATTCA-ACC 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CAC 3'
10	5' GACTGCGTACCAATTCA-ACT 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CAA 3'
11	5' GACTGCGTACCAATTCA-AGC 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CTA 3'
12	5' GACTGCGTACCAATTCA-AAG 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CAG 3'
13	5' GACTGCGTACCAATTCA-AGG 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CTT 3'
14	5' GACTGCGTACCAATTCA-ACC 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CTC 3'
15	5' GACTGCGTACCAATTCA-ACG 3'	5' GATGAGTCCTGAGTAAC-CTG 3'

ตารางที่ 5 โปรแกรมพีซีอาร์แบบ touch down PCR ในขั้นตอน selective amplification

รอบที่	Denaturing		Annealing		Primer extension		จำนวนรอบ
	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (sec)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (sec)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (sec)	
1	94	60	65	60	72	90	1
2	94	60	64	60	72	90	1
3	94	60	63	60	72	90	1
4	94	60	62	60	72	90	1
5	94	60	61	60	72	90	1
6	94	60	60	60	72	90	1
7	94	60	59	60	72	90	1
8	94	60	58	60	72	90	1
9	94	60	57	60	72	90	1
10	94	60	56	60	72	90	1
11	94	30	56	30	72	60	23

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำมาเติม AFLP loading buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 98 % formamide, 10 mM EDTA, 0.1 % bromophenol blue, 0.1 % xylene cyanol นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที

3.3 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดย Micro electrophoresis system MultiNA (Shimadzu, Japan) โดยใช้บัฟเฟอร์ DNA – 1000 ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอในช่วงความยาวคู่เบส 0-1,000 คู่เบส ใช้สีย้อม SYBR® Gold Nucleic Acid gel stain และใช้ Øx 174 RF DNA/HaeIII Digest marker เพื่อเทียบความยาวคู่เบสของแถบดีเอ็นเอ

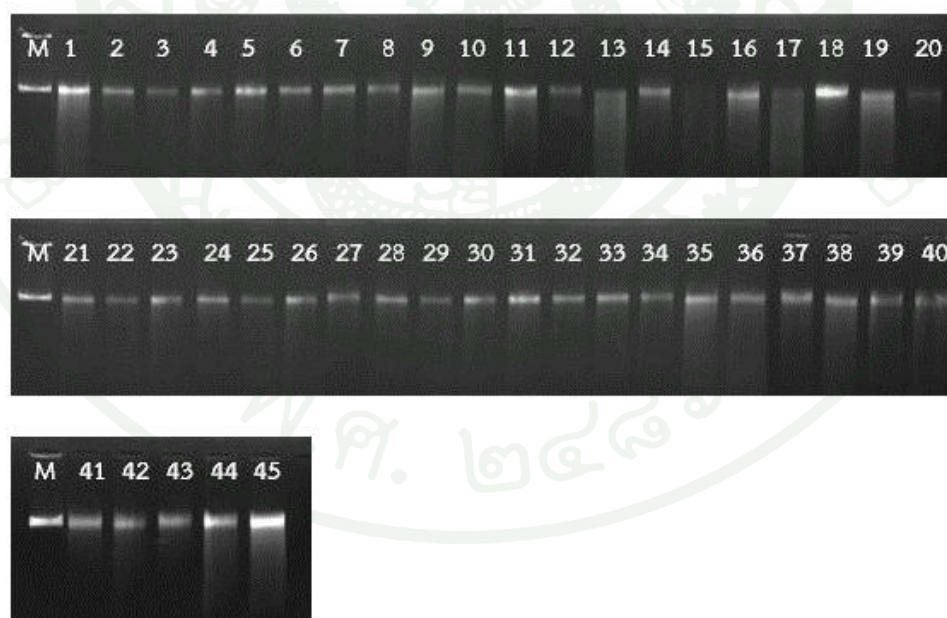
4. การวิเคราะห์ผลเอเอฟแอลพี

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยแปลผลข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของหงส์เหินแต่ละตัวอย่าง เปรียบเทียบจากความเหมือนและความแตกต่างของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ถ้าพบแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ทำการสำรวจข้อมูลให้ใช้สัญลักษณ์เป็น “1” ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอปรากฏในตำแหน่งที่ทำการสำรวจข้อมูลให้ใช้สัญลักษณ์เป็น “0” ค่า genetic similarity ของตัวอย่างพืชทั้งหมดคำนวณจากวิธีการของ Dice's coefficient (Dice, 1945) ทำการวิเคราะห์การจัดกลุ่มแบบ Unweighted pair group method of arithmetic average (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) แบบ SAHN clustering เพื่อสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) และวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation (r) โดยแผนภาพการกระจายและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการจัดกลุ่ม โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.1e (Rohlf, 2002)

ผลและวิจารณ์

1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของหงส์เหิน

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของตัวอย่างจำนวน 45 ตัวอย่าง โดยใช้ชุดสกัดของ DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) แล้ววิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพค่อนข้างดี สะอาด ดีเอ็นเอไม่แตกหัก ไม่มีโปรตีนและอาร์เอ็นเอเจือปน ได้สารละลายดีเอ็นเอที่ใสและไม่มีสี การสกัดด้วย DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) จึงเป็นวิธีที่ดีหากต้องการดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ดีเอ็นเอที่สกัดได้ส่วนใหญ่มีปริมาณที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน สืบเนื่องจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แต่ในตัวอย่างที่ 15 และตัวอย่างที่ 20 พบแถบดีเอ็นเอที่จางมาก แสดงว่ามีปริมาณที่น้อยมาก อาจจะมีสารจำเพาะบางอย่างที่มีผลต่อการสกัดดีเอ็นเอ ในการทดลองขั้นต่อไปนั้นคือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีที่ชีอาร์ จึงปรับปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอในปฏิกิริยาให้มากกว่าตัวอย่างอื่น (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของหงส์เหินจำนวน 45 ตัวอย่าง หมายเลขด้านบน แสดงลำดับของหงส์เหินตามตารางที่ 1 M : แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 50 นาโนกรัม

2. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย AFLP

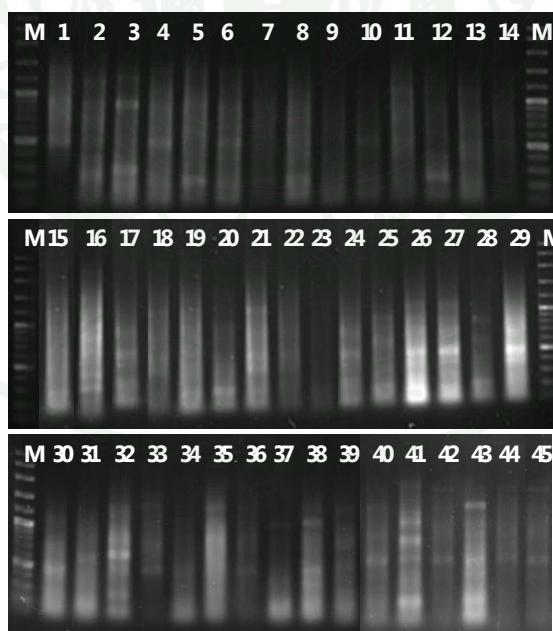
2.1 ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบ

หลังจากการตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *EcoRI* และ *MseI* แล้วเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่ง adapter ที่ใช้คือ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ ได้แก่

EcoRI primer + 1 (E-A) 5' GACTGCGTACCAATTCA 3' และ

MseI primer + 1 (M-C) 5' GATGAGTCCTGAGTAAC 3'

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบที่นำมาใช้ โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ดีเอ็นเอที่ผ่านขั้นตอนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อดีเอ็นเอด้วย adapter มีลักษณะเป็นแถบสีขาว (ภาพที่ 3) แสดงถึง ดีเอ็นเอต้นแบบถูกตัดและเชื่อมต่ออย่างสมบูรณ์



ภาพที่ 3 ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบที่เชื่อมต่อกับ adapter ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง
หมายเลข 1-45 ลำดับของตัวอย่างหงส์เหินตามตารางที่ 1 ; M : 100 bp DNA marker

2.2 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ในขั้นตอน selective amplification ทั้งหมด 15 คู่ แต่ละคู่ให้ แอปติเอ็นเอที่มีความยาวคู่เบสไม่เกิน 1,000 คู่เบส สำหรับหาลำดับทั้ง 45 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย กำหนดให้ใช้เลข 1 – 45 แทนชื่อของหาลำดับใน ตารางที่ 3 จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหาลำดับที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย และถูกเก็บรักษาไว้ที่สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ เชียงใหม่ จำนวน 7 ตัวอย่าง และจากโรงเรียนของสาขาพืชสวนประดับ ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ. เชียงใหม่ จำนวน 38 ตัวอย่าง โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี ใช้ไพรเมอร์ชนิด *EcoRI* และ *MseI* การปรากฏแถบและไม่ปรากฏแถบในแต่ละตำแหน่งของแถบ DNA ที่มีขนาดแตกต่างกันนั้นจะ กำหนดให้เป็น 1 และ 0 ตามลำดับ คู่ไพรเมอร์ทั้ง 15 คู่มีเปอร์เซ็นต์แอปติเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างอยู่ในช่วง 23.45-64.15 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) โดยมีคู่ไพรเมอร์ 5 คู่ คือ E-AAC/M-CTA, E-AAG/M-CTC, E-ACA/M-CTC, E-ACA/M-CTG และ E-AGC/M-CTT ให้แอปติเอ็นเอที่จาง ไม่ชัดเจน มีแอปติเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างจำนวนน้อย (ภาพที่ 4A) ดังนั้นจึงคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ 10 คู่ไพรเมอร์ ซึ่งมีแอปติเอ็นเอที่ชัดเจน นับจำนวนแอปติเอ็นเอได้ง่าย แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ดี (ภาพที่ 4B, ภาพที่ 5-14) มีเปอร์เซ็นต์แอปติเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic band) อยู่ที่ 38.14-64.15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในระดับปานกลาง พบแอปติเอ็นเอทั้งหมด 624 แถบ โดยเฉลี่ย 62.4 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ โดยคู่ไพรเมอร์ระหว่าง E-ACG กับ M-CTG ให้เปอร์เซ็นต์แอปติเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างมากที่สุดคือ 64.15 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์แอปติเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างเฉลี่ย 47.77 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบกับ Wahyuni *et al.* (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี พบแอปติเอ็นเอที่เป็น Polymorphic band เฉลี่ยเพียง 11.45 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นคู่ไพรเมอร์ทั้ง 10 คู่ จึงเหมาะสมที่จะนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหาลำดับทั้ง 45 ตัวอย่าง

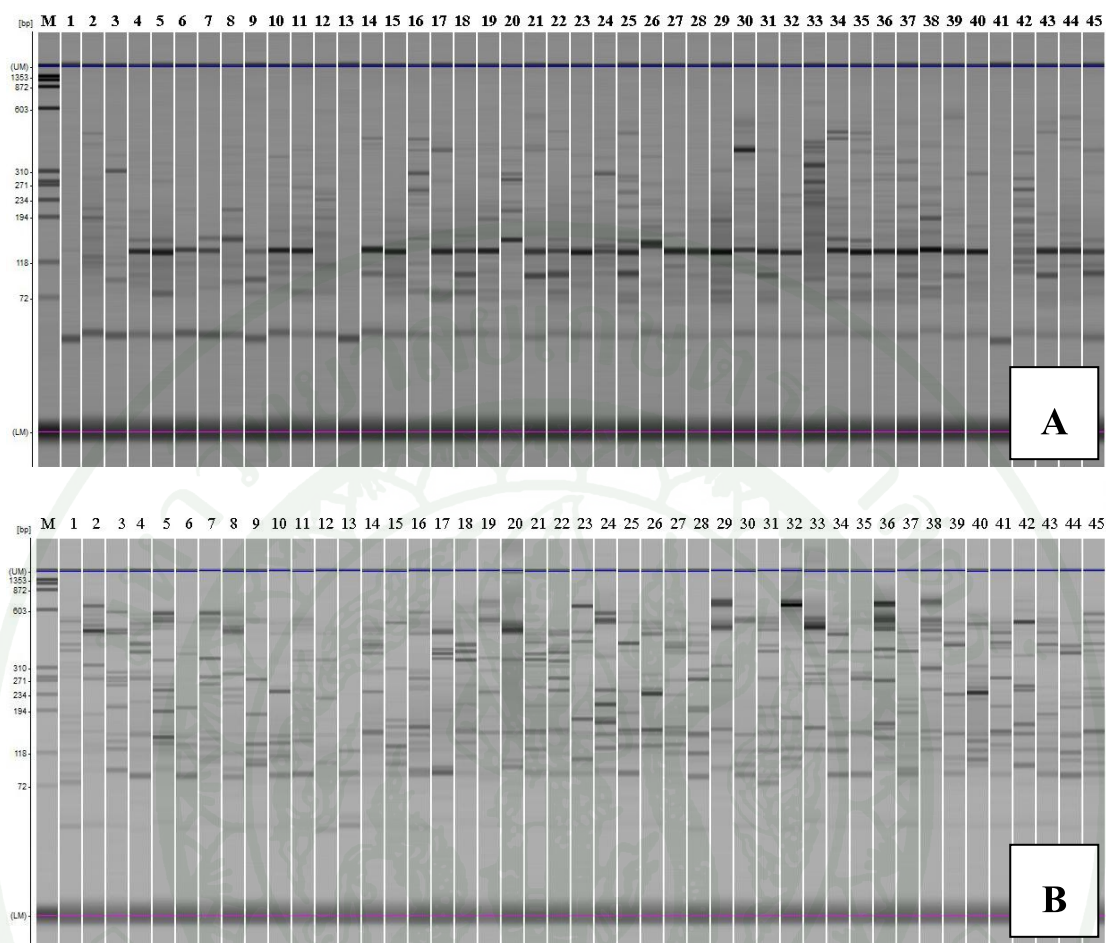
การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษานี้ เปรียบเทียบกับการศึกษาโดยเทคนิคเดียวกันของ อารีรัตน์ (2553) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข่า (*Alpinia* spp.) คัดเลือกไพรเมอร์ชนิด *EcoRI* และ *MseI* ได้จำนวนทั้งหมด 12 คู่ ให้แอปติเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างเฉลี่ยคิดเป็น 69.75 เปอร์เซ็นต์ การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์สอดคล้องกับงานศึกษานี้ 3 คู่ คือ E-AGC / M-CAA, E-ACC / M-CAC และ E-AGG / M-CTT อีกทั้งได้เปอร์เซ็นต์แอปติเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างใกล้เคียงกันอีกด้วย คือ 51.72, 42.11 และ 56 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 คู่ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกทั้งหมดไพร์เมอร์ 15 คู่

ลำดับ	คู่ไพร์เมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด (แถบ)	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ แสดงความแตกต่าง ระหว่างตัวอย่าง(แถบ)	เปอร์เซ็นต์แถบ ดีเอ็นเอที่แสดงความ แตกต่าง
1	E-AAC/M-CTA	80	27	33.75
2	E-AAG/M-CTC	81	19	23.45
3	E-ACA/M-CTC	93	29	31.18
4	E-ACA/M-CTG	106	38	35.84
5	E-AGC/M-CTT	122	29	23.77
6	E-ACT/M-CTC	128	52	40.63
7	E-AGC/M-CAA	129	52	40.31
8	E-AGG/M-CAA	97	37	38.14
9	E-ACC/M-CAC	128	61	47.66
10	E-ACT/M-CAA	123	47	38.21
11	E-AGC/M-CTA	128	65	50.78
12	E-AAG/M-CAG	117	64	54.7
13	E-AGG/M-CTT	133	72	54.14
14	E-ACC/M-CTC	147	72	48.98
15	E-ACG/M-CTG	159	102	64.15
ช่วง		80-159	19-102	23.45-64.15

ตารางที่ 7 กุ๊ปไพร์เมอร์ที่เลือกใช้ในการทดลอง จำนวน 10 กุ๊ป โดยสร้างแถบดีเอ็นเอชุดเงินและแสดงความแตกต่างของแต่ละตัวอย่างได้

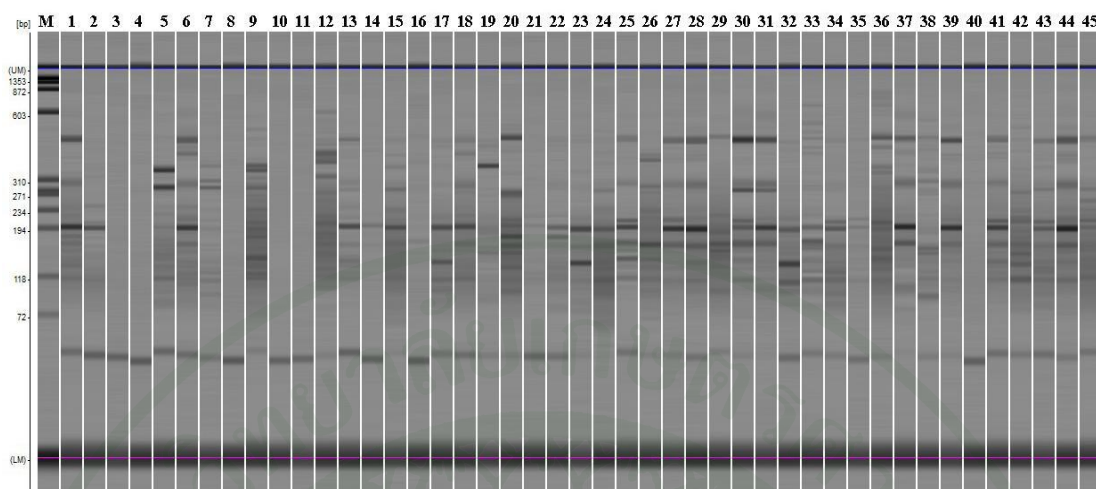
ลำดับ	กุ๊ปไพร์เมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด (แถบ)	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ แสดงความแตกต่าง ระหว่างตัวอย่าง(แถบ)	เปอร์เซ็นต์แถบ ดีเอ็นเอที่แสดงความ แตกต่าง
1	E-ACT/M-CTC	128	52	40.63
2	E-AGC/M-CAA	129	52	40.31
3	E-AGG/M-CAA	97	37	38.14
4	E-ACC/M-CAC	128	61	47.66
5	E-ACT/M-CAA	123	47	38.21
6	E-AGC/M-CTA	128	65	50.78
7	E-AAG/M-CAG	117	64	54.7
8	E-AGG/M-CTT	133	72	54.14
9	E-ACC/M-CTC	147	72	48.98
10	E-ACG/M-CTG	159	102	64.15
รวม		1,289	624	
ค่าเฉลี่ย			62.4	47.77
ช่วง			37-102	38.14-64.15



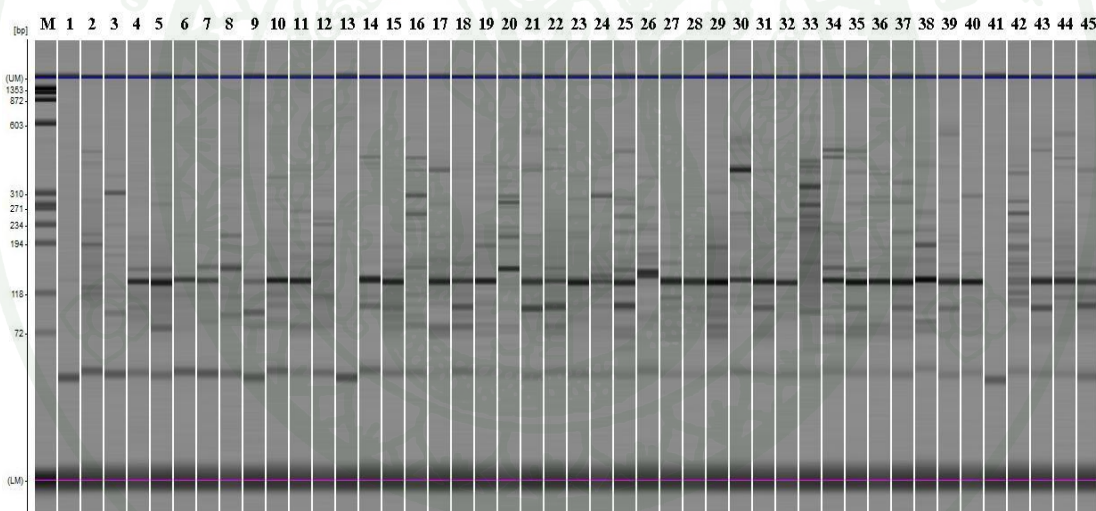
ภาพที่ 4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างหงส์เหิน 45 ตัวอย่าง ในขั้นตอนคัดเลือกว่าไพรเมอร์ที่เหมาะสม (selective amplification)

(A) คู่ไพรเมอร์ E-AAG/M-CTC ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนน้อย หรือแสดงความแตกต่างของแต่ละตัวอย่างได้น้อย

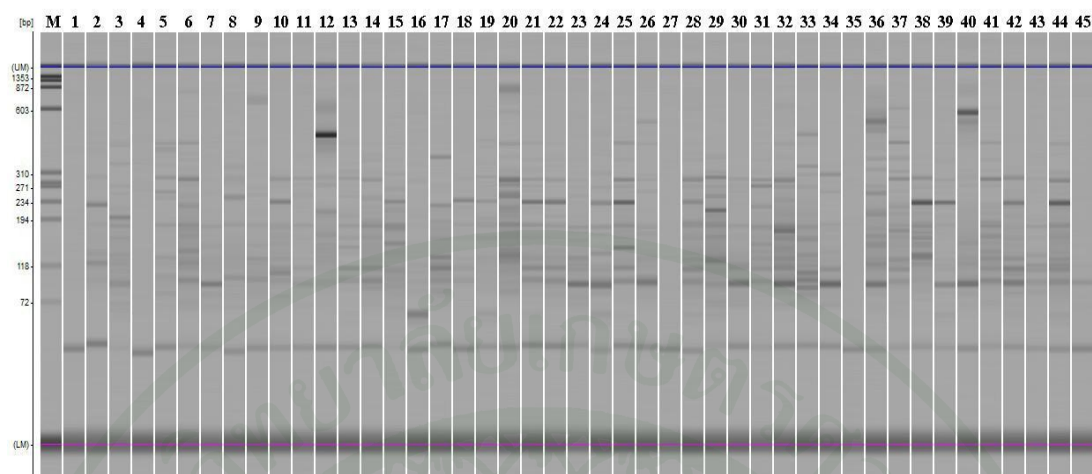
(B) คู่ไพรเมอร์ E-ACG/M-CTG ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจน แสดงความแตกต่างของแต่ละตัวอย่างได้มาก



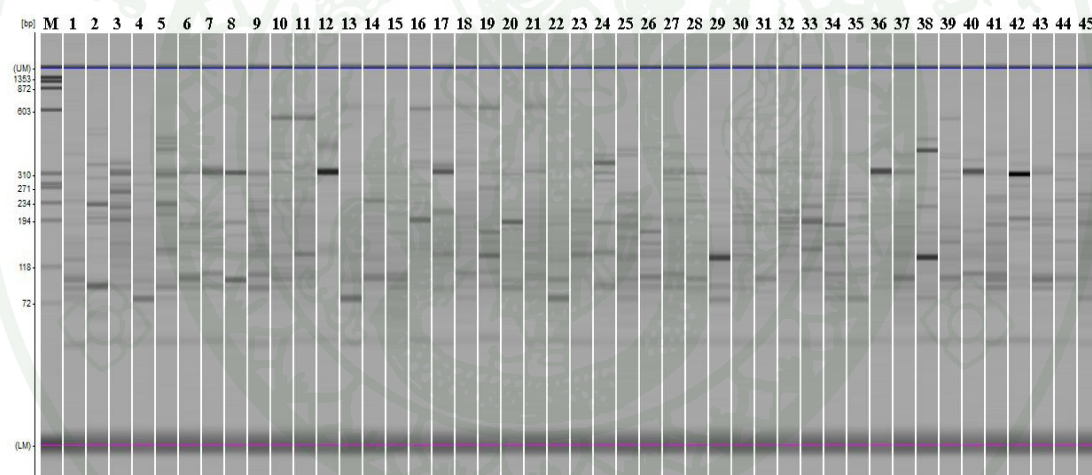
ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 1 E-AAC/M-CTA



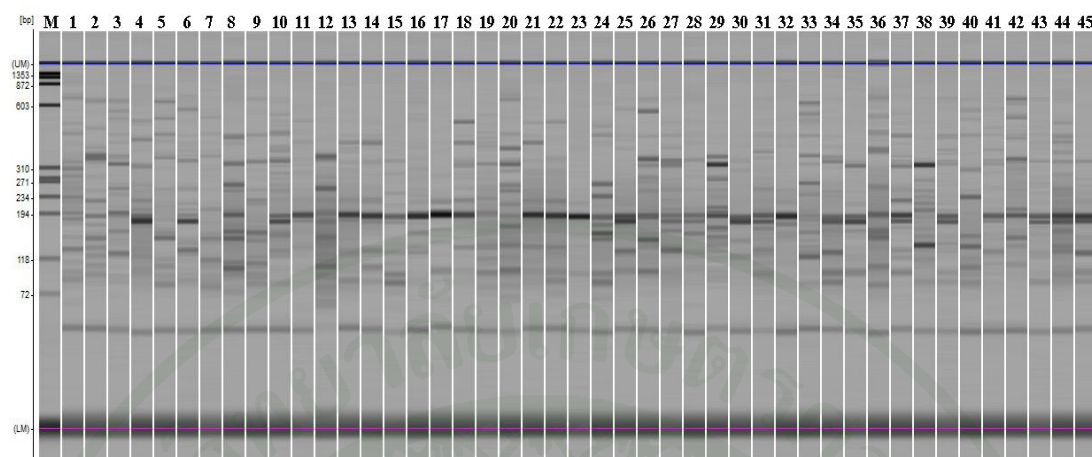
ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 2 E-AAG/M-CTC



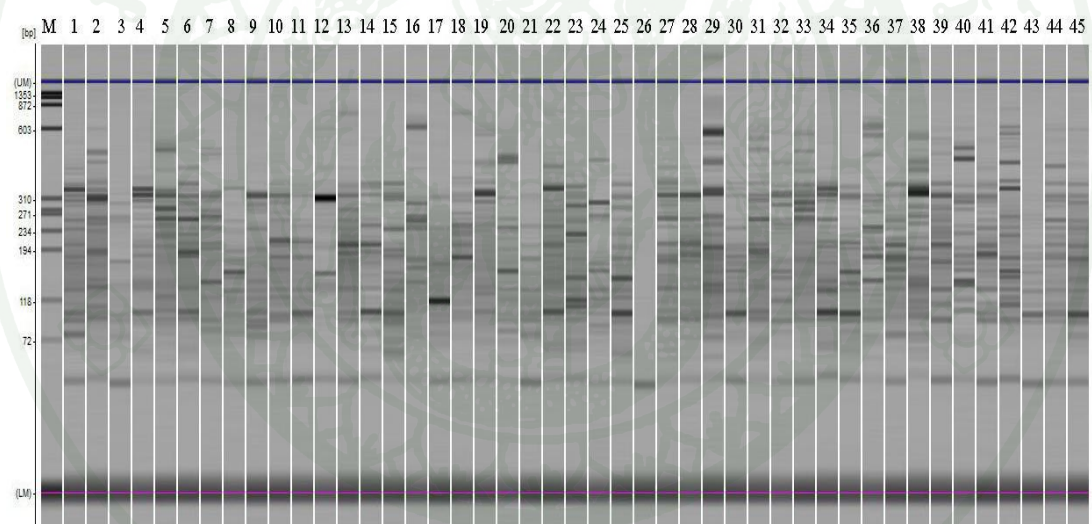
ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 3 E-ACA/M-CTC



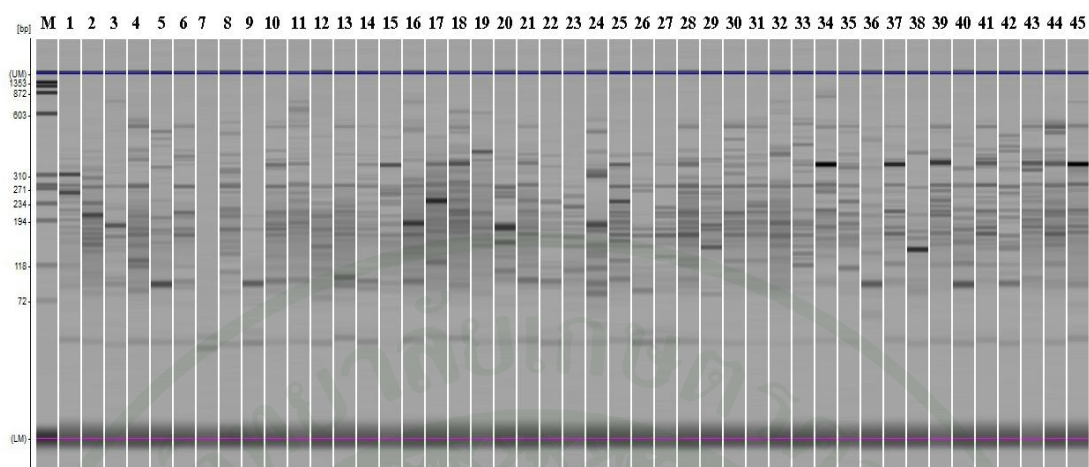
ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 4 E-ACA/M-CTG



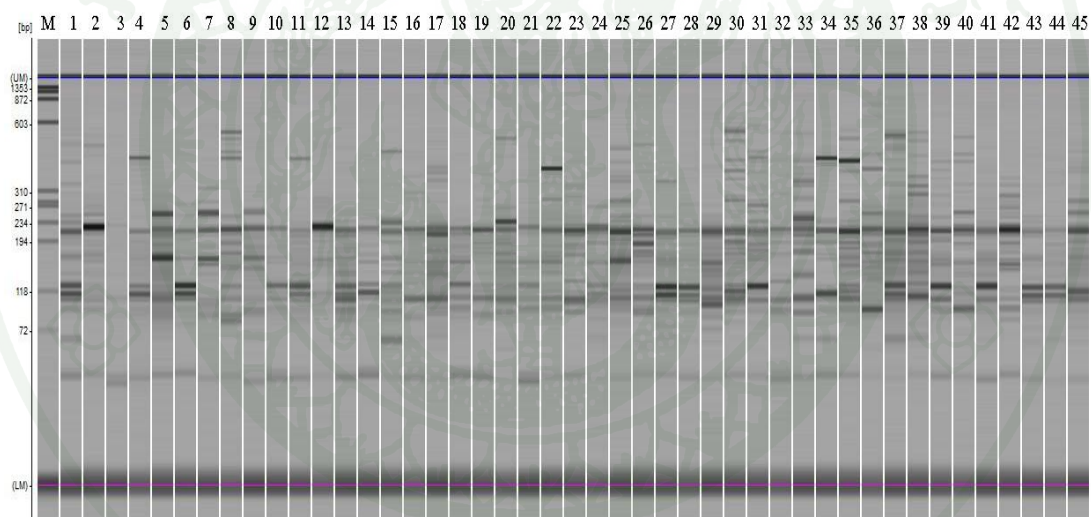
ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 5 E-AGC/M-CTT



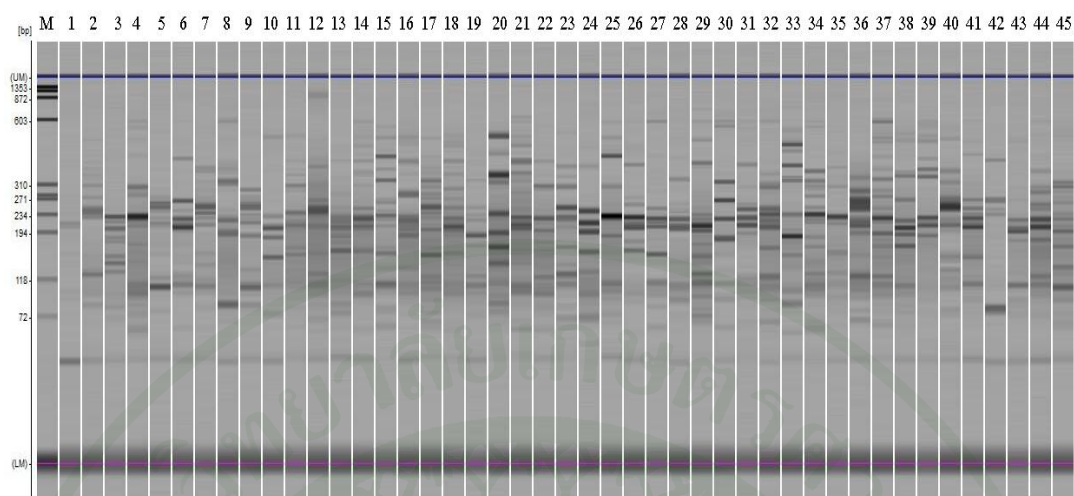
ภาพที่ 10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 6 E-ACT/M-CTC



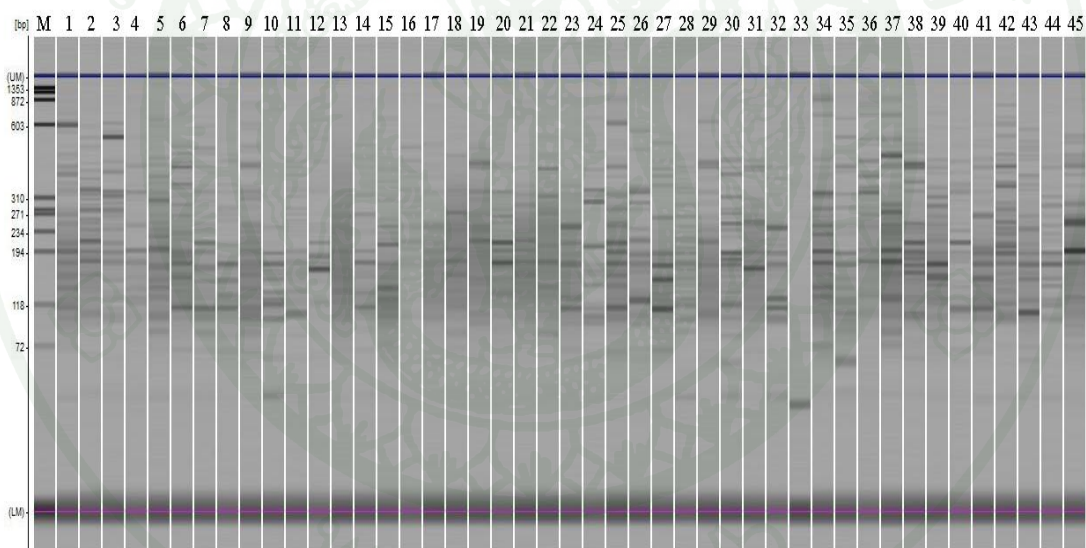
ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 7 E-AGC/M-CAA



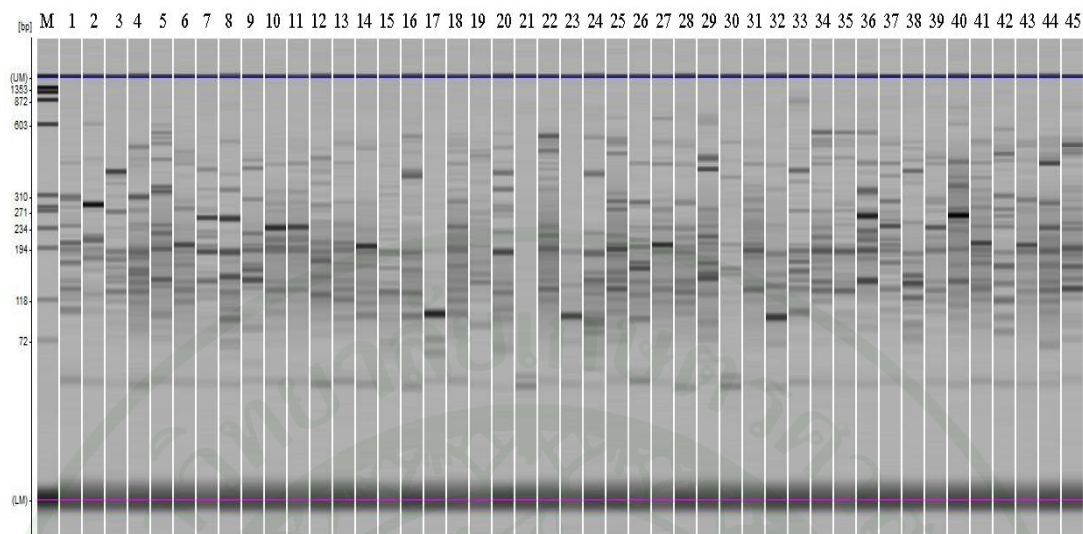
ภาพที่ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 8 E-AGG/M-CAA



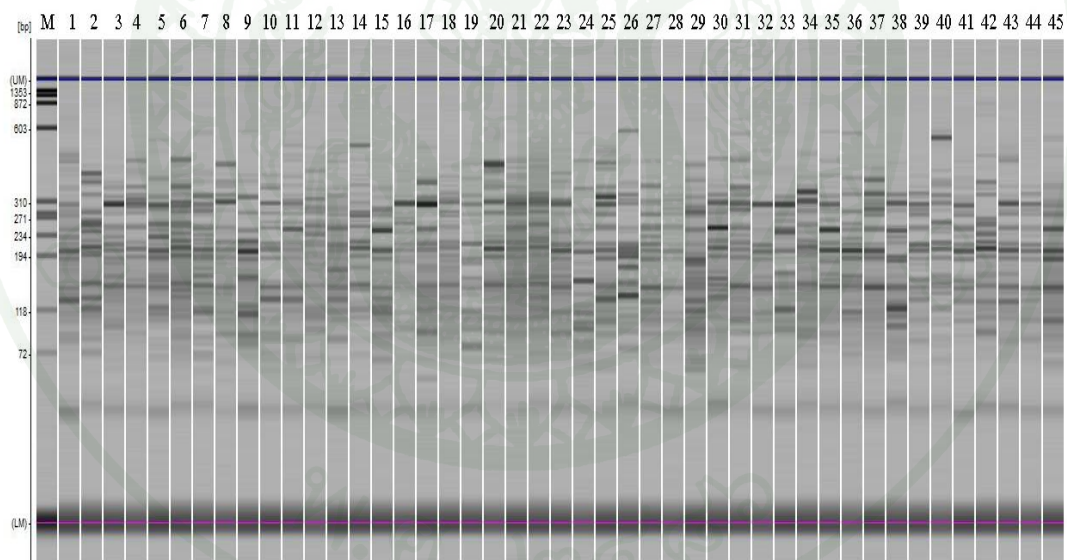
ภาพที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 9 E-ACC/M-CAC



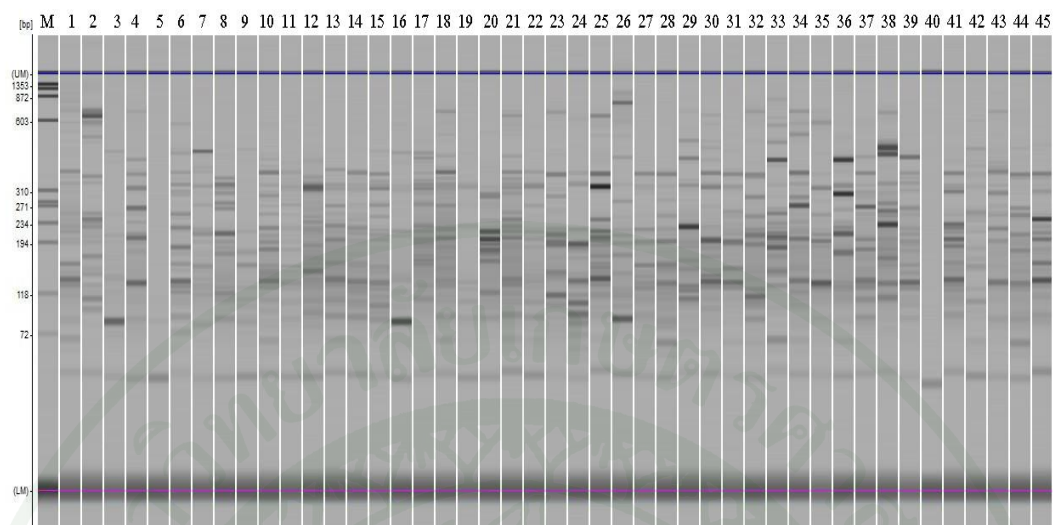
ภาพที่ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 10 E-ACT/M-CAA



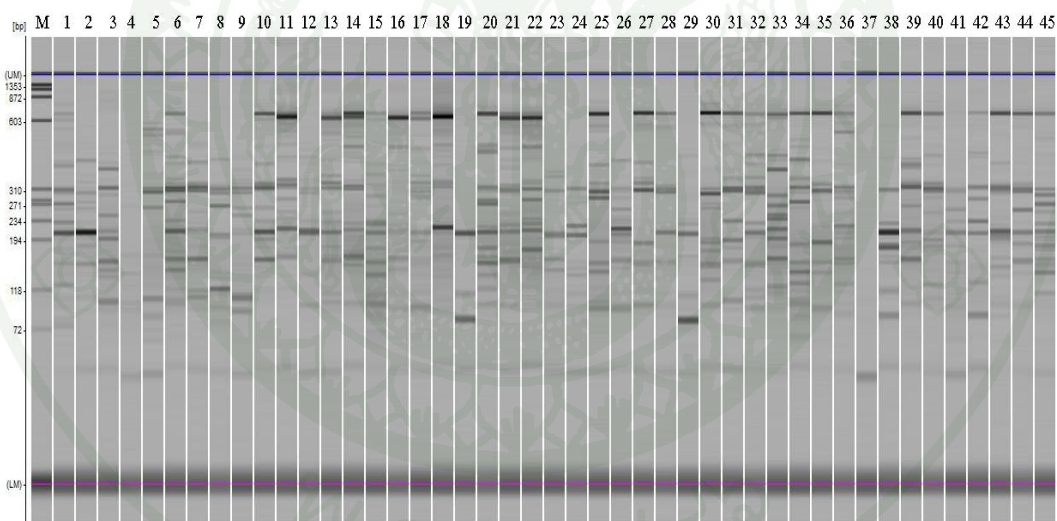
ภาพที่ 15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 11 E-AGC/M-CTA



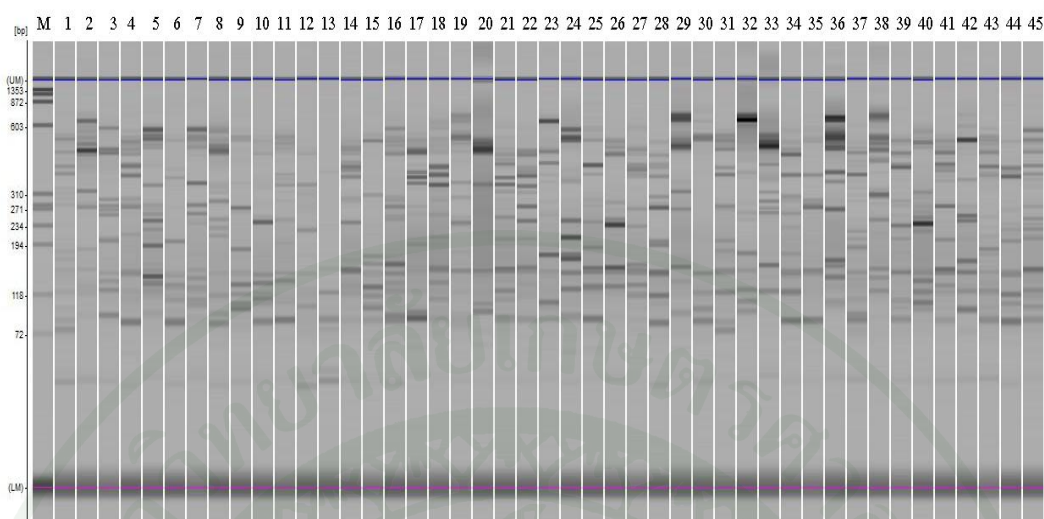
ภาพที่ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 12 E-AAG/M-CAG



ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 13 E-AGG/M-CTT



ภาพที่ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 14 E-ACC/M-CTC



ภาพที่ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่ 15 E-ACG/M-CTG

2.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

เมื่อคำนวณค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity index) ระหว่างหงส์เหินทั้ง 45 ตัวอย่าง โดย Dice's coefficient พบว่ามีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1.00 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.2 (ตารางที่ 6) สามารถใช้อธิบายถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างได้ โดยอธิบายค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมด้วยวิธี Dice (Dice's coefficient) พบว่าตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ *Globba barthei* Gagnep. กับ *Globba magnifica* M.F. Newman ถึง 0.375

ตารางที่ 8 ค่า similarity index ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับค่าความคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอ
หงส์เหิน 45 ตัวอย่าง

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1.00																	
2	0.08	1.00																
3	0.00	0.03	1.00															
4	0.16	0.06	0.13	1.00														
5	0.09	0.09	0.02	0.03	1.00													
6	0.14	0.11	0.15	0.11	0.04	1.00												
7	0.08	0.03	0.20	0.13	0.16	0.07	1.00											
8	0.10	0.02	0.08	0.11	0.11	0.11	0.10	1.00										
9	0.14	0.05	0.06	0.03	0.21	0.10	0.20	0.05	1.00									
10	0.17	0.08	0.06	0.09	0.09	0.33	0.08	0.10	0.11	1.00								
11	0.14	0.10	0.04	0.16	0.05	0.14	0.07	0.15	0.03	0.20	1.00							
12	0.03	0.11	0.09	0.07	0.02	0.08	0.06	0.05	0.00	0.03	0.04	1.00						
13	0.21	0.10	0.14	0.09	0.04	0.18	0.11	0.12	0.13	0.24	0.26	0.03	1.00					
14	0.09	0.03	0.09	0.10	0.02	0.17	0.06	0.11	0.06	0.17	0.18	0.03	0.11	1.00				
15	0.14	0.03	0.06	0.16	0.07	0.07	0.09	0.05	0.08	0.06	0.03	0.00	0.05	0.00	1.00			
16	0.04	0.03	0.07	0.13	0.06	0.03	0.11	0.10	0.04	0.04	0.09	0.08	0.10	0.00	0.07	1.00		
17	0.13	0.07	0.08	0.14	0.06	0.02	0.18	0.12	0.03	0.10	0.18	0.03	0.22	0.08	0.10	0.10	1.00	
18	0.13	0.10	0.05	0.09	0.09	0.11	0.03	0.07	0.08	0.21	0.18	0.00	0.15	0.35	0.08	0.03	0.17	1.00
19	0.07	0.13	0.04	0.04	0.08	0.06	0.07	0.06	0.04	0.04	0.09	0.00	0.20	0.04	0.04	0.15	0.10	0.03
20	0.16	0.04	0.14	0.12	0.11	0.06	0.16	0.21	0.04	0.13	0.08	0.02	0.06	0.18	0.09	0.05	0.25	0.15
21	0.13	0.15	0.19	0.15	0.04	0.02	0.13	0.02	0.05	0.08	0.10	0.11	0.18	0.14	0.03	0.10	0.20	0.22
22	0.04	0.13	0.07	0.05	0.15	0.12	0.07	0.12	0.02	0.09	0.08	0.02	0.13	0.16	0.04	0.11	0.15	0.13
23	0.17	0.05	0.12	0.07	0.07	0.07	0.12	0.16	0.06	0.12	0.14	0.03	0.14	0.03	0.12	0.11	0.21	0.08
24	0.11	0.05	0.03	0.09	0.09	0.07	0.08	0.15	0.08	0.08	0.10	0.00	0.08	0.11	0.11	0.14	0.05	0.13

ตารางที่ 8 (ต่อ)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
25	0.16	0.10	0.08	0.13	0.09	0.11	0.13	0.08	0.16	0.12	0.07	0.11	0.10	0.13	0.17	0.12	0.14	0.12
26	0.10	0.05	0.11	0.09	0.09	0.11	0.08	0.12	0.05	0.13	0.09	0.00	0.15	0.14	0.03	0.07	0.14	0.07
27	0.16	0.03	0.08	0.12	0.13	0.14	0.08	0.12	0.05	0.21	0.13	0.06	0.20	0.16	0.13	0.03	0.10	0.07
28	0.12	0.05	0.09	0.20	0.10	0.15	0.03	0.16	0.06	0.17	0.11	0.00	0.17	0.21	0.21	0.11	0.08	0.11
29	0.11	0.10	0.04	0.02	0.07	0.10	0.02	0.08	0.06	0.06	0.18	0.07	0.19	0.04	0.02	0.03	0.14	0.08
30	0.08	0.05	0.08	0.11	0.09	0.15	0.10	0.16	0.05	0.18	0.09	0.08	0.15	0.16	0.08	0.13	0.12	0.12
31	0.07	0.09	0.17	0.23	0.10	0.25	0.10	0.07	0.09	0.12	0.17	0.10	0.14	0.15	0.14	0.06	0.13	0.15
32	0.11	0.05	0.14	0.09	0.11	0.07	0.11	0.12	0.13	0.08	0.10	0.06	0.15	0.03	0.14	0.20	0.17	0.10
33	0.02	0.04	0.14	0.08	0.14	0.04	0.09	0.11	0.02	0.02	0.05	0.08	0.04	0.05	0.07	0.17	0.07	0.07
34	0.09	0.11	0.07	0.25	0.04	0.22	0.16	0.13	0.09	0.11	0.08	0.07	0.09	0.16	0.09	0.03	0.09	0.11
35	0.11	0.05	0.14	0.38	0.07	0.12	0.20	0.15	0.08	0.14	0.17	0.06	0.16	0.12	0.25	0.14	0.13	0.08
36	0.04	0.04	0.13	0.02	0.17	0.08	0.20	0.14	0.15	0.13	0.10	0.05	0.10	0.07	0.07	0.08	0.14	0.14
37	0.20	0.11	0.09	0.14	0.06	0.16	0.09	0.12	0.04	0.18	0.15	0.05	0.15	0.16	0.11	0.00	0.10	0.21
38	0.08	0.07	0.08	0.04	0.14	0.12	0.08	0.13	0.10	0.12	0.04	0.06	0.11	0.06	0.10	0.07	0.07	0.06
39	0.07	0.07	0.15	0.16	0.04	0.21	0.12	0.09	0.12	0.14	0.20	0.10	0.23	0.12	0.17	0.21	0.11	0.13
40	0.03	0.00	0.00	0.06	0.09	0.05	0.17	0.08	0.11	0.08	0.07	0.06	0.05	0.03	0.00	0.07	0.10	0.08
41	0.21	0.02	0.11	0.06	0.13	0.20	0.10	0.09	0.05	0.15	0.12	0.03	0.32	0.13	0.21	0.06	0.07	0.19
42	0.07	0.05	0.07	0.11	0.06	0.15	0.12	0.11	0.05	0.14	0.03	0.05	0.05	0.12	0.02	0.12	0.16	0.13
43	0.09	0.03	0.24	0.23	0.05	0.12	0.14	0.08	0.09	0.11	0.14	0.06	0.11	0.09	0.17	0.15	0.08	0.05
44	0.08	0.02	0.16	0.20	0.09	0.13	0.13	0.19	0.03	0.26	0.15	0.06	0.15	0.16	0.21	0.06	0.12	0.14
45	0.22	0.06	0.04	0.07	0.16	0.18	0.06	0.13	0.14	0.18	0.09	0.02	0.16	0.15	0.08	0.07	0.13	0.15

ตารางที่ 8 (ต่อ)

	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
19	1.00														
20	0.11	1.00													
21	0.13	0.13	1.00												
22	0.05	0.11	0.13	1.00											
23	0.04	0.09	0.11	0.07	1.00										
24	0.03	0.09	0.05	0.09	0.11	1.00									
25	0.10	0.10	0.18	0.09	0.19	0.06	1.00								
26	0.16	0.11	0.15	0.13	0.11	0.13	0.06	1.00							
27	0.03	0.13	0.05	0.06	0.11	0.05	0.16	0.07	1.00						
28	0.00	0.07	0.05	0.09	0.09	0.14	0.09	0.14	0.22	1.00					
29	0.18	0.11	0.08	0.14	0.09	0.04	0.07	0.14	0.08	0.07	1.00				
30	0.06	0.12	0.10	0.16	0.03	0.13	0.19	0.07	0.14	0.11	0.08	1.00			
31	0.06	0.08	0.22	0.10	0.10	0.07	0.09	0.11	0.16	0.24	0.09	0.13	1.00		
32	0.13	0.09	0.05	0.06	0.28	0.13	0.16	0.08	0.18	0.11	0.10	0.10	0.11	1.00	
33	0.08	0.06	0.07	0.10	0.05	0.07	0.09	0.09	0.09	0.05	0.07	0.06	0.00	0.11	1.00
34	0.05	0.17	0.07	0.15	0.07	0.09	0.16	0.09	0.09	0.16	0.06	0.13	0.14	0.09	0.08
35	0.14	0.11	0.08	0.04	0.17	0.08	0.25	0.05	0.18	0.20	0.11	0.25	0.24	0.11	0.07
36	0.05	0.07	0.10	0.16	0.02	0.09	0.07	0.12	0.08	0.07	0.07	0.04	0.13	0.08	0.13
37	0.08	0.15	0.11	0.11	0.09	0.09	0.17	0.04	0.19	0.07	0.18	0.14	0.13	0.09	0.04
38	0.11	0.15	0.07	0.07	0.04	0.04	0.11	0.09	0.17	0.08	0.10	0.15	0.05	0.17	0.03
39	0.09	0.06	0.11	0.08	0.22	0.09	0.22	0.11	0.09	0.17	0.08	0.13	0.27	0.16	0.10
40	0.07	0.13	0.11	0.09	0.09	0.11	0.10	0.08	0.03	0.09	0.04	0.08	0.12	0.08	0.02
41	0.10	0.10	0.12	0.08	0.19	0.08	0.23	0.12	0.22	0.16	0.14	0.12	0.15	0.15	0.11
42	0.09	0.18	0.14	0.08	0.07	0.12	0.18	0.13	0.05	0.12	0.08	0.15	0.16	0.11	0.04
43	0.11	0.07	0.14	0.05	0.15	0.11	0.08	0.05	0.22	0.24	0.11	0.08	0.19	0.19	0.07
44	0.06	0.15	0.12	0.15	0.19	0.08	0.06	0.12	0.24	0.32	0.08	0.16	0.15	0.20	0.07
45	0.05	0.17	0.08	0.16	0.17	0.16	0.26	0.06	0.10	0.15	0.13	0.15	0.07	0.12	0.07

ตารางที่ 8 (ต่อ)

	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
34	1.00											
35	0.16	1.00										
36	0.06	0.09	1.00									
37	0.19	0.15	0.13	1.00								
38	0.05	0.14	0.06	0.13	1.00							
39	0.12	0.26	0.10	0.14	0.05	1.00						
40	0.11	0.00	0.17	0.02	0.06	0.05	1.00					
41	0.09	0.13	0.06	0.14	0.11	0.22	0.03	1.00				
42	0.12	0.12	0.11	0.12	0.19	0.13	0.10	0.07	1.00			
43	0.14	0.34	0.09	0.11	0.18	0.20	0.00	0.21	0.12	1.00		
44	0.11	0.23	0.10	0.19	0.15	0.13	0.10	0.17	0.09	0.24	1.00	
45	0.18	0.16	0.05	0.19	0.12	0.11	0.10	0.21	0.09	0.13	0.15	1.00

2.4 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำค่าดัชนีความเหมือนดังกล่าวมาวิเคราะห์โดยวิธี UPGMA เพื่อสร้างแผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหงส์เหินทั้ง 45 ตัวอย่าง (ภาพที่ 15) พบว่า จากแผนผังความสัมพันธ์แสดงความสัมพันธ์ ที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.09 สามารถแบ่งหงส์เหินออกได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสมาชิกหงส์เหินกลุ่มใหญ่ที่สุด 33 ตัวอย่าง ซึ่งสมาชิกส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ใน Section *Globba* (Schumann, 1904; Larsen, 1972) ในกลุ่มที่ 1 สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อย 1.1 ประกอบด้วยสมาชิก 23 ตัวอย่าง ได้แก่ *Globba obscura* K. Larsen, *G. reflexa* Craib, *G. marantina* L., *G. villosula* Gagnep., *G. winitii* C.H.Wright, *G. laeta* K. Larsen, *G. adhaerens* Gagnep. No.1, *Globba* sp. No.9, *G. siamensis* Hemsl. No.2, *G. adhaerens*

Gagnep. No.2, *G. williamsiana* M.F. Newman, *G. siamensis* Hemsl No.1, *G. barthei* Gagnep., *G. magnifica* M.F. Newman, *G. colpicola* K. Schum, *Globba* sp. No.6, *G. rosea* Gagnep. No.2, *G. schomburgkii* Hook. f., *Globba* sp. No.5, *G. globulifera* Gagnep., *Globba* sp. No.2, *G. purpurascens* Craib, *G. fragilis* S.N. Lim. สมาชิกในกลุ่มย่อย 1.1 นี้ ถูกจัดอยู่ใน Section *Globba* (Schumann, 1904; Larsen, 1972) ทั้งหมดและมีจำนวนรยางค์อับเรณูเท่ากับ 4 รยางค์ (ปิยะเกษตรและคณะ, 2556) ในกลุ่มย่อยนี้ มี *Globba. barthei* Gagnep., *G. obscura* K. Larsen, *G. purpurescens* Craib, *Globba* sp. No.2, *Globba* sp. No.5, *Globba* sp. No.6, และ *Globba* sp. No.9 (ภาคผนวก) ซึ่งยังไม่มีรายงานการจำแนกว่าจัดอยู่ใน Section ใดที่ชัดเจนถูกรวมอยู่ในกลุ่มย่อย 1.1 นี้ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างใกล้ชิดกับหงส์เหินหลายชนิดใน Section *Globba*

กลุ่มย่อย 1.2 ประกอบด้วยสมาชิกทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ได้แก่ *Globba flagellaris* K. Larsen, *Globba* sp. No.3, *G. yeatsiana* Craib, *G. cernua* Baker, *Globba* sp. No.7, *G. leucantha* Mig, *G. substrigosa* King ex Baker สมาชิกในกลุ่มย่อยนี้เป็นสมาชิกที่มาจากหลาย Section ดังนี้ *G. flagellaris* K. Larsen ถูกจัดอยู่ใน Section *Nudae* โดยมี *Globba* sp. No.3 และ *G. yeatsiana* Craib รวมอยู่ในคลัสเตอร์นี้ด้วย, *Globba* sp. No.7 อยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับ *G. cernua* Baker ซึ่งถูกจัดอยู่ใน Section *Globba*, *G. leucantha* Mig ถูกจัดอยู่ใน Section *Ceratanthera* ser. *Basicalcarantae* และ *G. substrigosa* King ex Baker ถูกจัดอยู่ใน Section *Haplanthera*

กลุ่มย่อย 1.3 มีสมาชิก 3 ตัวอย่าง ได้แก่ *Globba* sp. No.1, *Globba tricolor* Ridl., และ *Globba rosea* Gagnep. No.1 ซึ่งมีรายงานว่า *Globba rosea* Gagnep. No.1 ถูกจัดอยู่ใน Section *Globba* (Schumann, 1904; Larsen, 1972; Williams *et al.*, 2004)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสมาชิก 3 ตัวอย่าง ได้แก่ *Globba pendula* Roxb., *G. geoffrayi* Gagnep., และ *G. expansa* Wall. Ex Horan ซึ่ง *G. pendula* Roxb. และ *G. geoffrayi* Gagnep. ถูกจัดอยู่ใน Section เดียวกันคือ Section *Ceratanthera* ser. *Basicalcarantae* (Williams *et al.*, 2004) ถึงแม้ว่าทั้งสองชนิดจะมีจำนวนรยางค์อับเรณูไม่เท่ากัน คือ *G. pendula* Roxb. มีจำนวนรยางค์อับเรณู 2 และ *G. geoffrayi* Gagnep. มีจำนวนรยางค์อับเรณูเท่ากับ 4 (Schumann, 1904; Larsen, 1972) ส่วน *G. expansa* Wall. Ex Horan ถูกจัดอยู่ใน Section *Nudae* (Williams *et al.*, 2004)

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสมาชิก 3 ตัวอย่าง ได้แก่ *Globba nisbetiana* Craib, *Globba* sp. No.8, และ *Globba* sp. No.4 ซึ่งในรูปวิธานจำแนกชนิดหงส์เหินได้จัดให้ *G. nisbetiana* Craib และ *Globba* sp. No.4 อยู่ในกลุ่มที่มีจำนวนรยางค์อับเรณูเท่ากันคือ เท่ากับ 4 ต่างกันตรงที่ *G. nisbetiana* Craib มีลักษณะใบที่มีขนเห็นชัดเจน ช่อดอกเล็กกว่า *Globba* sp. No.4 ที่มีความสัมพันธ์ค่อนข้างใกล้ชิดกับ *Globba* sp. No.8 ซึ่งหงส์เหินทั้งสองชนิดถูกจัดอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับ *Globba* sp. No.4 ด้วย

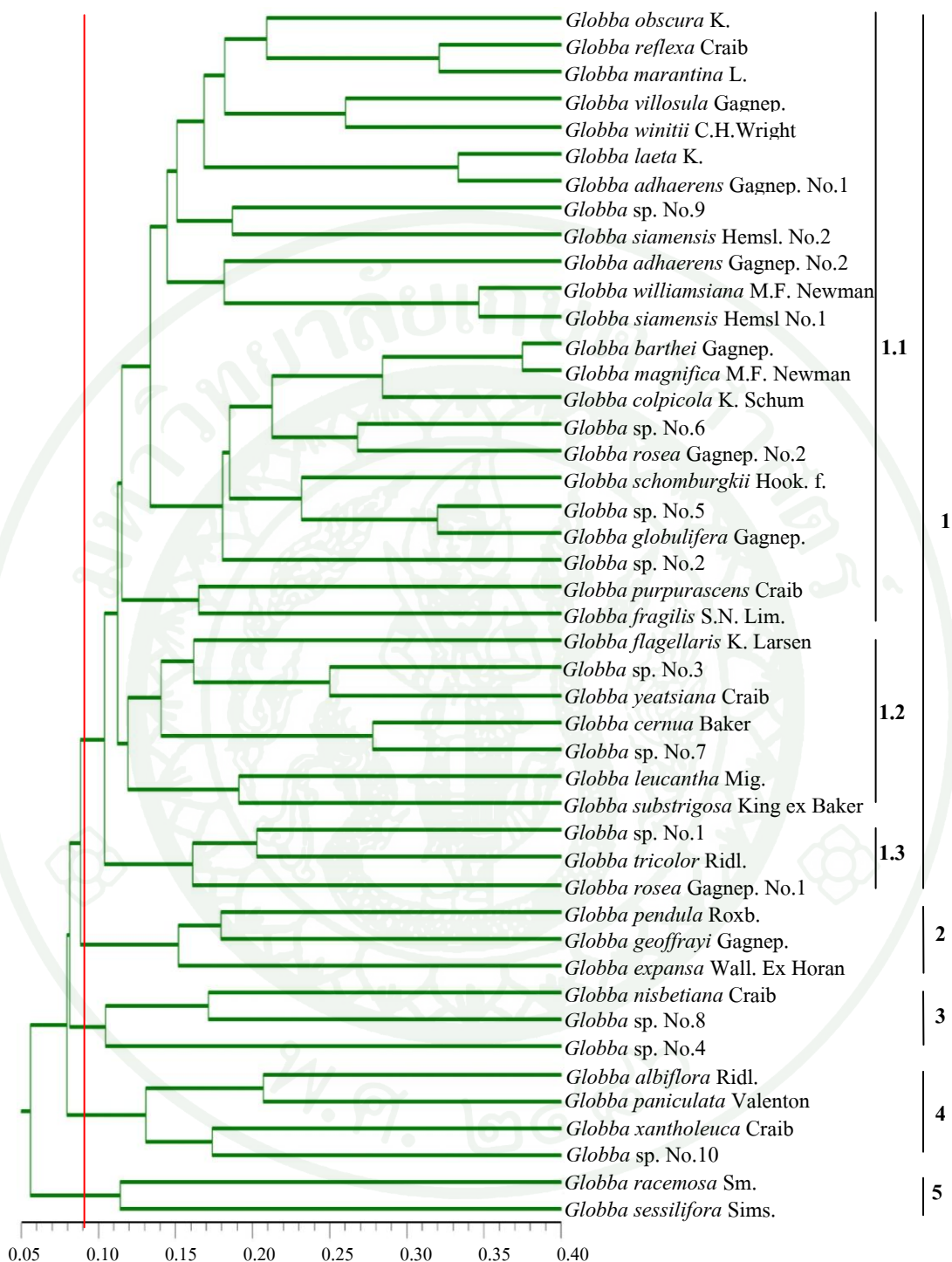
กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยสมาชิก 4 ตัวอย่าง ได้แก่ *Globba albiflora* Ridl., *Globba paniculata* Valenton, *Globba xantholeuca* Craib, และ *Globba* sp. No.10 หงส์เหินในกลุ่มนี้ มีจำนวนรยางค์อับเรณูเท่ากันทั้งหมด คือ จำนวน 2 รยางค์ และ *G. albiflora* Ridl., *G. paniculata* Valenton, *G. xantholeuca* Craib ถูกจัดอยู่ใน Section *Ceratanthera* ser. *Mediocal* (Williams *et al.*, 2004) ส่วน *Globba* sp. No.10 ยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนว่าถูกจัดอยู่ใน Section ใด แต่จากรูปวิธานจำแนกชนิดหงส์เหินของปิยเกษตรและคณะ (2555) ได้จัดให้ *Globba* sp. No.10 (*Globba* sp. ดอกขาวน้ำ ผุดทาบลาว) (ภาคผนวก) อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *G. albiflora* Ridl., *G. paniculata* Valenton และ *G. xantholeuca* Craib เนื่องจากมีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันและมีรยางค์อับเรณูสีขาวเหมือนกับหงส์เหินในกลุ่มนี้

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยสมาชิก 2 ตัวอย่าง ได้แก่ *Globba racemosa* Sm. และ *G. sessiliflora* Sims. หงส์เหินในกลุ่มนี้เป็นหงส์เหินที่ถูกรายงานว่าไม่มีรยางค์อับเรณู และถูกจัดอยู่ใน Section *Haplanthera* (Schumann, 1904; Larsen, 1972; Williams *et al.*, 2004)

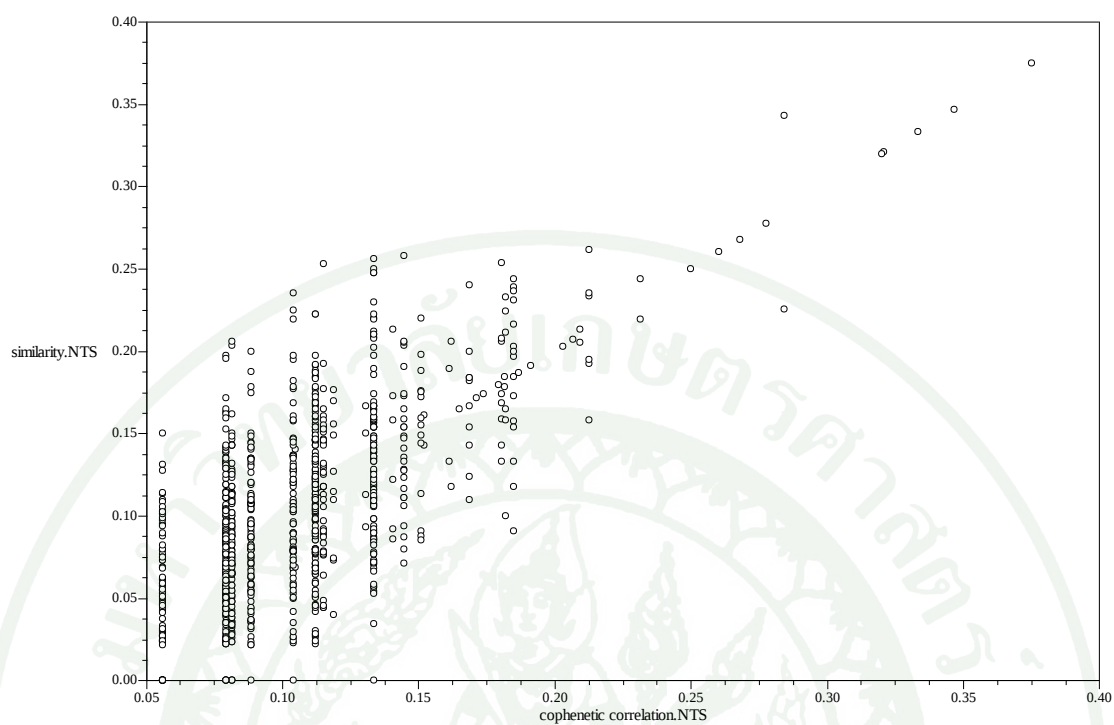
เมื่อทำการตรวจสอบค่าความถูกต้องของการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation พบว่าค่า cophenetic correlation มีค่าเท่ากับ 0.674 ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้ความหมายว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียว และแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 16)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหงส์เหินจากข้อมูลการวิเคราะห์โดยวิธีเอเอฟแอลพีเปรียบเทียบกับกรจำแนกโดยใช้จำนวนรยางค์อับเรณูซึ่งจำแนกหงส์เหินออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่กลุ่ม A คือกลุ่มที่ไม่มีรยางค์อับเรณูกลุ่ม B คือกลุ่มที่มีรยางค์อับเรณูเท่ากับ 2 และกลุ่ม C คือกลุ่มที่มีรยางค์อับเรณูเท่ากับ 4 (ปิยเกษตรและคณะ, 2555) หรือเปรียบเทียบกับกรจำแนกของ Schumann (1904), Larsen (1972) และ Williams *et al.* (2004) พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันและผลจากงานวิจัยครั้งนี้ยังช่วยสนับสนุนข้อมูลการจำแนกหงส์เหินในอดีตโดยเฉพาะใน

กลุ่ม Section *Globba* และ Section *Nudae* ซึ่งส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันในแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนอกจากนี้ผลการวิจัยยังสามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหงส์เหิน *Globba* sp. ต่างๆ เช่น *Globba* sp. No.2, *Globba* sp. No.4, *Globba* sp. No.5, *Globba* sp. No.6, และ *Globba* sp. No.9 (ภาคผนวก) ที่ทำการเก็บรวบรวมมาศึกษาวิจัยในครั้งนี้โดยที่ยังไม่ทราบรายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้อีกด้วย ในอนาคตหากมีข้อมูลจากงานวิจัยเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำนวนโครโมโซมของหงส์เหินและการใช้เทคนิคทางอนุชีวโมเลกุลเช่น ISSR เข้ามาเพิ่มเติมในการจำแนกหงส์เหินก็จะช่วยให้การจำแนกพืชมีความแม่นยำและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น



ภาพที่ 20 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหงส์เหินทั้ง 45 ตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA และวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมด้วยวิธี Dice



ภาพที่ 21 การวิเคราะห์ค่า Cophenetic correlation (r) และกราฟการกระจายตัวของตัวอย่าง
หงส์เหินทั้ง 45 ตัวอย่าง

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหงส์เหิน 45 ตัวอย่างในประเทศไทย โดยเทคนิค AFLP ใช้ไพรเมอร์ชนิด *EcoRI* และ *MseI* จำนวน 10 คู่ จากไพรเมอร์ทั้งหมด 15 คู่ แต่ละคู่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความยาวคู่เบสไม่เกิน 1,000 คู่เบส พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 624 แถบ โดยเฉลี่ย 62.4 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ มีเปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic band) อยู่ที่ 38.14-64.15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคู่ไพรเมอร์มีเปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างเฉลี่ย 47.77 เปอร์เซ็นต์ โดยคู่ไพรเมอร์ระหว่าง E-ACG กับ M-CTG ให้เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างมากที่สุดคือ 64.15 แถบ

เมื่อคำนวณค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity index) ระหว่างหงส์เหินทั้ง 45 ตัวอย่าง โดย Dice's coefficient พบว่ามีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1.00 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.2 สามารถใช้อธิบายถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างได้ นำค่าดัชนีความเหมือนดังกล่าวมาวิเคราะห์โดยวิธี UPGMA เพื่อสร้างแผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหงส์เหินทั้ง 45 ตัวอย่าง พบว่าจากแผนผังแสดงความสัมพันธ์สามารถแบ่งหงส์เหินออกได้ 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดประกอบด้วย 33 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 3 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 3 มี 3 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 4 มี 4 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ 5 มี 2 ตัวอย่าง

ข้อมูลที่ได้จากการจัดกลุ่มด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหงส์เหินในประเทศไทยได้ เมื่อพิจารณาพร้อมกับข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ สามารถจัดกลุ่มหงส์เหินได้ละเอียดขึ้น โดยพบว่าหงส์เหินในแต่ละกลุ่มมีลักษณะบางประการที่คล้ายคลึงกันภายในกลุ่ม เช่น จำนวนรยางค์อับเรณู ลักษณะรยางค์อับเรณู และลักษณะช่อดอก

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหงส์เหินครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ร่วมกับงานวิจัยด้านอื่นๆ เช่น การจัดจำแนก การระบุชนิด การปรับปรุงพันธุ์ และอื่นๆ เพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพในการผลิตหงส์เหิน

ในอนาคตหากมีข้อมูลจากงานวิจัยเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซมของหงส์เหิน และการใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล เช่น ISSR เข้ามาเพิ่มเติมในการจำแนกหงส์เหิน ก็จะช่วยให้การจำแนกหรือจัดกลุ่มพืชมีความแม่นยำและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กัลยา ปานคง. 2546. **สัณฐานวิทยาและรูปแบบไอโซไซม์ของพืชสกุลหงส์เหิน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- กฤษณา วงศ์ปัญญา. 2548. **การจำแนกสายพันธุ์ป่าโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- กำป็น ธรรมสนธิ. 2541. **การเจริญเติบโตของพืชสกุลหงส์เหินบางชนิด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ดวงกมล ทองอร่าม วุฒพงษ์ มหาคำ และคทาวัช นามดี. 2548. การจำแนกพืชสกุล *Caulokaempferia* K. Larsen (วงศ์ขิง) โดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล. *วารสารวิจัยมข.* 10 (1): 5-12
- เนตรวิไล โชติรัตน์ 2548. **สัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยา เซลล์วิทยา และการเจริญของดอกของหงส์เหินที่รวบรวมจากเขตอำเภอ ดอยสะเก็ดและกิ่งอำเภอแม่อ่อนจังหวัดเชียงใหม่**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วีระอนงค์ คำศิริ. 2545 **วงจรการเจริญเติบโตของหงส์เหิน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2540. การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล, น. 57-82. ใน *ธีรชัย ชนานันต์ (ผู้รวบรวม)*. การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ:ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอล-พี**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 116 น.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

ปิยเกษตร สุขสถาน พชรียา บุญกอแก้ว และ ทยา เจนจิตติกุล. 2555. โครงการวิจัยย่อยฯ การรวบรวมคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์พืชสกุลหงส์เหิน (*Globba*) ที่มีศักยภาพเชิงการค้า, น. 33-154. ใน พชรียา บุญกอแก้ว ผู้รวบรวม. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์การพัฒนาพืชวงศ์จิงเพื่อการส่งออก. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.). กรุงเทพฯ.

ปราโมทย์ ไตรบุญ และ พชรียา บุญกอแก้ว. 2556. ตอนที่ 3 ทรัพยากรชีวภาพพืชวงศ์จิง บทที่ 8.1 พันธุ์ป่า. ใน พชรียา บุญกอแก้ว ผู้รวบรวม. **บัญชีรายการทรัพยากรชีวภาพพืชวงศ์จิง**. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.). กรุงเทพฯ.

อรรถัน มงคลพร. 2548. **เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช**. จัดสนทวงศ์ การพิมพ์, กรุงเทพฯ

อรรณณ วิชัยลักษณ์ และสุนทรี เรืองศรี. ม.ป.ป. **หงส์เหิน(ดอกเข้าพรรษา)**. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

อารมณณ์ เผือกเก้ง. 2537. การสำรวจพืชพื้นล่างประเภทไม่มีเนื้อไม้ของป่าบริเวณทิศตะวันออกของดอยสุเทพที่ความสูง 670 ถึง 750 เมตร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อารีรัตน์ ขุนภิบาล 2553. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของป่า (*Alpinia* spp.) ที่ใช้บริโภคในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology** 26: 297-302.

- Horaninow, P. F. 1862. **Prodromus Monographie Scitaminearum**. Academiae Caesareae Scientiarum, Petropoli, Russia.
- Keeratinijakal, V., M. Kladmook and K. Laosatit. 2010. Identification and characterization of *Curcuma comosa* Roxb., phytoestrogens-producing plant, using AFLP markers and morphological characteristics. **Journal of Medicinal Plants Research**. 4(24): 2651-2657.
- Kladmook, M., S. Chidchenchey and V. Keeratinijakal. 2010. Assessment of genetic diversity in cassumunar ginger (*Zingiber cassumunar* Roxb.) in Thailand using AFLP markers. **Breed. Sci.** 60(4): 412-418.
- Kress, W. J., R. A. Deelipps, E. Farr and Y. Y. Kyi. 2003. A checklist of the trees, shrubs, herbs, and climbers of Myanmar. **Contributions from the United States National Herbarium**. 45: 1-590.
- Kress, W. J., L. M. Prince and K. J. Williams. 2002. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. **Amer. J. Bot.** 89: 1682-1696.
- Lestiboudois, T. 1841. Observations sur les Musacees, les Scitaminees, les Cannees, et les Orchidees. **Annales des sciences naturelles, botanique**. 15: 305-349.
- Larsen, K. 1996. A preliminary checklist of the Zingiberaceae of Thailand. Thai Forest Bulletin, **Botany**. 24: 35-49.
- Larsen, K. 1972. Studies in the genus *Globba* in Thailand. Notes from the Royal Botanic Garden, **Edinburgh**. 31: 229-241.
- Qian, Y.Y. 1994. *Globba lancagensis*. In Flora of China [Online], 24 : 359. Available : <http://www.efloras.org/florataxon.aspx.html>.

- Rohlf, F.J. 2002. NTSYS pc: Numerical Taxonomy System, Version 2.1. Exeter Publishing, Setauket, New York.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning**. 2nd Edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schumann, K. 1904. **Zingiberaceae**. In A. Eagler (ed.), Das Pflanzenreich 4 (46): 1-458. Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany.
- Sneath, P.H.A., and R.R.Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. W.H. Freeman, San Francisco.
- Takano, A. 2001. Cytological analyses of 19 taxa in *Globba* (Zingiberaceae). **Acta Phytaxonomica et Geobotanica**. 52: 65-74.
- Takano, A. and H. Okada. 2002. Multiple occurrences of triploid formation in *Globba* (Zingiberaceae) from molecular evidence. **Plant Systematics and Evolution**. 230:143-159.
- Techaprasan J., S. Klinbunga and T. Jenjittikul. 2008. Genetic relationships and species authentication of *Boesenbergia* (Zingiberaceae) in Thailand based on AFLP and SSCP analyses. **Biochemical Systematics and Ecology**. 36: 408-416
- Techaprasan, J. , S. Klinbunga, C. Ngamriabsakul and T. Jenjittikul. 2010. Genetic variation of *Kaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand based on chloroplast DNA (psbA-trnH and petA-psbJ) sequences. **Genetics and Molecular Research**. 9 (4): 1957-1973
- Vanijajiva, O. , P. Sirirugsab, W. Suvachittanont. 2005. Confirmation of relationships among *Boesenbergia* (Zingiberaceae) and related genera by RAPD. **Biochemical Systematics and Ecology**. 33 159–170

Vos , P. R. , M. Hogers , M. Bleeker , T. van de Lee Rijans , M. Hornes , A. Frijters , J. Pot , M. Kuiper , and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**. 23 : 4407–4414.

Vos, P. and M. Kuiper. 1997. AFLP analysis, pp. 115-131. In G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff, eds. **DNA Makers: Protocols, Application and Overviews**. Wiley-Liss, Inc., New York.

William, J. K., J. W. Kress and P. S. Manos. 2004. The phylogeny, evolution, and classification of the genus *Globba* and tribe Globbeae (Zingiberaceae): appendages do matter. **Amer. J. Bot.** 91 (1): 100-114.

Wahyuni, S., D.H. Xu, N. Bermawie, H. Tsunematsu and T. Ban. 2003. Genetic relationship among ginger accessions based on AFLP marker. **Biotechnologi pertanian**. 8 (2): 60-68

Xia, Y.M., W. John kress. and L. M. Prince. 2004. Phylogenetic Analyses of Amomum (Alpinioideae: Zingiberaceae) Using ITS and matK DNA Sequence Data Systematic Botany. **Systematic Botany**. 29 (2): 334–344



ตารางผนวกที่ 1 รายชื่อตัวอย่างหงส์เหินที่มีการเปลี่ยนแปลง

ชื่อตัวอย่าง (เดิม)	ชื่อตัวอย่าง (ใหม่)
<i>Globba</i> sp. ม่วง (น้ำออกฐ)	<i>Globba</i> sp. No.1
<i>Globba</i> sp.ชาติตระการ	<i>Globba</i> sp. No.2
<i>Globba</i> sp. เหลืองระนอง	<i>Globba</i> sp. No.3
<i>Globba</i> sp. น่าน	<i>Globba</i> sp. No.4
<i>Globba</i> sp. ชำบอนสูง	<i>Globba</i> sp. No.5
<i>Globba</i> sp. ภูหิน	<i>Globba</i> sp. No.6
<i>Globba</i> sp. ส้มแดง	<i>Globba</i> sp. No.7
<i>Globba</i> sp. ภูลังก้าก้านแดง	<i>Globba</i> sp. No.8
<i>Globba</i> sp. ปาร์ก	<i>Globba</i> sp. No.9
<i>Globba</i> sp. ดอกขาน้ำพุคัทปาลาว	<i>Globba</i> sp. No.10
<i>Globba adhaerens</i> Gagnep. สีชมพู	<i>Globba adhaerens</i> Gagnep. No.1
<i>Globba adhaerens</i> Gagnep. สีขาว	<i>Globba adhaerens</i> Gagnep. No.2
<i>Globba rosea</i> ขอนแก่น สีขาว	<i>Globba rosea</i> Gagnep. No.1
<i>Globba rosea</i> Gagnep. ขอนแก่น สีม่วง	<i>Globba rosea</i> Gagnep. No.2
<i>Globba siamensis</i> Hemsl. สีขาว	<i>Globba siamensis</i> Hemsl. No.1
<i>Globba siamensis</i> Hemsl. สีแดง	<i>Globba siamensis</i> Hemsl. No.2

ภาพผนวกที่ 1 รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 1.1,

หมายเลข 1 คือ *Globba obscura* K. Larsen,

หมายเลข 2 คือ *G. reflexa* Craib,

หมายเลข 3 คือ *G. marantina* L.,

หมายเลข 4 คือ *G. villosula* Gagnep.,

หมายเลข 5 คือ *G. winitii* C.H.Wright,

หมายเลข 6 คือ *G. laeta* K. Larsen ,

หมายเลข 7 คือ *G. adhaerens* Gagnep. No.1,

หมายเลข 8 คือ *Globba* sp. No.9,

หมายเลข 9 คือ *G. siamensis* Hemsl. No.2,

หมายเลข 10 คือ *G. adhaerens* Gagnep. No.2

หมายเลข 11 คือ *G. williamsiana* M.F. Newman,

หมายเลข 12 คือ *G. siamensis* Hemsl No.1,

หมายเลข 13 คือ *G. barthei* Gagnep.,

หมายเลข 14 คือ *G. magnifica* M.F. Newman,

หมายเลข 15 คือ *G. colpicola* K. Schum ,

หมายเลข 16 คือ *Globba* sp. No.6,

หมายเลข 17 คือ *G. rosea* Gagnep. No.2,

หมายเลข 18 คือ *G. schomburgkii* Hook. f.,

หมายเลข 19 คือ *Globba* sp. No.5,

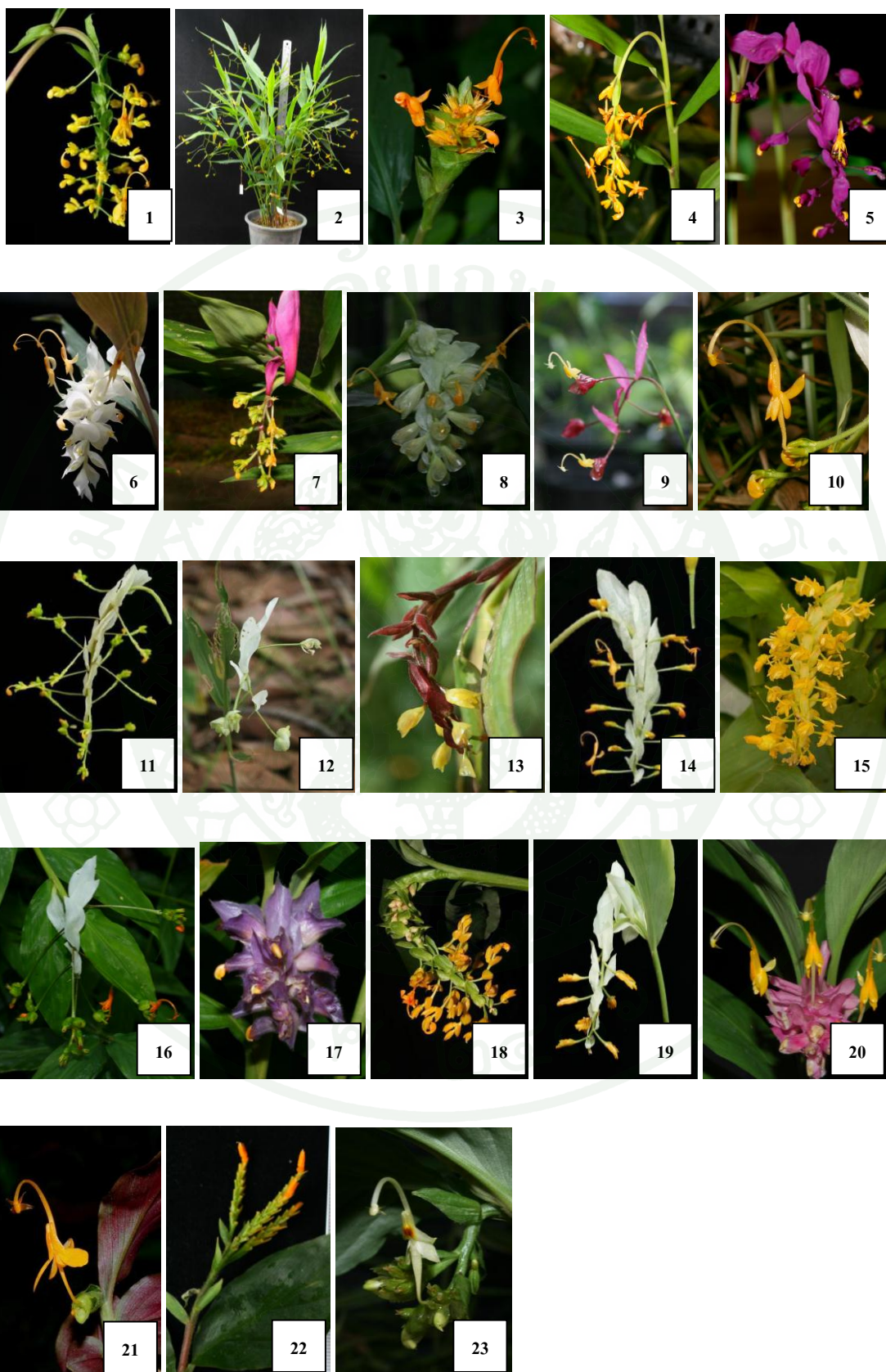
หมายเลข 20 คือ *G. globulifera* Gagnep.,

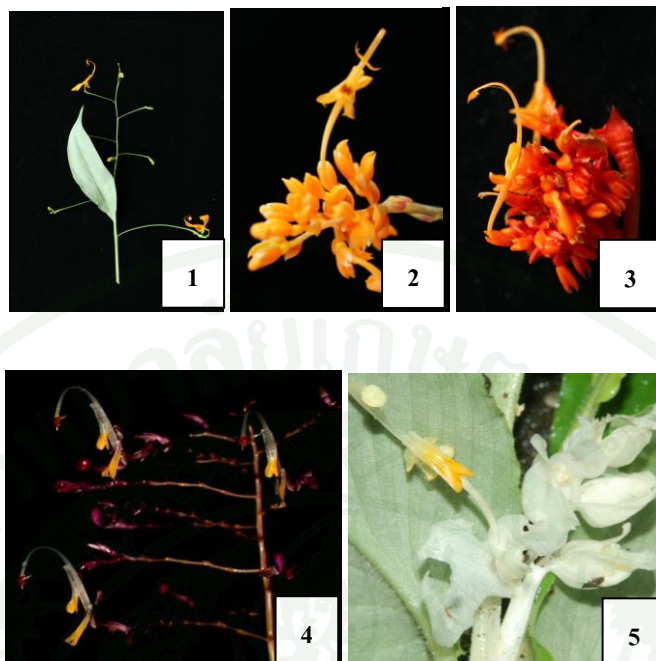
หมายเลข 21 คือ *Globba* sp. No.2,

หมายเลข 22 คือ *G. purpurascens* Craib, และ

หมายเลข 23 คือ *G. fragilis* S.N. Lim.

ที่มาภาพ : ปิยะเกษตร และคณะ (2555)





ภาพผนวกที่ 2 รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 1.2 ;

หมายเลข 1 คือ *Globba flagellaris* K. Larsen,

หมายเลข 2 คือ *Globba cernua* Baker,

หมายเลข 3 คือ *Globba* sp. No.7,

หมายเลข 4 คือ *Globba leucantha* Mig., และ

หมายเลข 5 คือ *Globba substrigosa* King ex Baker, และ

ที่มา : ปิยะเกษตร และคณะ (2555)



ภาพผนวกที่ 3 รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 1.3 ;

หมายเลข 1 คือ *Globba* sp. No.1,

หมายเลข 2 คือ *Globba tricolor* Ridl. และ

หมายเลข 3 คือ *Globba rosea* Gagnep. No.1

ที่มา : ปิยะเกษตร และคณะ (2555)



ภาพผนวกที่ 4 รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 2 ;

หมายเลข 1 คือ *Globba pendula* Roxb.,

หมายเลข 2 คือ *Globba geoffrayi* Gagnep., และ

หมายเลข 3 คือ *Globba expansa* Wall. Ex Horan

ที่มา : ปิยะเกษตร และคณะ (2555)



ภาพผนวกที่ 5 รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 3 ,
 หมายเลข 1 คือ *Globba nisbetiana* Criab,
 หมายเลข 2 คือ *Globba* sp. No.8,
 หมายเลข 3 คือ *Globba* sp. No.4, และ
 ที่มาภาพ : ปิยะเกษตร และคณะ (2555)



ภาพผนวกที่ 6 รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 4 ;
 หมายเลข 1 คือ *Globba paniculata* Valenton และ
 หมายเลข 2 คือ *Globba. xantholeuca* Criab
 ที่มาภาพ : ปิยะเกษตร และคณะ (2555)



ภาพผนวกที่ 7 รูปร่างช่อดอกของหงส์เหินในกลุ่มที่ 5 ;

หมายเลข 1 คือ *Globba racemosa* Sm. และ

หมายเลข 2 คือ *Globba sessilifora* Sims.

ที่มาภาพ : ปิยะเกษตร และคณะ (2555)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวปิติมา พุ่มพวง
เกิดวันที่	6 สิงหาคม 2530
สถานที่เกิด	จังหวัดชุมพร
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	รางวัลการนำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ดีเยี่ยมด้านพืช เรื่อง ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหงส์เหิน 45 ตัวอย่างโดยเทคนิค AFLP ในการประชุมวิชาการ และนำเสนอผลงานวิจัยพืชเขตร้อนและกึ่งร้อน ครั้งที่ 7