

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเพิ่มปริมาณต้นเอื้องดิน  
ถิ่นไทยและดอกดินเมืองกาญจน์ในหลอดทดลอง

(ภาษาอังกฤษ) Study of genetic variation and micropropagation of *Ipsea  
thailandica* Seidenf. and *Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Skornick

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2556 จำนวน 952,160.- บาท (เก้าแสนห้าหมื่นสองพันหนึ่งร้อยหกสิบ  
บาทถ้วน)

ระยะทำการวิจัย 1.5 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อเดือน พฤษภาคม 2557 ถึง พฤศจิกายน 2557

ชื่อผู้วิจัย หน่วยงานและผู้ดำเนินการวิจัยพร้อมหน่วยงานที่สังกัดและหมายเลขโทรศัพท์

1. หัวหน้าโครงการ

หัวหน้าโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. ครรชิต ธรรมศิริ

หน่วยงาน ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม

ที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

โทรศัพท์ 02-201-5232

โทรสาร 02-354-7172

E-mail [scktr@mahidol.ac.th](mailto:scktr@mahidol.ac.th)

2. ผู้ร่วมงานวิจัย

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

รองศาสตราจารย์ ดร. พวงผกา อัมพันธ์จันทร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. งามนิจ ชื่นบุญงาม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทยา เจริญจิตติกุล

นางอัจฉรา เมืองครุฑ

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม

โทรศัพท์ 02-441-9003-7 ต่อ 1368 โทรสาร 02-441-9906

รองศาสตราจารย์.ดร. กนกพร ไตรวิทย์การ

ดร. ศุภจิต สระเพชร

ดร. สุขุมาล หวานแก้ว

สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร วิทยาเขตกาญจนบุรี มหาวิทยาลัยมหิดล

ดร. ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร

### บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการสำรวจและรวบรวมพันธุ์เอื้องดินถิ่นไทยและดอกดินเมืองกาญจน์ เพื่อเก็บรักษาพันธุ์เดิม กำหนดวิธีขยายพันธุ์เอื้องดินถิ่นไทยและดอกดินเมืองกาญจน์ โดยวิธีในหลอดทดลองและพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่จำเพาะต่อเอื้องดินถิ่นไทยและดอกดินเมืองกาญจน์ และนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชดังกล่าว จากการสำรวจและรวบรวมพันธุ์พบเอื้องดินถิ่นไทยที่อำเภอสังขละบุรี จังหวัดกาญจนบุรี และดอกดินเมืองกาญจน์ที่บ้านอู่ล่ง อำเภอทองผาภูมิ หมู่บ้านลิเจีย อำเภอสังขละบุรี และเขื่อนวชิราลงกรณ์ อำเภอสังขละบุรี จังหวัดกาญจนบุรี การขยายพันธุ์เอื้องดินถิ่นไทยในหลอดทดลอง ทำการตัดตายอดเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2MS จนเกิดเป็นต้นอ่อน จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร 1/2MS เพื่อให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ เมื่อต้นสูงจากโคนถึงปลายใบประมาณ 15 ซม. ตัดให้เหลือโดยประมาณ 3 ซม. แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร 1/2MS ที่เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในเวลา 3 เดือนจะได้ยอดเพิ่มประมาณ 1-2 ยอดต่อชิ้นพืช สำหรับดอกดินเมืองกาญจน์ควรเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่จำเพาะต่อเอื้องดินถิ่นไทยและดอกดินเมืองกาญจน์ เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลเอื้องดินถิ่นไทยและชนิดอื่นๆ ของสกุล *Ipsea* ในฐานข้อมูล ในเบื้องต้น DNA barcode matK สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกพืชสกุล *Ipsea* ออกจากสกุลอื่นได้ สำหรับดอกดินเมืองกาญจน์ พบว่า ส่วน ITS2 และ psbA-trnH เป็น barcode ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกตัวอย่างดอกดินเมืองกาญจน์ออกจากพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกันได้

## ABSTRACT

The objectives of this project are to survey and collect *Ipsea thailandica* Seidenf. and *Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Skornick for conservation, micropropagation and develop Microsatellites for genetic markers and study genetic diversity. From survey and collection, *Ipsea thailandica* was found at Ampur Sangklaburi, Kanchanaburi province and *Curcuma candida* was found at Ban-U-Long, Ampur Thongpapoom; Mooban Ligia, Ampur Sangklaburi, and the Vachiralongkorn dam, Ampur Sangklaburi, Kanchanaburi province. For micropropagation of *Ipsea thailandica*, cut shoot tips and cultured in ½ MS liquid medium until plantlets developed. Then cultured on ½ MS agar medium to get the whole plantlets. Plantlets, 15 cm long from stem base to leaf tip, were cut at 3 cm from stem base, then cultured on ½ MS agar medium supplemented with 2 mg/l BA. After 3 months of culture, 1-2 shoots developed from each cut stem base. For *Curcuma candida*, shoot tips were cultured on MS agar medium supplemented with 4 mg/l BA for 8 weeks, then transferred to MS agar medium for 4 weeks. For Microsatellites for genetic markers, due to no information of *Ipsea thailandica* and other species in genus *Ipsea* database, in preliminary study, DNA barcode matK can be applied to identify genus *Ipsea* from other genera. For *Curcuma candida*, ITS2 and psbA-trnH are efficient to identify *Curcuma candida* from other species in the same genus.

## 1. บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

จากการสำรวจข้อมูลเบื้องต้นของโครงการความหลากหลายทางชีวภาพและการอนุรักษ์พันธุ์พืชใกล้สูญพันธุ์ พืชเฉพาะถิ่น พืชอาหาร พืชสมุนไพร และพืชที่มีศักยภาพเป็นไม้ดอกไม้ประดับในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช ในพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งเป็นโครงการย่อยในแผนงานวิจัย เรื่องการถ่ายทอดความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์พืชท้องถิ่นจังหวัดกาญจนบุรี ในการศึกษาที่ดำเนินการผ่านมามีพืชใกล้สูญพันธุ์ พืชอาหาร พืชสมุนไพร และพืชที่มีศักยภาพเป็นไม้ดอกไม้ประดับบางชนิดภายในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช ในพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดกาญจนบุรี เป็นจำนวนมากที่ยังไม่เป็นที่รู้จัก และเห็นคุณค่าจากคนในท้องถิ่น ตลอดจนยังไม่มี การอนุรักษ์พันธุกรรมพร้อม ๆ กับการขยายพันธุ์เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างแท้จริง (พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง และคณะ, 2554) และจากการที่ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อน ซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพโดยเฉพาะพันธุ์พืชจำนวนมาก ประมาณว่าน่าจะมีพันธุ์พืชไม่น้อยกว่า 15,000 ชนิด ซึ่งในปัจจุบันก็ยังมี การค้นพบพืชชนิดใหม่ของโลกจากป่าในหลายจังหวัดของประเทศไทยอยู่อย่างต่อเนื่อง ในท่ามกลางกระแสที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของสภาวะโลกร้อน การบุกรุกทำลายป่า การนำทรัพยากรมาใช้อย่างไม่คำนึงถึงคนรุ่นหลัง ทำให้แหล่งอาศัยของพืชถูกทำลายอย่างต่อเนื่อง และพืชจำนวนมากอยู่ในสภาวะใกล้สูญพันธุ์ ในจำนวนนั้นมีพืชหลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยาและหลายชนิดยังไม่ได้ทำการศึกษาวิจัย มีประมาณการว่า ถ้าการทำลายป่าในประเทศเขตร้อนยังคงดำเนินต่อไปในอัตราที่เป็นอยู่ขณะนี้ พืชอย่างน้อย 60,000 ชนิด (ประมาณ 1/4 ของจำนวนพืชทั้งโลก) อาจจะสูญพันธุ์ภายใน 50 ปีข้างหน้า (Hamann, 1988) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ได้ดำเนินการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชหายากชนิดต่าง ๆ ทั้งที่เป็นพืชใกล้สูญพันธุ์ พืชที่มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นไม้ดอกไม้ประดับ รวมถึงพืชที่มีศักยภาพทางด้านสมุนไพรไทยจากท้องถิ่นต่างๆ ของประเทศไทย ในรูปแบบการอนุรักษ์นอกสภาพธรรมชาติ (ex situ conservation) โดยเฉพาะเลี้ยงในโรงเรือนเพาะชำที่ศาลายา แต่จากปัญหาที่พบจากการอนุรักษ์พืชในสภาพนอกธรรมชาติ คือบางครั้งพืชที่นำมาจากสภาพป่าธรรมชาติเมื่อย้ายมาปลูกในโรงเรือนจะตาย เนื่องจากการเปลี่ยนสภาพแวดล้อม หรือเกิดการสูญเสียต้นพันธุ์จากภัยธรรมชาติ ดังนั้นเพื่อการลดการสูญเสียพืชจากแหล่งธรรมชาติ การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชด้วยวิธีในหลอดทดลอง (in vitro conservation) จึงสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถผลิตกล้าพันธุ์ในหลอดทดลองออกปลูกทดแทนได้ตามความต้องการ

โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะนำพืชที่เป็นพืชถิ่นเดียว (endemic plants, คือ พืชที่พบในธรรมชาติในบริเวณเขตภูมิศาสตร์เขตใดเขตหนึ่งของโลก มีเขตการกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์ค่อนข้างจำกัด) พืชหายาก (rare plants, ได้แก่พืชที่มีจำนวนประชากรขนาดเล็กมีความเสี่ยงที่จะเป็นพืชที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (endangered plants)) (ธวัชชัย สันติสุข, 2543) ที่ได้ผ่านการศึกษาในระยะแรกในจังหวัดกาญจนบุรี (พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง และคณะ, 2554) จำนวน 2 ชนิดได้แก่ เอื้องดินถิ่นไทย (*The Thai Ipsea*) (*Ipsea thailandica* Seidenf.) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Orchidaceae และดอกดินเมืองกาญจน์ (*Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Skornick.) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ที่จัดเป็นพืชถิ่นเดียว พืชหายากและใกล้สูญพันธุ์ หากสำรวจและเก็บตัวอย่างมาทำการศึกษา มาทำอนุรักษ์พันธุกรรมในหลอดทดลองพร้อม ๆ กับการขยายพันธุ์พืชดังกล่าวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และทำการสำรวจตัวอย่างพันธุ์พืชเพิ่มขึ้นเพื่อนำมาศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมโดยการทำ DNA fingerprint

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อร่วมสนองพระราชดำริ ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)

1.2.2 สำรวจและรวบรวมพันธุ์เอื้องดินถิ่นไทย (*Ipsea thailandica* Seidenf.) และดอกดินเมืองกาญจน์ (*Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Skornick.) เพื่อเก็บรักษาพันธุ์เดิม

1.2.3 กำหนดวิธีขยายพันธุ์เอื้องดินถิ่นไทย (*Ipsea thailandica* Seidenf.) และดอกดินเมืองกาญจน์ (*Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Skornick.) โดยวิธีในหลอดทดลอง

1.2.4 พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ที่จำเพาะต่อเอื้องดินถิ่นไทย (*Ipsea thailandica* Seidenf.) และดอกดินเมืองกาญจน์ (*Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Skornick.) และนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชดังกล่าว

## 1.3 ขอบเขตการวิจัย

สำรวจ รวบรวม และขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของพืชทั้ง 2 ชนิด เท่าที่สามารถดำเนินการหาได้ภายใต้งบประมาณ เพื่อเก็บรักษาพันธุ์เดิม รวมทั้งพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ที่จำเพาะต่อพืชและนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายพันธุกรรม

## 1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดกาญจนบุรี เป็นพื้นที่เขตปกปักพันธุกรรมพืช โดยเฉพาะในพื้นที่ที่อยู่ในความรับผิดชอบของกองการเกษตรและสหกรณ์สำนักงานทหารพัฒนาหน่วยบัญชาการทหารพัฒนาซึ่งมีเนื้อที่ 20,525 ไร่ และพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นเทือกเขาหินปูนทั้งหมด ไม่มีพื้นที่ราบที่กว้างมากนัก จะมีเฉพาะตามหุบเขา ซอกภูเขา หรือช่องเล็กๆ ลึกลงไป (Sink hole) ช่องที่ลึกเหล่านี้จะให้ความชุ่มชื้นและร่มเงา (บริเวณนี้เป็นสังคมพืชป่าดิบแล้ง) โดยมียอดสูงสุดประมาณ 560 เมตร จากระดับน้ำทะเล มีลักษณะเด่นที่เรียกว่า ระบบนิเวศวิทยาเฉพาะถิ่น เป็นระบบนิเวศวิทยาของเทือกเขาหินปูน ประกอบกับบริเวณเหล่านี้มักมีความชุ่มชื้นและร่มเงาทำให้เกิดสภาพปราศจากไฟป่าปัจจัยหลายอย่างที่เกื้อกูล ทำให้ต้นไม้หลายชนิดเจริญงอกงามซึ่งโดยปกติพรรณไม้ที่พบมักจะเกิดขึ้นในป่าดิบชื้นที่ปราศจากสิ่งรบกวน เกิดสภาพที่มีสัตว์ป่าหายาก อาศัยอยู่โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สัตว์ป่าสงวน ได้แก่ เลียงผา และไก่ฟ้าหางลายขวาง รวมทั้งสัตว์ชนิดอื่น ๆ และนอกจากนี้ยังมีพืชเฉพาะถิ่นที่ไม่พบแห่งใดในประเทศไทย จะมีเฉพาะที่ เช่น สกุลงองเท้านารี นอกจากนี้ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในจังหวัดกาญจนบุรียังพบพืชหายากหลายชนิดเช่น เอื้องดินถิ่นไทย และดอกดินเมืองกาญจน์ ดังนั้นการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชและการศึกษาทางพันธุกรรมของพืชเฉพาะถิ่น พืชหายากจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อพืชชนิดนี้ รวมถึงข้อมูลด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในกลุ่มเดียวกัน เพื่อประโยชน์ต่อการวางแผนอนุรักษ์สายพันธุ์พืชเหล่านี้วิธีการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพในการขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมาก ในระยะเวลาสั้น จึงถูกนำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดใดชนิดหนึ่งให้สำเร็จนั้นจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น การทำให้ชิ้นพืชปลอดเชื้อ การศึกษาสาร

ควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงไปตามวัตถุประสงค์ เช่น ชักนำให้เกิดยอดใหม่ในปริมาณมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ เอื้องดินถิ่นไทยสกุล และดอกดินเมืองกาญจน์ การอนุรักษ์พันธุกรรมจำเป็นต้องเกิดควบคู่ไปกับการศึกษา พันธุกรรมของพืชดังกล่าว ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโคร แซทเทลไลท์ที่จำเพาะต่อพืชจึงเป็น สิ่งจำเป็นที่หลีกเลี่ยงไม่ได้เนื่องจากเป็นพื้นฐานสำคัญในการนำไปใช้วิเคราะห์จำแนกพันธุกรรมที่แท้จริงของ พืช และสามารถนำไปใช้ต่อยอดเพื่อระบุประวัติของพืชได้ต่อไปในอนาคต แต่การศึกษาพันธุกรรมของพืช จำเป็นต้องอาศัยการเปรียบเทียบกับพืชจากแหล่งต่าง ๆ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จะไม่สมบูรณ์ ถ้าขาดการสำรวจ และรวบรวมพันธุ์พืชศึกษา ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงทำการสำรวจ รวบรวม อนุรักษ์พันธุ์พืชหายากในหลอด ทดลอง และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชทั้ง 2 ชนิด

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

- 1.5.1 ได้ต้นดอกเอื้องดินถิ่นไทย และดอกดินเมืองกาญจน์ จากการสำรวจและรวบรวมเพื่อ เก็บรักษาพันธุ์เดิมบางส่วนไว้ในเรือนเพาะชำ
- 1.5.2 ได้เทคนิคการขยายพันธุ์ต้นเอื้องดินถิ่นไทย และดอกดินเมืองกาญจน์ ในหลอดทดลอง เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการขยายพันธุ์ต่อไป
- 1.5.3 ได้ต้นพันธุ์ปลอดเชื้อของเอื้องดินถิ่นไทย และดอกดินเมืองกาญจน์
- 1.5.4 ได้เครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อนำมาศึกษาเปรียบเทียบถึงระดับพันธุกรรมของดอก เอื้องดินถิ่นไทย และดอกดินเมืองกาญจน์ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการอนุรักษ์พันธุ์พืชทั้ง 2 ชนิดนี้ ต่อไปอีกด้วย
- 1.5.5 ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ และนำเสนอผลการวิจัยในการสัมมนาในระดับชาติ/นานาชาติ หรือมี บทความตีพิมพ์ในวารระดับชาติ/นานาชาติ ไม่น้อยกว่า 2 เรื่อง

## 2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

จากสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศของประเทศไทย ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ ทำให้ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายของชนิดพันธุ์กล้วยไม้มากมาย โดยพบกล้วยไม้ประมาณ 180 สกุล และ 1,200 ชนิด กระจายอยู่ทั่วประเทศ กล้วยไม้ของประเทศไทยเป็นที่ต้องการของทั่วโลก เนื่องจากมีความสวยงามและมีลักษณะเฉพาะตัวที่แตกต่างไปจากกล้วยไม้ประเทศอื่น ปัจจุบันประชากรของ กล้วยไม้ไทยได้ลดจำนวนลง เนื่องจากสภาพแวดล้อมและสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงไป มีการตัดไม้ทำลายป่า และมีการนำกล้วยไม้ออกจากป่าเพื่อทำการค้า โดยเฉพาะพันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและเป็นที่ ต้องการของตลาด ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการอนุรักษ์สายพันธุ์กล้วยไม้รวมทั้งขยายและปรับปรุงสาย พันธุ์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนพร้อมทั้งมิให้สูญเสียดังเดิม

เอื้องดินถิ่นไทย (*Ipsea thailandica* Seidenf.) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Orchidaceae จัดอยู่ใน จำพวกกล้วยไม้ดินขนาดเล็กและเป็นพืชเฉพาะถิ่นของไทย และพืชหายาก มีลำต้นเป็นหัวขนาดเล็ก รูปกรวย กว้างและยาวประมาณ 3 เซนติเมตร สีเทาอมน้ำตาลอ่อน แตกหน่ออ่อน ใบเดี่ยว เรียงสลับ 2-3 ใบ รูปแถบ แกมรูปใบหอกแคบ ดอกออกก่อนการเจริญเติบโตของใบ ดอกช่อ แบบช่อกระจุก ยาว 10-20 เซนติเมตร ก้าน

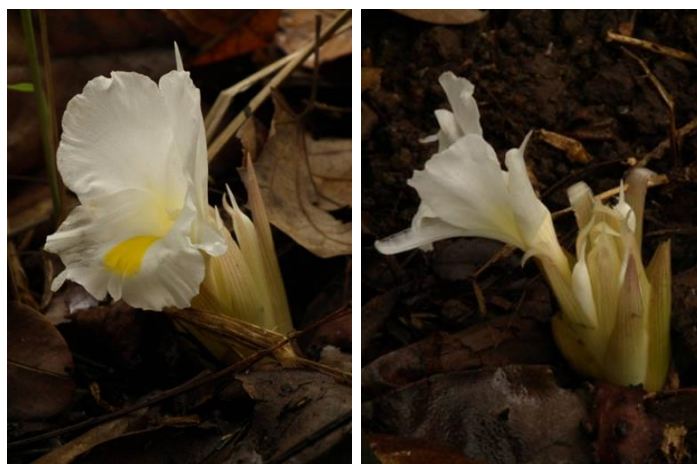
ช่อดอกมีกาบใบ 2-3 กาบ สีม่วงแดงคล้ำ มีขน ก้านช่อดอกมีขนสั้นปกคลุม จำนวนดอก 2-5 ดอก ดอกมีกลิ่น คาว กว้างประมาณ 3 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงบนรูปใบหอก กลีบเลี้ยงคู่ข้างรูปเสี้ยว ปลายเรียวแหลม สีเหลืองแกมน้ำตาลอ่อน กลีบดอกคู่ข้างรูปแถบแกมใบหอกแคบ สีเหลืองแกมน้ำตาลอ่อน กลีบปากหยักเป็น 3 แฉก พูข้างรูปสามเหลี่ยมกลับแคบยาว โค้งขึ้น สีเหลืองแกมน้ำตาลอ่อน ขอบบนมักมี แถบและแต้มสีม่วงแดง พูกลางรูปใบหอกแคบ โคนสีเกือบขาว ปลายสีเหลืองแกมน้ำตาลอ่อน ด้านนอกกลีบ เลี้ยงและกลีบดอกมีขนสั้นปกคลุม anther cap สีเขียวแกมเหลือง เส้าเกสรรูปกึ่งทรงกระบอก แบน ตั้งขึ้น สี เหลืองแกมน้ำตาลอ่อน มีแต้มสีม่วงแดง (ภาพที่ 1) ผลเป็นฝักแห้งแตก รูปไข่กลับ ระยะเวลาออกดอกราว เดือนธันวาคม-มกราคม มีการกระจายพันธุ์ที่จังหวัดกาญจนบุรี สำหรับการใช้ประโยชน์นั้นได้แก่การใช้เป็น ไม้ดอกไม้ประดับ ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตลูกผสมพันธุ์ใหม่ (พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง และคณะ, 2554) และเนื่องจากดอกมีความสวยงามจึงพบว่ามีการจำหน่ายในท้องถิ่นบ้าง แต่เพราะเหตุที่เป็นพืชหายากและพบใน ปริมาณน้อย จึงไม่เป็นที่แพร่หลายพร้อมทั้งมีโอกาสสูญพันธุ์สูง ถ้านำมาขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมาก ๆ ก็มี ศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นไม้ดอกไม้ประดับต่อไป รวมถึงศึกษาเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อเป็น หลักฐานยืนยันประวัติของพืช และจากการดำเนินการในโครงการศึกษาที่ผ่านมา ทางคณะผู้วิจัยได้ตัวอย่าง ปลอดภัยของเอื้องดินถิ่นไทยจำนวนหนึ่ง ซึ่งในขณะนี้ทางโครงการกำลังตรวจสอบการปลอดภัยอีกระยะหนึ่ง ก่อนนำไปขยายพันธุ์โดยทดสอบสูตรอาหารชนิดต่างๆ พร้อมทั้งทดสอบชนิดและปริมาณของสารควบคุมการ เจริญเติบโตเพื่อขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากต่อไป



ภาพที่ 3-1 เอื้องดินถิ่นไทย (*Ipsea thailandica* Seidenf.)

สำหรับดอกดินเมืองกาญจน์ (*Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Skornick.) นี้ เดิมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia candida* (Wall) Skornick & Techaprasan แต่จากการศึกษา พบว่าพืชชนิดนี้มีลักษณะทางอนุชีววิทยาอยู่ในกลุ่มของ *Curcuma* (Techaprasan & Skornick, 2011)

ทั้งนี้ดอกดินเมืองกาญจน์เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) และเป็นพืชหายากในประเทศไทย เป็นไม้เนื้ออ่อนอายุหลายปี สูง 0.6-1 เมตร พักตัวในหน้าแล้ง มีลำต้นใต้ดินเป็นเหง้าสั้นรูปไข่แคบ มีรากลักษณะคล้ายเส้นลวดยาว ปลายพองสะสมอาหารเป็นหัวรูปทรงกระบอก หรือรูปไข่ สีน้ำตาลอ่อน ใบ 4-5 ใบ ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปใบหอกแคบ กว้าง 10-15 เซนติเมตร ยาว 20-30 เซนติเมตร โคนใบและปลายใบแหลม สีเขียว บางครั้งเส้นกลางใบสีม่วงแดง ดอกออกเป็นช่อ โดยตรงจากลำต้นใต้ดิน ก่อนมีการเจริญเติบโตของต้นและใบ ก้านช่อดอกสั้น มักอยู่ใต้ดิน ช่อดอกรูปไข่แคบหรือรูปคล้ายรูปกล้วย ประกอบด้วยใบประดับจำนวนมาก รูปไข่ รูปใบหอกแคบ รูปแถบแกมรูปใบหอก แต่ละดอกมีใบประดับย่อยรองรับ กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็น 3 ซี่ สีขาว กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอดแคบ ปลายแยกเป็น 3 กลีบ สีขาว บางครั้งปลายกลีบสีชมพูอ่อน เกสรเพศผู้เป็นหมัน ด้านข้างคล้ายกลีบดอก รูปไข่กลับกว้าง ขอบเป็นคลื่น สีขาว เกสรเพศผู้เป็นหมันคล้าย กลีบปากรูปกึ่งสามเหลี่ยม ปลายหยักลึกเป็น 2 พู สีขาว มีแถบกลางกว้าง สีเหลืองเข้ม จากโคนถึงปลายรอยหยัก เกสรเพศผู้ 1 อัน เนื้อเยื่อเหนียวเป็นแผ่น สีขาว รังไข่ใต้วงกลีบ ผลแห้งแตก รูปไข่กลับหรือรูปกระบอก เมล็ดสีน้ำตาล มีเนื้อหุ้มเมล็ดเป็นริ้วสีขาว (ภาพที่ 3) ดอกดินเมืองกาญจน์มีระยะเวลาออกดอกในระหว่างเดือนมีนาคม-เมษายน พบอยู่ในระบบนิเวศน์แบบป่าเบญจพรรณผสมป่าไผ่ และมีการกระจายพันธุ์ตั้งแต่ สาธารณรัฐแห่งสหภาพพม่า ประเทศไทย และสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยในไทยพบที่จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดตาก มีประโยชน์ดังนี้ ชาวบ้านในจังหวัดกาญจนบุรี โดยเฉพาะไทโยค ทองผาภูมิ ใช้ช่อดอกอ่อนรับประทานเป็นผัก ลวกจิ้มน้ำพริก ผัด หรือแกงจืด โดยจะมีช่อดอกขายที่ตลาดทองผาภูมิ ช่วงเดือนมีนาคมหรือเมษายน และเนื่องจากดอกมีความสวยงามและพบว่ามีจำหน่ายในท้องถิ่นบ้าง แต่เนื่องจากเป็นพืชหายาก โดยติดอยู่ในบัญชีแดงของ IUCN (IUCN Red list, 2013) พบในปริมาณน้อย ปกติแตกหน่อ น้อยมาก โดยมากขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด (พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง และคณะ, 2554) เนื่องจากแตกหน่อ น้อย จึงควรที่จะทำการขยายเพื่ออนุรักษ์พันธุ์กรรมรวมถึงศึกษาเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อเป็นหลักฐาน ยืนยันประวัติของพืช และจากการดำเนินการในโครงการศึกษาที่ผ่านมา ทางคณะผู้วิจัยได้ตัวอย่างปลอดเชื้อ ของต้นดอกดินเมืองกาญจน์จำนวนหนึ่ง ซึ่งในขณะนี้ทางโครงการกำลังตรวจสอบการปลอดเชื้ออีกระยะหนึ่ง ก่อนนำไปขยายพันธุ์โดยใช้อาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ในความเข้มข้นต่ำๆ เพื่อขยายพันธุ์ให้ได้ ปริมาณมากก่อนนำมาศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากต่อไป



ภาพที่ 3-2 ช่อดอกของดอกดินเมืองกาญจน์ (*Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Skornick.)

เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker technology) เป็นเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular genetics) ที่เข้ามามีบทบาทสำคัญในการศึกษาทางด้านพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด รวมถึงการศึกษาวิจัยทั้งทางด้านการเกษตร การแพทย์ และงานด้านการอนุรักษ์ การคัดเลือกปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์พืชและสัตว์ (Semagn et al., 2006; Nguyen et al., 2005) ปัจจุบัน ได้มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลขึ้นหลากหลายชนิด และการนำไปประยุกต์ใช้นั้นก็แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของเครื่องหมายแต่ละชนิดและลักษณะของงานวิจัย อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ หรือ เอสเอสอาร์ (Microsatellite or SSR: Simple Sequence Repeat) เป็นชนิดที่ได้รับความนิยมและมีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย (Nguyen et al., 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวิเคราะห์การถ่ายทอดรวมทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ

ไมโครแซทเทลไลท์ หรือเอสเอสอาร์ คือบริเวณของเส้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเป็นยูนิตจำนวน 2-6 เบส เช่น (AG)<sub>n</sub>, (CG)<sub>n</sub>, (GCT)<sub>n</sub>, (ATGC)<sub>n</sub>, (CAGGC)<sub>n</sub> เป็นต้น (De Vienne et al., 2002 ; Nguyen et al., 2005) โดยที่ n เป็นจำนวนซ้ำตั้งแต่ 4 ซ้ำไปจนถึงหลายสิบซ้ำ โมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์นี้กระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่มีสองเบสซ้ำ (Di-repeat) จะพบได้บ่อยครั้งที่สุด โดยสามารถพบได้ทุกๆ 30 ถึง 100 กิโลเบสในจีโนม โดยการเรียงตัวของลำดับเบสซ้ำนี้อาจเกิดจากการแทรกหรือการแทนที่ของลำดับเบสที่ไม่ใช่ลำดับเบสซ้ำ แล้วทำให้เกิดลำดับเบสซ้ำเรียงตัวกัน ซึ่งอาจจะเกิดจากการทำงานที่ผิดพลาดของเอนไซม์ DNA polymerase เช่น เกิดการลื่นไถลของเอนไซม์ในบริเวณลำดับเบสซ้ำระหว่างกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ปรากฏการณ์นี้ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของจำนวนซ้ำที่ตำแหน่งเดียวกันของจีโนม และเกิด Polymorphism ระหว่างจีโนไทป์ การตรวจสอบเอสเอสอาร์นั้นสามารถทำได้โดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีเอสเอสอาร์นั้นอยู่ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) โดยอาศัยไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจำเพาะเจาะจง ดังนั้นไพรเมอร์แต่ละคู่จะสามารถตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ในตำแหน่งที่จำเพาะ (Locus-specific marker) ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ (PCR products) ที่เพิ่มจำนวนขึ้น สามารถนำมาแยกขนาดด้วย Electrophoresis บนเจลประภาพโพลีอะครีลาไมด์ หรืออะกาโรส การตรวจสอบด้วยวิธีนี้สามารถแสดงจีโนไทป์แบบข่มร่วม (Co-dominant) และให้ Polymorphism สูงระหว่างจีโนไทป์ แต่ข้อเสียของการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ คือ ต้องตรวจสอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะ (Specific primer) ซึ่งจะต้องทำการพัฒนาขึ้น

พืชทั้ง 2 ชนิดที่นำมาศึกษาวิจัยในโครงการนี้จัดเป็นพืชหายากในประเทศไทย และพบในพื้นที่ของโครงการ อพ.สธ. จังหวัดกาญจนบุรี

### 3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สํารวจรวบรวมพันธุ์เอื้องดินถิ่นไทย และดอกดินเมืองกาญจน์

##### เอื้องดินถิ่นไทย

สํารวจรวบรวมพันธุ์เอื้องดินถิ่นไทย ในเขต อ. ไทรโยค เขต อ.ทองผาภูมิ เขต อ.ศรีสวัสดิ์ และเขต อ.สังขละบุรี และนำมาปลูกเลี้ยงในเรือนเพาะชำของวิทยาเขตกาญจนบุรี โดยใช้วัสดุปลูก ดังนี้

|                    |   |      |
|--------------------|---|------|
| ก. ดินขุยไผ่       | 2 | ส่วน |
| ข. ใบไม้และไม้ผุปน | 2 | ส่วน |
| ค. อิฐมอญผุปน      | 1 | ส่วน |

ง. วัสดุรองกันกระถางใช้อิฐมอยุ่แตก หน้า 1 เซนติเมตร

โดยในการปลูก ใช้กระถางดินเผาขนาด 6 นิ้ว ที่ระบายอากาศรอบกระถาง การปลูกโดยให้ส่วนของลำลูกกล้วยและลำต้นอยู่เหนือดิน ให้ส่วนรากที่ติดอยู่กับลำต้นอยู่ในดินปลูก และจัดไม้ค้ำยันพยุงส่วนของใบให้รับแสง ตัดแต่งใบแห้ง และใบที่ฉีกขาดออก ตั้งภายในเรือนที่มีแสงส่องประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 6 ชั่วโมงต่อวัน

#### ดอกดินเมืองกาญจน์

สำรวจรวบรวมพันธุ์ดั้งเดิม จากพื้นที่ต่าง ๆ อย่างน้อย 2 แหล่ง ซึ่งทางโครงการฯ ได้สำรวจพื้นที่บริเวณบ้านลิเจียและเขื่อนวชิราลงกรณ์ จ.กาญจนบุรี

### 3.2 การเตรียมวัสดุพืชและวิธีฟอกฆ่าเชื้อ (Surface Sterilization) เพื่อนำขึ้นส่วนพืชเข้า ไปเลี้ยงในหลอดทดลอง ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

#### เอื้องดินถิ่นไทย

ในการศึกษาเริ่มต้นนี้ใช้ต้นอ่อนของเอื้องดินถิ่นไทย จากด้านเจดีย์สามองค์ ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารวุ้นสูตร MS ซึ่งได้จากงานวิจัยที่ผ่านมา มาขยายให้ได้จำนวนมากบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโทไคนิน เพื่อเพิ่มปริมาณให้มากพอที่จะทำการศึกษาสุทธอาหารที่เหมาะสมต่อไป

#### ดอกดินเมืองกาญจน์

ในการศึกษาเริ่มต้นนี้ใช้ต้นจากงานวิจัยที่ผ่านมา (บ้านห้วยอูล่ง) ย้ายเนื้อเยื่อจากอาหารสูตร MS ที่มีไซโทไคนินเพื่อเพิ่มปริมาณต้นให้มากพอที่จะศึกษาในขั้นต่อไป และย้ายยอดที่เกิดขึ้นใหม่ไปลงบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ก่อนนำไปศึกษาสุทธอาหารที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังเพาะเมล็ดที่ได้จากบ้านลิเจียลงบนอาหารวุ้นสูตร MS และนำต้นที่เกิดขึ้นใหม่จากการเพาะเมล็ดที่ได้จากบ้านลิเจียย้ายลงบนอาหารวุ้นสูตร MS เพื่อเก็บรักษาพันธุ์

### 3.3 การทดสอบหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ขึ้นเนื้อเยื่อของพืชสร้างยอดใหม่ (Shoot induction) และการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลอง

#### เอื้องดินถิ่นไทย

ในการศึกษาเริ่มต้นนี้ใช้ต้นอ่อนของเอื้องดินถิ่นไทย จากด้านเจดีย์สามองค์ อยู่ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีความสูงวัดจากโคนต้นถึงปลายใบยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ที่มาตัดตายยอด (Shoot tip) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ให้ได้ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร (0.01 กรัม) และนำตายอดไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร (1/2MS, MS, VW) ที่มีระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (NAA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มก/ล ตามลำดับ (ใส่ตายอด 1 ชิ้น / 1 ขวด ใช้ 9 ขวดต่ออาหาร 1 สูตร) จากนั้นวางขวดอาหารบนเครื่องเขย่าในแนวนอนกับพื้นโลกและเขย่าด้วยอัตราเร็ว 100 รอบ/นาที่ ให้ความเข้มข้นประมาณ 200 ฟุตเทียน ตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  บันทึกค่า อัตราการรอด การเกิดโปรโตคอม (PLB) จำนวน PLB/ยอด และน้ำหนักสด

นำต้นกล้วยไม้เอื้องดินถิ่นไทยที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2MS เพื่อให้ต้นเจริญขึ้นเป็นต้นสมบูรณ์ จากนั้นนำต้นที่มีความสูงจากโคนต้นถึงปลายใบยาวประมาณ 15 เซนติเมตร มาเพิ่มจำนวนต้นโดยใช้อาหารสูตร 1/2MS ที่มี BA เข้มข้น 2 มก/ล

### ดอกดินเมืองกาญจน์

ตัดราก ใบ และลำต้นเทียมของดอกดินเมืองกาญจน์ จากบ้านห้วยอูล่ง ที่ได้ออก ให้เหลือส่วนโคนซึ่งมีความยาวประมาณ 1-1.5 ซม. ไปลงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก/ล ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 มก/ล โดยใช้เนื้อเยื่อ 1 ชิ้นต่ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ขวดในแต่ละสูตรอาหาร ทำ 9 ขวด จากนั้นนำไปวางบนชั้นไฟในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  °C ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ และย้ายเนื้อเยื่อทุก 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่ออีก 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองทุก 4 สัปดาห์ก่อน โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงของจำนวนและความยาวของยอด (leafy-shoot) และราก ที่เกิดขึ้นใหม่พร้อมบันทึกภาพผลการทดลอง ทั้งนี้ความยาวของยอด วัดจากโคนต้นถึงฐานของยอดใบอ่อนที่ปลายต้น และความยาวรากวัดจากรากที่มีขนาดยาวที่สุด

### 3.4 จำนวนตัวอย่างและสภาพการเพาะเลี้ยง

ในแต่ละการทดลองวางเลี้ยงชิ้นพืชตามแนวตั้งบนอาหารในขวดอาหาร ขวดละ 1 ชิ้นส่วน แต่ละทรีตเมนต์ (treatment) มีการทำซ้ำเพื่อยืนยันผลที่ได้

ชิ้นส่วนพืชจะวางเลี้ยงในห้องวางเลี้ยงที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสงประมาณ  $37.5 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$  อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส

### 3.5 การบันทึกผลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการทดลองเพื่อกระตุ้นยอด บันทึกอัตราการตอบสนองการสร้างจำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย ทั้งนี้ลักษณะที่ผิดปกติต่างๆ จะถูกบันทึกในแบบบรรยายเพื่อใช้ประกอบ การวิเคราะห์ และแปลผลข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ จะเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมกับลักษณะของปัจจัย (Factor) และวัตถุประสงค์ของการทดลอง ข้อมูลจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่าง (Standard error of the mean; S.E.)

### 3.6 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างศึกษาและสร้างคลังดีเอ็นเอของจีโนมที่มีไมโครแซทเทลไลต์มารวมทั้งสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างศึกษาทั้งหมดและวิเคราะห์ทางพันธุกรรม (Genotyping)

สกัดตัวอย่างดีเอ็นเอ

1) ทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอตั้งต้นด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และนำตัวอย่างที่ได้ทำผ่านขั้นตอน ในการคัดเลือกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะเลือกชิ้นที่มีขนาด 500-1500 เบส

2) ทำการติด Adapter เข้าที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอ และนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในกระบวนการพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์คู่สมกับ Adapter

3) จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอดังกล่าวมาใช้ในการ Hybridization กับดีเอ็นเอโพรบ ซึ่งเป็นเส้นดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำๆ

4) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีส่วนของเบสซ้ำมาเพิ่มจำนวนอีกครั้งโดยพีซีอาร์ ก่อนที่จะทำการ clone เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequencing)

5) นำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

### 3.7 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างศึกษาทั้งหมดและวิเคราะห์ทางพันธุกรรม (Genotyping)

เมื่อได้ทำการพัฒนาไพรเมอร์ขึ้นแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการทดสอบไพรเมอร์เหล่านั้นกับตัวอย่างดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ต้องการศึกษา เพื่อทดสอบว่าไพรเมอร์เหล่านั้นสามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรม (Polymorphism) ของตัวอย่างศึกษาได้หรือไม่ต่อไป โดยขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาเพื่อวิเคราะห์ไพรเมอร์นั้น สามารถกระทำดังนี้

1) นำดีเอ็นเอมาเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยการใช้ไพรเมอร์ Forward และ Reward ที่ได้ทำการออกแบบไว้แล้วในเบื้องต้น ซึ่งปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ (ประมาณ 5-50 นาโนกรัม) ไพรเมอร์ Forward และ Reward (10 pM) dNTP (200  $\mu$ M) 1X PCR Buffer  $MgCl_2$  (1.5 mM) และ *Taq* DNA polymerase (ประมาณ 1-1.5 U) โดยใช้ PCR cycle ดังนี้

- Denaturation 94 °C 2 นาที
- ตามด้วย 30 รอบของ Denaturation 94 °C 45 วินาที Annealing (โดยเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละคู่ไพรเมอร์) 45 วินาที และ Extension 72 °C 1 นาที
- จากนั้น Final extension 72 °C อีก 5 นาที

2) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาผ่านขั้นตอน DNA gel electrophoresis เพื่อแยกขนาดของผลผลิตพีซีอาร์

3) นำเจลที่ได้มาทำการย้อมแถบดีเอ็นเอโดยใช้ Ethidium bromide หรือ Silver staining นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผล

### 3.8 วิเคราะห์ข้อมูล

จากข้อมูลพันธุกรรมของตัวอย่างศึกษา หรือ Genotypic data ที่ได้ทำการทดสอบกับไพรเมอร์ที่ได้พัฒนาขึ้นแล้วนั้น ข้อมูลดังกล่าวจะถูกนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป TFGPA 1.3 (Miller, 1997) โดยจะทำการวิเคราะห์หาค่า Allele frequencies, heterozygosity based on Hardy-Weinberg equilibrium, percentage of polymorphic loci (95% criterion), Genetic distance และ UPGMA โดยจะทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบทั้งภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่มประชากรตัวอย่างศึกษา

## 4. ผลการวิจัย

### 4.1 เอื้องดินถิ่นไทย

#### 4.1.1 การออกสำรวจรวบรวมพันธุ์ ต้นเอื้องดินถิ่นไทย

จากการออกสำรวจจะแกวมหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี ไม่พบต้นเอื้องดินถิ่นไทย และจากการสำรวจโดยอาศัยผู้นำทางซึ่งได้แก่จางพ่อคำกล้วยไม้ คนหาของป่าและเจ้าหน้าที่อุทยานที่

ช่วยเหลือด้านข้อมูลและพาเดินสำรวจในพื้นที่ที่เป็นเป้าหมาย ที่มาการยืนยันว่า เคยพบหรือพบต้นกล้วยไม้ที่มีลักษณะดังกล่าวมีพื้นที่ต่างๆ ดังนี้

1. เขต อ. ไทรโยค

- a) บริเวณพื้นที่อนุรักษ์พันธุ์พืชของวิทยาเขตกาญจนบุรี มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเฉพาะบริเวณไหล่เขา ดินหน้าผา ตลอดแนวขนานกับทางรถไฟ ไปจรดสถานปฏิบัติธรรมของแม่ชีบังกช บ้านช่องแคบ อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี ซึ่งสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง ประมาณ 250-280 เมตร
  - b) บริเวณพื้นที่บ้านหนองเป็ด ซึ่งอยู่ฝั่งตรงข้าม วิทยาเขตกาญจนบุรี มหาวิทยาลัยมหิดล ได้สำรวจ เฉพาะบริเวณไหล่เขาที่มีตะกอนดินซึ่งอยู่ ตั้งสำนักปฏิบัติธรรมหลวงปู่ฉัตร ไปจรดแปลงปลูกพืช เศรษฐกิจของชุมชนบ้านหนองเป็ด อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี มีระยะทางห่างวิทยาเขตฯโดยประมาณ 12 กิโลเมตร และระยะทางพื้นที่สำรวจประมาณ 7 กิโลเมตรซึ่งมีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล ปานกลาง ประมาณ 285-355 เมตร
  - c) บริเวณพื้นที่บ้านพุเตย อ. ไทรโยค ซึ่งอยู่ห่าง วิทยาเขตกาญจนบุรี มหาวิทยาลัยมหิดล ไปตามถนน 323 ประมาณ 31 กิโลเมตร ซึ่งมีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง ประมาณ 275-355 เมตร ได้สำรวจบริเวณไหล่เขา ตั้งแต่บ้านพุเตยไปจรดแปลงปลูกพืชของสำนักงานเกษตรพัฒนา กระทรวงกลาโหม บริเวณชุมชนบ้านหินตก อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี มีระยะทางสำรวจโดยประมาณ 12 กิโลเมตร
- ทั้งนี้จากการสำรวจไม่พบเอื้องดินถิ่นไทยในพื้นที่ข้างต้น

2. เขต อ. ทองผาภูมิ

ไม่พบเอื้องดินถิ่นไทยในพื้นที่ข้างต้น

3. เขต อ. ศรีสวัสดิ์

ได้ขอความอนุเคราะห์หัวหน้าอุทยานเอราวัณในการช่วยสำรวจซึ่งขณะนี้ยังไม่มีรายงานการพบกล้วยไม้ดังกล่าว

4. เขต อ. สังขละบุรี

ได้ว่าจ้างพ่อค้าในการช่วยสำรวจในเขตดังกล่าว โดยพบในพิกัด GPS 4 ที่ ได้แก่

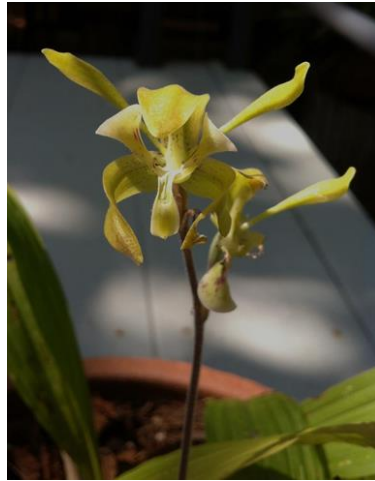
- 1) 15.306447 กับ 98.353460
- 2) 15.304680 กับ 98.362113
- 3) 15.294327 กับ 98.380325
- 4) 15.295973 กับ 98.376298

โดยได้นำต้นพันธุ์กลับมาในเดือนกันยายน เอื้องดินถิ่นไทยที่ได้จากแหล่งธรรมชาติใบเหี่ยวแต่ยังมีสภาพสด ไม่มีร่องรอยการเข้าบริเวณลำต้นและลำลูกกล้วย (ภาพที่ 3-3) ทั้งนี้ได้นำตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติ มาเพียงเล็กน้อยเพื่อให้แหล่งพันธุ์กรรมยังคงอยู่ในสภาพเดิม ต้นที่ได้มาได้นำมาปลูกเลี้ยงที่เรือนเพาะชำของ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี

ในวันที่ 18 พฤศจิกายน 2557 พบการบานของดอกจำนวน 2 ดอก จากต้นที่มีลำลูกกล้วยขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.32 เซนติเมตร จำนวน 1 ต้น เป็นดอกขนาดเล็ก วัดความกว้างปลายกลีบดอกล่าง 3.6 เซนติเมตร และปลายกลีบดอกบนถึงแนวขอบกลีบล่าง 4.4 เซนติเมตร (ภาพที่ 3-4) จึงทดลองเขียนเกสรตัวผู้ (ภาพที่ 3-5) และทดลองผสมพันธุ์เอื้องดินถิ่นไทย (ผสมตัวเอง) ในวันที่ 20 พฤศจิกายน 2557 เพื่อศึกษาว่าจะมีการติดฝัก



ภาพที่ 3-3 ลักษณะต้นเอื้องดินถิ่นไทยที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ บริเวณ อ.สังขละบุรี จ.กาญจนบุรี



ภาพที่ 3-4 ดอกของเอื้องดินถิ่นไทยในเรือนเพาะชำ ของมหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี



ภาพที่ 3-5 เกสรเพศผู้ของเอื้องดินถิ่นไทยที่ใช้ในการผสมเกสร

#### 4.1.2 การศึกษาการเก็บรักษาและขยายพันธุ์เอื้องดินถิ่นไทยในหลอดทดลอง

จากการนำต้นเอื้องดินถิ่นไทยไปลอกกาบเพื่อตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (ภาพที่ 3-6) ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ข้างต้น เพื่อชักนำให้เกิดโปรโตคอมจำนวนมาก จากการสังเกตในเบื้องต้นพบว่า เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 3-7) บางสูตรอาหารเกิดยอดขึ้นเท่านั้น (ภาพที่ 3-8)



ภาพที่ 3-6 ยอดของเอื้องดินถิ่นไทยหลังการลอกกาบใบออก เพื่อนำไปตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

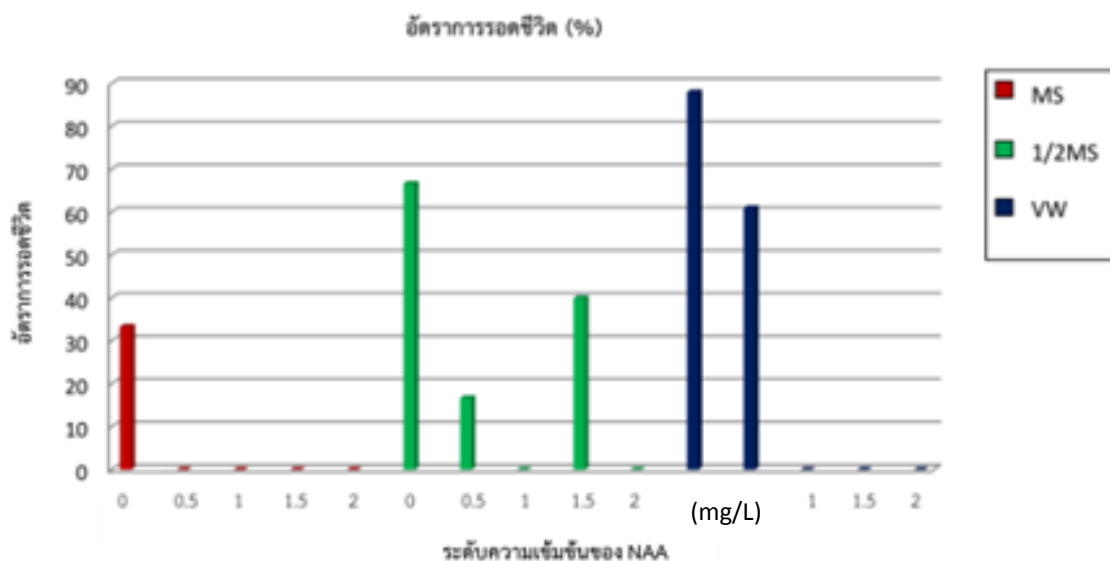


ภาพที่ 3-7 เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของเอื้องดินถิ่นไทย หลังจากการเลี้ยงในอาหารเหลวบางสูตร เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและดำในที่สุด

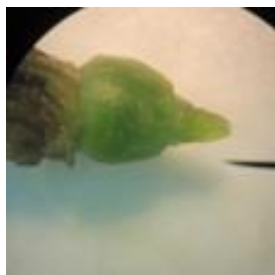


ภาพที่ 3-8 เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของเอื้องดินถิ่นไทย หลังจากการเลี้ยงในอาหารเหลวบางสูตรเจริญเป็นยอด

จากการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน พบว่า ในอาหารเหลว VW มีแนวโน้มของอัตราการรอดชีวิตที่สูง รองลงมาคือ 1/2MS และ MS ตามลำดับ โดยอาหารเหลว VW ที่ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (NAA) เท่ากับ 0 มก/ล จะให้ค่าอัตราการรอดชีวิตที่สูง คือ 88.00% และที่ 0.5 มก/ล มีค่าอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 61.00% เช่นเดียวกับ 1/2MS ที่มีความเข้มข้นของ NAA 0 และ 1.5 มก/ล มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 66.66% และ 40% ตามลำดับ ดังภาพที่ 3-9 ในส่วนของอาหารเหลว MS พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ NAA 0 มก/ล แสดงอัตราการรอดชีวิตที่ 33.33% จากภาพที่ 3-9 พบว่าเมื่อเราใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปในอาหารที่เพาะเลี้ยงตายอด จะทำให้ชิ้นส่วนพืชมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำลง และพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตสูง ส่งผลทำให้พืชมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 0.00% ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าชิ้นส่วนพืชที่ใช้เป็นตายอด โดยทั่วไปตายอดของพืชทุกชนิดนั้นจะมีฮอร์โมนประเทออกซินอยู่บริเวณตายอดแล้ว และการที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปในอาหารจึงทำให้ชิ้นส่วนพืชได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตมากเกินไป ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชและทำให้ชิ้นส่วนพืชไม่สามารถเจริญเติบโตและตาย จากภาพที่ 3-10 พบว่าในอาหารเหลวทั้ง 3 สูตรที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตจะให้อัตราการรอดชีวิตที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับอันที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต



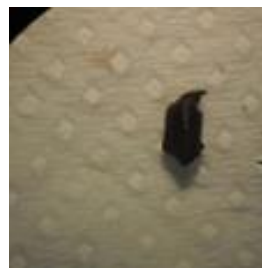
ภาพที่ 3-9 อัตราการรอดชีวิต (%) ของตายอดอ้อยดินถิ่นไทยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS 1/2 MS และ VW เป็นเวลา 2 เดือน



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

ภาพที่ 3-10 ตายอดเอื้องดินถิ่นไทยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS 1/2 MS และ VW เป็นเวลา 2 เดือน

ก) ตายอดเอื้องดินถิ่นไทยหลังจากลอกกาบใบออกก่อนเลี้ยงในอาหารเหลว

ข) โปรโตคอร์มที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2MS ที่มี NAA เข้มข้น 1.5 มก/ล

ค) ตายอดที่กลายเป็นสีดำ จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 1.0 มก/ล

ง) ยอดและรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2MS ที่ไม่มี NAA

จ) ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่มี NAA

ฉ) ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่ไม่มี NAA

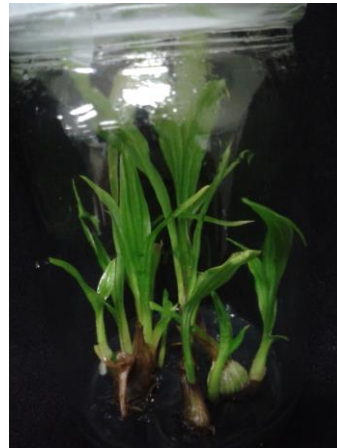
นอกจากนี้พบว่า ตายอดที่เลี้ยงในอาหารเหลวทั้ง 3 สูตร พบว่า เกิดโปรโตคอร์มในอาหารเหลวสูตร 1/2MS ที่มีความเข้มข้นของ NAA 1.5 mg/l ในอัตรา 33% ดังตารางที่ 4.1.2.1 ซึ่งโปรโตคอร์มจะมีลักษณะเป็นสีเขียวอ่อนปนกับสีน้ำตาล ลักษณะดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโปรโตคอร์มที่ได้ไม่แข็งแรง ดังภาพที่ 3-10 ข และพบว่าในสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองเกือบทั้งหมดไม่มีการชักนำให้เกิด PLBs อาจเป็นเพราะเราใช้ตายอดในการทดลองและในอาหารที่เพาะเลี้ยงได้ใส่ NAA ลงไปซึ่งทำให้ตายอดถูกชักนำให้เกิดเป็นยอดได้ง่ายขึ้นในบางสูตรอาหาร และบางสูตรอาหารตายอดก็ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตและตายลงในที่สุด ซึ่งลักษณะของตายอดที่พบจะเป็นสีดำ พบในอาหารหลาย ๆ สูตร เช่น อาหารเหลว MS ที่ระดับความเข้มข้น NAA 1 mg/l ดังภาพที่ 3-10 ค และในสูตรอาหารต่าง ๆ ที่มีอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 0.00% ตายอดจะเปลี่ยนเป็นสีดำทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่า ในอาหารบางสูตรมีการเจริญของตายอดที่เกิดขึ้น โดยอาหาร

เหลวสูตร 1/2MS, MS และ VW ที่ไม่เติมสาร NAA มีการเจริญเป็นยอดอย่างชัดเจน ดังจะพบว่ามีจำนวน ยอด/ตายยอด เท่ากับ 1.60, 0.40 และ 1.40 ตามลำดับ ดังภาพที่ 3-10 ง, จ และ ฉ ตามลำดับ นอกจากนี้ พบว่ายอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2MS ที่ไม่เติมสาร NAA มีรากเกิดขึ้นด้วย

**ตารางที่ 3-1** อัตราการรอดชีวิต (%), อัตราการเกิด PLB (%), จำนวน PLB, จำนวนยอด, จำนวน, ความยาวเฉลี่ยของยอด และความยาวเฉลี่ยของราก จากการเพาะเลี้ยงตายอดของเอื้องดินถิ่นไทยในที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน

| สูตรอาหาร | ความเข้มข้น NAA (มก/ล) | อัตราการรอดชีวิต (%) | อัตราการเกิด PLB (%) | จำนวน PLB/ตายอด | จำนวน ยอด/ ตายอด | จำนวน ราก/ ตายอด | ความยาว ยอดเฉลี่ย (ซม.) | ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.) |
|-----------|------------------------|----------------------|----------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------------|------------------------|
| MS        | Control                | 33.33±4c             | 0.00                 | 0.00            | 0.40±0.3b        | 0.00             | 1.60±0.3b               | 0.00                   |
|           | 0.5                    | 0.00                 | 0.00                 | 0.00            | 0.00             | 0.00             | 0.00                    | 0.00                   |
|           | 1.0                    | 0.00                 | 0.00                 | 0.00            | 0.00             | 0.00             | 0.00                    | 0.00                   |
|           | 1.5                    | 0.00                 | 0.00                 | 0.00            | 0.00             | 0.00             | 0.00                    | 0.00                   |
|           | 2.0                    | 0.00                 | 0.00                 | 0.00            | 0.00             | 0.00             | 0.00                    | 0.00                   |
| 1/2MS     | Control                | 66.66±2b             | 0.00                 | 0.00            | 1.60±0.3a        | 1.20±0.2a        | 2.20±0.2a               | 0.40±0.1a              |
|           | 0.5                    | 16.66±2cd            | 0.00                 | 0.00            | 0.20±0.1c        | 0.00             | 0.40±0.1c               | 0.00                   |
|           | 1.0                    | 0.00                 | 0.00                 | 0.00            | 0.00             | 0.00             | 0.00                    | 0.00                   |
|           | 1.5                    | 40.00±6c             | 33.00±0a             | 0.60±0.2a       | 0.00             | 0.00             | 0.00                    | 0.00                   |
|           | 2                      | 0.00                 | 0.00                 | 0.00            | 0.00             | 0.00             | 0.00                    | 0.00                   |
| VW        | Control                | 88.00±3a             | 0.00                 | 0.00            | 1.40±0.1ab       | 0.00             | 0.3±0.2c                | 0.00                   |
|           | 0.5                    | 61.00±4ab            | 0.00                 | 0.00            | 0.40±0.2b        | 0.00             | 0.2±0.1c                | 0.00                   |
|           | 1.0                    | 0.00                 | 0.00                 | 0.00            | 0.00             | 0.00             | 0.00                    | 0.00                   |
|           | 1.5                    | 0.00                 | 0.00                 | 0.00            | 0.00             | 0.00             | 0.00                    | 0.00                   |
|           | 2.0                    | 0.00                 | 0.00                 | 0.00            | 0.00             | 0.00             | 0.00                    | 0.00                   |

จากการนำต้นเอื้องดินถิ่นไทยไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร 1/2MS เพื่อให้พัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ และจะทำการเพิ่มจำนวนต่อไปให้เพียงพอต่อการศึกษาสุทธอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนต้นเอื้องดินถิ่นไทย โดยใช้ต้นที่มีความสูงจากโคนถึงปลายใบ 15 ซม. มาตัดให้เหลือส่วนโคนประมาณ 3 ซม. (ภาพที่ 4.1.2.3ก) และเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2MS ที่มี BA เข้มข้น 2 มก/ล พบว่าในเวลา 3 เดือน จะได้ยอดเพิ่มใหม่ประมาณ 1-2 ยอด/ชิ้นพืช (ภาพที่ 3-11ขวา) จากการที่เอื้องดินถิ่นไทยโตช้ามากจึงต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนให้มากพอที่จะศึกษาในขั้นต่อไป



ภาพที่ 3-11 (ซ้าย) ชิ้นพืชเริ่มต้นของเอื้องดินถิ่นไทยหลังจากตัดปลายยอดและรากออก  
(ขวา) เอื้องดินถิ่นไทยหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร 1/2MS ที่มี BA เข้มข้น 2 มก/ล นาน 3 เดือน

โดยสรุปแล้ว ควรใช้อาหารสูตร 1/2MS ในการเพาะเลี้ยงเอื้องดินถิ่นไทยในหลอดทดลอง การชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มสามารถทำได้โดยใช้อาหารสูตร 1/2MS ที่มี NAA เข้มข้น 1.5 มก/ล อย่างไรก็ตามโปรโตคอร์มที่ได้ไม่แข็งแรงและตายในที่สุด สำหรับตายอดที่นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่เติมสาร NAA เกิดต้นขึ้น ซึ่งสามารถนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร 1/2MS เพื่อได้เป็นต้นสมบูรณ์และนำมาเพิ่มจำนวนในขั้นแรกได้ 1-2 ยอด/ชิ้นพืช ในอาหารวุ้นสูตร 1/2MS ที่มี BA เข้มข้น 2 มก/ล

## 4.2 ดอกดินเมืองกาญจน์

### 4.2.1 การออกสำรวจรวบรวมพันธุ์ดอกดินเมืองกาญจน์

เนื่องจากพืชสกุล *Curcuma* เป็นพืชที่ออกดอกก่อนมีการเจริญของใบ ซึ่งดอกดินเมืองกาญจน์มีระยะเวลาออกดอกในระหว่างเดือนมีนาคม-เมษายน ดังนั้นโครงการวิจัยจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องออกสำรวจตัวอย่างพืชในระยะเวลาดังกล่าวก่อนที่จะได้รับทุนสนับสนุน ทั้งนี้จากการสำรวจพบว่าผู้นำช่อดอกมารับประทานเป็นอาหารโดยพบว่าชาวบ้านนำมาขายในตลาดสด ดังภาพที่ 3-12



ภาพที่ 3-12 ช่อดอกอ่อนของดอกดินเมืองกาญจน์ที่จำหน่ายในตลาดด้านสิงขร  
จ.กาญจนบุรี

ทางโครงการฯได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างต้นดอกดินเมืองกาญจน์ จำนวน 3 ครั้ง

1. บ้านอูล่ง อ.ทองผาภูมิ จำนวน 3 ครั้ง
2. หมู่บ้านลิเจีย อ.สังขละบุรี จำนวน 2 ครั้ง
3. บริเวณเขื่อนวชิราลงกรณ์ อ.สังขละบุรี จำนวน 1 ครั้ง

บ้านอูล่ง อ.ทองผาภูมิ จากการสำรวจพบดอกดินบริเวณป่าเต็งรังผสมป่าไผ่ ใกล้กับเขาหินปูนเตี้ยๆ โดยมีจำนวนไม่มากนัก ได้ทำการเก็บตัวอย่างมาปลูกเลี้ยงที่เรือนเพาะชำ นำเมล็ดมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและใช้ใบในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

หมู่บ้านลิเจีย อ.สังขละบุรี จากการสำรวจ พบว่ามีดอกดินเมืองกาญจน์ เกิดตามธรรมชาติในป่าเต็งรังผสมป่าไผ่บนภูเขาหินปูนบริเวณหมู่บ้านลิเจีย และมีการปลูกต้นของดอกดินตามบ้านเรือนอยู่บ้างเพื่อนำมาใช้เป็นอาหารโดยใช้ตุ้มรากและช่อดอก คณะผู้วิจัยได้นำหน่อของดอกดินเมืองกาญจน์มาปลูกเลี้ยงที่เรือนเพาะชำซึ่งได้ออกดอกในเวลาต่อมา (ภาพที่ 3-13) และติดฝัก (ภาพที่ 3-13ก) เมื่อฝักแก่จะนำเมล็ด (ภาพที่ 3-13ข) ไปทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปและนำไปไปศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

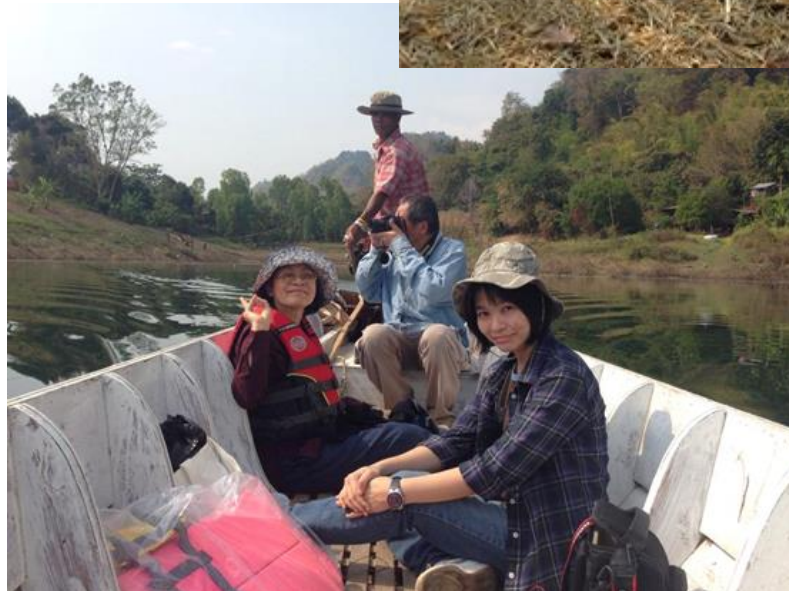
พื้นที่บริเวณเขื่อนวชิราลงกรณ์ อ.สังขละบุรี จากการสำรวจพบดอกดินเมืองกาญจน์บริเวณป่าไผ่บนเนินเขาบนเกาะในเขื่อนวชิราลงกรณ์ โดยนั่งเรือออกจากบ้านลิเจียประมาณ 10 นาที (ภาพที่ 3-14ก-ค) ซึ่งได้เก็บตัวอย่างพืชของดอกดินเมืองกาญจน์บางส่วนออกมาปลูกเลี้ยงอนุรักษ์ในเรือนเพาะชำเพื่อรอกการงอกและทำการศึกษากในส่วนอื่นต่อไป



ภาพที่ 4.2.1.2 ดอกอ่อนของดอกดินเมืองกาญจน์ จากหมู่บ้านลิเจีย จ.กาญจนบุรี ที่เกิดจากการปลูกลี้นในเรือนเพาะชำ



ภาพที่ 3-13 ก) ดอกอ่อน และ ข) เมล็ด ของดอกดินเมืองกาญจน์ จากหมู่บ้านลิเจีย จ. กาญจนบุรี ที่เกิดจากการปลูกลี้นในเรือนเพาะชำ



ภาพที่ 3-14 ก) ดอกดินเมืองกาญจน์ ข) บริเวณป่าไผ่ซึ่งเป็นแหล่งที่พบ ค)การออกเรือสำรวจพื้นที่ของ ดอกดินเมืองกาญจน์ บริเวณเขื่อนวชิราลงกรณ์ อ.สังขละบุรี จ.กาญจนบุรี

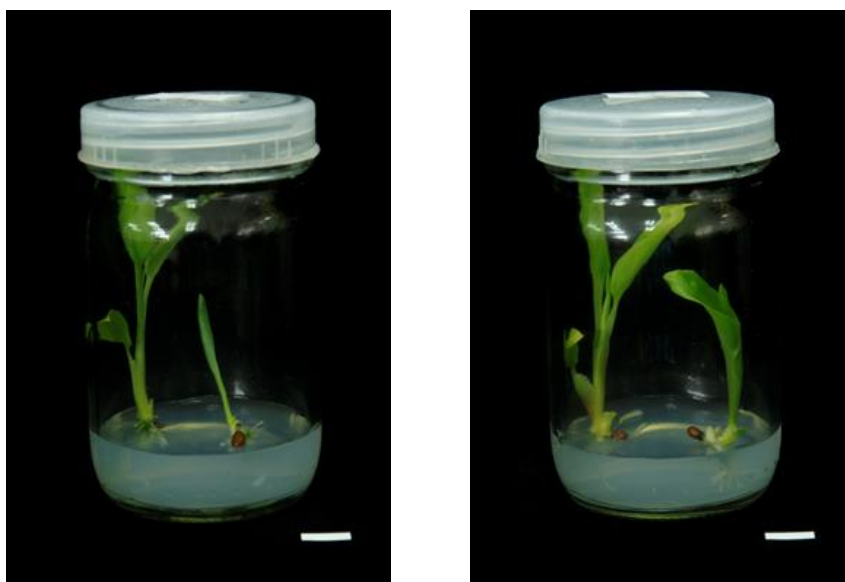
#### 4.2.2 การศึกษาการเก็บรักษาและขยายพันธุ์ดอกดินเมืองกาญจน์ในหลอดทดลอง

จากการสำรวจพื้นที่และได้เมล็ดพันธุ์ของดอกดินเมืองกาญจน์จากบ้านลิเจีย และเก็บเมล็ดพันธุ์จากฝักที่แก่จัดจำนวน 2 ฝัก จากต้นพันธุ์ที่เลี้ยงในเรือนเพาะชำมาทดลองเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อซึ่งการศึกษาพบว่า เมล็ดพันธุ์เริ่มงอกหลังจากเพาะเลี้ยงประมาณ 21 วัน ซึ่งงอกเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากบ้านห้วยอุล่งซึ่งใช้เวลานานมากกว่าจะงอก ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมล็ดที่นำมาจากพื้นที่จริงยังไม่แก่จัด ทั้งนี้การเก็บเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากการปลูกเลี้ยงในโรงเรือนยังพบการปนเปื้อนน้อยกว่าการนำเมล็ดจากพื้นที่

จริงมาเพาะเลี้ยง (ปนเปื้อนเกือบ 100% หรือ 100% ในบางครั้ง ขึ้นกับสภาพของฝักหรือเมล็ดที่พบ) เมล็ดพันธุ์ที่นำมาเพาะเลี้ยงมีอัตราการงอกประมาณ 76% ดังแสดงในตารางที่ 4.2.2.1 และได้ต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อจำนวน 38 ต้น (ภาพที่ 3-15)

**ตาราง 3-2** การปนเปื้อนและการงอกของเมล็ดดอกดินเมืองกาญจน์จากบ้านลิเจีย ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 10 สัปดาห์

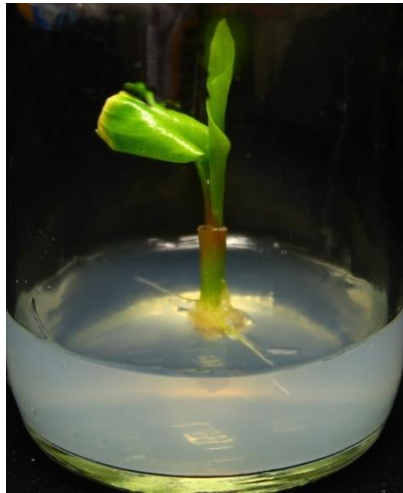
| ฝักที่ | จำนวนเมล็ด | การปนเปื้อน (เมล็ด) | การปนเปื้อน (%) | การงอก (เมล็ด) | การงอก (%) |
|--------|------------|---------------------|-----------------|----------------|------------|
| 1      | 21         | 2                   | 9.5             | 15             | 78.9       |
| 2      | 30         | 0                   | 0               | 23             | 76.7       |
| เฉลี่ย | 52         | 2                   | 3.9             | 38             | 76         |



**ภาพที่ 3-15** ต้นอ่อนดอกดินเมืองกาญจน์จาก บ้านลิเจีย จ.กาญจนบุรี  
ที่ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นสูตร MS

จากโครงการวิจัยที่ผ่านมาทางคณะผู้วิจัยได้เก็บรักษาพันธุ์ดอกดินเมืองกาญจน์ จากบ้านห้วยอูล่ง จ.กาญจนบุรี ไว้ในหลอดทดลองเล็กน้อย ซึ่งยังมีได้ทำการศึกษาสูตรอาหารสำหรับการขยายพันธุ์ ซึ่งโครงการในปีนั้นนอกจากการสำรวจพืชชนิดนี้ในพื้นที่ใหม่แล้ว ยังศึกษาสูตรอาหารเพื่อการอนุรักษ์และขยายพันธุ์อย่างยั่งยืนต่อไป โดยทางโครงการได้นำต้นดอกดินเมืองกาญจน์ จากบ้านห้วยอูล่งที่เก็บรักษาพันธุ์ไว้ในอาหารที่ลดน้ำตาลมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปกติ โดยเลี้ยง 1 ยอดต่อ 1 ขวด เพื่อให้เกิดยอดใหม่ขึ้นมาตามศักยภาพของต้นพันธุ์เดิม และย้ายเนื้อเยื่อทุก 4 สัปดาห์ หลังจากผ่านไป 8 สัปดาห์ ได้นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต Benzyladenine (BA) เข้มข้น 1 มก/ล เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนยอดใหม่ให้ได้จำนวนมากเพียงพอที่จะทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อไป หลังจากได้จำนวนยอดที่เพียงพอแล้ว ได้ย้ายเนื้อเยื่อจากอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่

ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตนาน 8 สัปดาห์ โดยย้ายเนื้อเยื่อทุก 4 สัปดาห์ เพื่อให้ปลอดอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ (ภาพที่ 3-16)



ภาพที่ 3-16 ต้นดอกดินเมืองกาญจน์จาก บ้านห้วยอูล่ง จ.กาญจนบุรี ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS

เมื่อครบเวลาที่กำหนดได้นำต้นอ่อนดอกดินเมืองกาญจน์ (บ้านห้วยอูล่ง) มาตัดราก ใบ และลำต้น เทียมออก ให้เหลือส่วนโคนซึ่งมีความยาวประมาณ 1-1.5 ซม. ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 มก./ล. โดยใช้เนื้อเยื่อ 1 ชิ้นต่ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ขวดในแต่ละสูตรอาหาร ทำ 9 ซ้ำนั้น หลังจากเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์พบว่า BA มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของยอด (leafy-shoot) โดย BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. ให้จำนวนยอดเกิดใหม่เฉลี่ยสูงสุดประมาณ 2 ยอดต่อชิ้นพืช ในขณะที่ KN และ ปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของยอด (ตารางที่ 4.2.2.1) สำหรับความยาวของยอดที่เกิดใหม่นั้น BA และ KN ที่มีผลต่อความยาวของยอดที่เกิดใหม่ คือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดประมาณ 0.7 ซม. และ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0 มก./ล. ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดประมาณ 0.6 ซม. ในขณะที่ปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN ไม่มีผลต่อความยาวของยอดที่เกิดใหม่ (ตารางที่ 3-3) สำหรับจำนวนรากที่เกิดใหม่พบว่า BA ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของราก คือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 1 มก./ล. โดยให้จำนวนรากเกิดใหม่เฉลี่ยสูงสุดประมาณ 2 รากต่อชิ้นพืช ในขณะที่ KN และ ปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของราก (ตารางที่ 3-4) สำหรับความยาวของรากที่เกิดใหม่ ทั้ง BA KN และ ปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN มีผลต่อความยาวของราก โดย BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 มก./ล. ให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงสุดประมาณ 2.0 ซม. KN ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงสุดประมาณ 1.6 ซม. และ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงสุดประมาณ 2.6 ซม. (ตารางที่ 3-4) ทั้งนี้ภาพรวมของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโคนของดอกดินเมืองกาญจน์ภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ แสดงในภาพที่ 3-17

ดังนั้นใน 4 สัปดาห์อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดเฉลี่ย 2 ยอดต่อชิ้นพืช ในขณะที่จำนวนรากที่เกิดใหม่นั้น BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดรากมากที่สุดเฉลี่ย 2 รากต่อชิ้นพืช

ตารางที่ 3-3 จำนวนเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ย ของยอด (leafy-shoot) ที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงโคนของต้นอ่อนดอกดินเมืองกาญจน์ (*C. candida*) บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์

| สารควบคุมการเจริญเติบโต | ความเข้มข้น (มก./ล.) | จำนวนยอดใหม่ (ยอด) | ความยาวยอดใหม่ (ซม.) |
|-------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|                         |                      | เฉลี่ย             | เฉลี่ย               |
| BA                      | 0                    | 1.0556 b           | 0.2806 b             |
|                         | 1                    | 1.3333 ab          | 0.4600 a             |
|                         | 2                    | 1.5556 ab          | 0.6100 a             |
|                         | 4                    | 2.0556 a           | 0.6867 a             |
| F-test                  |                      | *                  | *                    |
| KN                      | 0                    | 1.4167             | 0.6036 a             |
|                         | 0.5                  | 1.5833             | 0.4150 b             |
| F-test                  |                      | Ns                 | *                    |
| BA*KN                   | 0*0                  | 0.8889             | 0.2056               |
|                         | 1*0                  | 1.0000             | 0.4833               |
|                         | 2*0                  | 1.7778             | 0.8778               |
|                         | 4*0                  | 2.0000             | 0.8478               |
|                         | 0*0.5                | 1.2222             | 0.3556               |
|                         | 1*0.5                | 1.6667             | 0.4367               |
|                         | 2*0.5                | 1.3333             | 0.3422               |
|                         | 4*0.5                | 2.1111             | 0.5256               |
| F-test                  |                      | Ns                 | ns                   |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 3-4 จำนวนเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ย ของรากที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงโคนของต้นอ่อนดอกดินเมืองกาญจน์ (*C. candida*) บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์

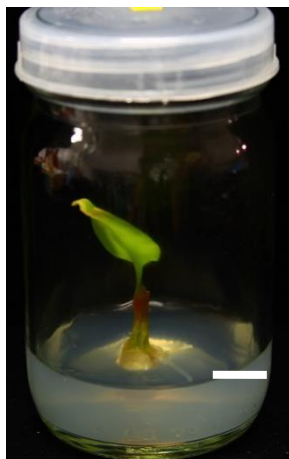
| สารควบคุมการเจริญเติบโต | ความเข้มข้น (มก./ล.) | จำนวนรากใหม่ (ราก) | ความยาวรากใหม่ (ซม.) |
|-------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|                         |                      | เฉลี่ย             | เฉลี่ย               |
| BA                      | 0                    | 2.2222 a           | 2.0056 a             |
|                         | 1                    | 2.2222 a           | 1.4222 b             |
|                         | 2                    | 1.7222 ab          | 1.1556 bc            |
|                         | 4                    | 1.4444 b           | 0.9111 c             |

| สารควบคุมการเจริญเติบโต | ความเข้มข้น (มก./ล.) | จำนวนรากใหม่ (ราก) | ความยาวรากใหม่ (ซม.) |
|-------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|                         |                      | เฉลี่ย             | เฉลี่ย               |
| F-test                  |                      | *                  | *                    |
| KN                      | 0                    | 1.9722             | 1.1750 b             |
|                         | 0.5                  | 1.8333             | 1.5722 a             |
| F-test                  |                      | ns                 | *                    |
| BA*KN                   | 0*0                  | 2.5556             | 1.4000 bc            |
|                         | 1*0                  | 2.2222             | 1.3889 bc            |
|                         | 2*0                  | 1.4444             | 0.8778 bc            |
|                         | 4*0                  | 1.6667             | 1.0333 bc            |
|                         | 0*0.5                | 1.8889             | 2.6111 a             |
|                         | 1*0.5                | 2.2222             | 1.4556 b             |
|                         | 2*0.5                | 2.0000             | 1.4333 b             |
|                         | 4*0.5                | 1.2222             | 0.7889 c             |
| F-test                  |                      | ns                 | *                    |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



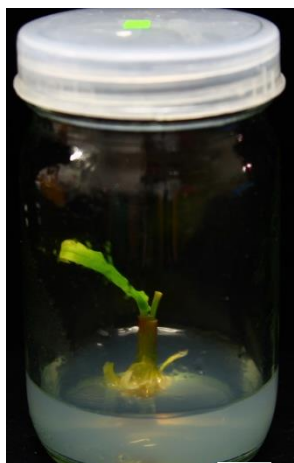
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

ภาพที่ 3-17 การเปลี่ยนแปลงของต้นดอกดินเมืองกาญจน์ (*C. candida*) ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงโคนต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) (ก) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ในระดับความเข้มข้น 1 มก./ล. (ข) 2 มก./ล. (ค) และ 4 มก./ล. (ง) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต KN ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. (จ) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้นของ BA 1 มก./ล. ร่วมกับ KN 0.5 มก./ล. (ฉ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ KN 0.5 มก./ล. (ช) และ BA 4 มก./ล. ร่วมกับ KN 0.5 มก./ล. (ซ) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (bar = 1 ซม.)



(ซ)



(ซ)

ภาพที่ 3-17 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของต้นดอกดินเมืองกาญจน์ (*C. candida*) ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงโคนต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) (ก) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ในระดับความเข้มข้น 1 มก./ล. (ข) 2 มก./ล. (ค) และ 4 มก./ล. (ง) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต KN ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. (จ) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้นของ BA 1 มก./ล. ร่วมกับ KN 0.5 มก./ล. (ฉ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ KN 0.5 มก./ล. (ช) และ BA 4 มก./ล. ร่วมกับ KN 0.5 มก./ล. (ซ) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (bar = 1 ซม.)

หลังจากเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์และย้ายขึ้นพีชไปเพาะเลี้ยงบนสูตรเดิม เป็นระยะเวลาอีก 4 สัปดาห์ (รวม 8 สัปดาห์) และนำผลทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลในทางสถิติด้วยโปรแกรมสถิติ SAS แบบ TWO-WAY ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าในแต่ละความเข้มข้นของ BA และ KN ให้ผลในการชักนำให้เกิดจำนวนและความยาวของยอด และรากที่แตกต่างกัน

สำหรับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นพบว่า BA ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของยอด คือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. โดยให้จำนวนยอดเกิดใหม่เฉลี่ยสูงสุดประมาณ 3 ยอดต่อชิ้นพีช ในขณะที่ KN และปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของยอด (ตารางที่ 3-5) สำหรับความยาวของยอดที่เกิดใหม่พบว่า BA ที่มีผลต่อความยาวของยอดที่เกิดใหม่ คือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มก./ล. ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดประมาณ 1.8 ซม. ในขณะที่ KN และปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN ไม่มีผลต่อความยาวของยอดที่เกิดใหม่ (ตารางที่ 3-5)

สำหรับจำนวนรากที่เกิดขึ้นใหม่ ทั้ง BA KN และ ปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของราก (ตารางที่ 3-6) แต่ความยาวของรากที่เกิดใหม่พบว่า BA มีผลต่อความยาวของราก คือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มก./ล. ซึ่งให้ความยาวรากเกิดใหม่เฉลี่ยสูงสุดประมาณ 2.4 ซม. ในขณะที่ KN และปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN ไม่มีผลต่อการเพิ่มความยาวของราก (ตารางที่ 4.2.2.4) ทั้งนี้ภาพรวมของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโคนของดอกดินเมืองกาญจน์ภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ แสดงในภาพที่ 3-18

ดังนั้นใน 8 สัปดาห์ อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้นพืช ในขณะที่จำนวนรากที่เกิดขึ้นนั้นทั้ง BA และ KN ไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก

**ตารางที่ 3-5** จำนวนเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ย ของยอด (leafy-shoot) ที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงโคนของต้นอ่อนดอกดินเมืองกาญจน์ (*C. candida*) บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์

| สารควบคุมการเจริญเติบโต | ความเข้มข้น (มก./ล.) | จำนวนยอดใหม่ (ยอด) | ความยาวยอดใหม่ (ซม.) |
|-------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|                         |                      | เฉลี่ย             | เฉลี่ย               |
| BA                      | 0                    | 1.6667 b           | 1.0344 b             |
|                         | 1                    | 2.1667 b           | 1.8122 a             |
|                         | 2                    | 2.5556 ab          | 1.6167 a             |
|                         | 4                    | 3.2222 a           | 1.7744 a             |
| F-test                  |                      | *                  | *                    |
| KN                      | 0                    | 2.3333             | 1.6231               |
|                         | 0.5                  | 2.4772             | 1.4958               |
| F-test                  |                      | ns                 | ns                   |
| BA*KN                   | 0*0                  | 1.5556             | 1.1078               |
|                         | 1*0                  | 1.6667             | 1.7033               |
|                         | 2*0                  | 3.0000             | 1.9922               |
|                         | 4*0                  | 3.1111             | 1.6889               |
|                         | 0*0.5                | 1.7778             | 0.9611               |
|                         | 1*0.5                | 2.6667             | 1.9211               |
|                         | 2*0.5                | 2.1111             | 1.2411               |
|                         | 4*0.5                | 3.3333             | 1.8600               |
| F-test                  |                      | ns                 | ns                   |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 3-6 จำนวนเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ย ของรากที่เกิดขึ้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงโคนของต้นอ่อนดอกดินเมืองกาญจน์ (*C. candida*) บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์

| สารควบคุมการเจริญเติบโต | ความเข้มข้น (มก./ล.) | จำนวนรากใหม่ (ราก) | ความยาวรากใหม่ (ซม.) |
|-------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|                         |                      | เฉลี่ย             | เฉลี่ย               |
| BA                      | 0                    | 4.0000             | 2.3389 a             |
|                         | 1                    | 5.6111             | 2.4000 a             |
|                         | 2                    | 5.1667             | 2.1944 a             |
|                         | 4                    | 4.3889             | 1.6444 b             |
| F-test                  |                      | Ns                 | *                    |
| KN                      | 0                    | 5.0278             | 2.1583               |
|                         | 0.5                  | 4.5556             | 2.1306               |
| F-test                  |                      | Ns                 | ns                   |
| BA*KN                   | 0*0                  | 4.2222             | 2.1889               |
|                         | 1*0                  | 5.3333             | 2.2222               |
|                         | 2*0                  | 6.3333             | 2.4778               |
|                         | 4*0                  | 4.2222             | 1.7444               |
|                         | 0*0.5                | 3.7778             | 2.4889               |
|                         | 1*0.5                | 5.8889             | 2.5778               |
|                         | 2*0.5                | 4.0000             | 1.9111               |
|                         | 4*0.5                | 4.5556             | 1.5444               |
| F-test                  |                      | Ns                 | ns                   |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

ภาพที่ 3-18 การเปลี่ยนแปลงของต้นดอกดินเมืองกาญจน์ (*C. candida*) ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงโคนต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) (ก) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ในระดับความเข้มข้น 1 มก./ล. (ข) 2 มก./ล. (ค) และ 4 มก./ล. (ง) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต KN ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. (จ) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้นของ BA 1 มก./ล. ร่วมกับ KN 0.5 มก./ล. (ฉ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ KN 0.5 มก./ล. (ช) และ BA 4 มก./ล. ร่วมกับ KN 0.5 มก./ล. (ซ) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (bar = 1 ซม.)



(ซ)



(ซ)

ภาพที่ 3-18 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของต้นดอกดินเมืองกาญจน์ (*C. candida*) ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงโคนต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) (ก) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ในระดับความเข้มข้น 1 มก./ล. (ข) 2 มก./ล. (ค) และ 4 มก./ล. (ง) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต KN ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. (จ) และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้นของ BA 1 มก./ล. ร่วมกับ KN 0.5 มก./ล. (ฉ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ KN 0.5 มก./ล. (ช) และ BA 4 มก./ล. ร่วมกับ KN 0.5 มก./ล. (ซ) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (bar = 1 ซม.)

หลังจากเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารข้างต้นเป็นเวลา 8 สัปดาห์และนำต้นอ่อนที่เกิดขึ้นใหม่ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ รวมเป็นเวลา 12 สัปดาห์ในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่าผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในสูตรอาหารต่าง ๆ ส่งผลต่อเนื่อง ในแต่ละความเข้มข้นของ BA และ KN มีผลในการชักนำให้เกิดจำนวนและความยาวของยอด และรากรวมถึงจำนวนใบที่แตกต่างกัน โดยขึ้นพืชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของยอด คือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0 มก./ล. ให้จำนวนยอดเกิดใหม่เฉลี่ยสูงสุดประมาณ 11 ยอดต่อต้นพืช ในขณะที่ ต้นพืชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA และ KN เพียงชนิดเดียวไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของยอด (ตารางที่ 3-7) สำหรับความยาวของยอดที่เกิดใหม่ของต้นพืชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN มีผลต่อความยาวของยอดที่เกิดใหม่ คือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0 มก./ล. ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดประมาณ 2.8 ซม. ในขณะที่ BA และ KN ไม่มีผลต่อความยาวของยอดที่เกิดใหม่ (ตารางที่ 3-7)

สำหรับจำนวนรากที่เกิดใหม่นั้นพบว่า ต้นพืชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA และปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของราก คือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. ให้จำนวนรากเกิดใหม่เฉลี่ยประมาณ 16 รากต่อต้นพืช และ BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่

ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ให้จำนวนรากเกิดใหม่เฉลี่ยสูงสุดประมาณ 17 รากต่อชิ้นพืช ในขณะที่ KN เพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของราก (ตารางที่ 3-8) สำหรับความยาวของรากที่เกิดใหม่ของชิ้นพืชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบน BA นาน 8 สัปดาห์ก่อนที่จะเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นั้น มีผลต่อความยาวรากคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 มก./ล. ให้ความยาวรากเกิดใหม่สูงสุดเฉลี่ย 4.8 ซม. ในขณะที่ KN และ ปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN ไม่มีผลต่อความยาวรากเกิดใหม่ (ตารางที่ 3-8) และสำหรับจำนวนใบที่เกิดขึ้นใหม่ ทั้ง BA KN และปัจจัยร่วมระหว่าง BA และ KN มีผลต่อการเพิ่มจำนวนใบ คือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. และ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ให้จำนวนใบเกิดใหม่เฉลี่ยประมาณ 3 ใบต่อต้น และ BA เข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ KN เข้มข้น 0.5 มก./ล. ให้จำนวนใบเกิดใหม่เฉลี่ยประมาณ 4 ใบต่อต้น (ตารางที่ 3-9)

ดังนั้นใน 12 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 2 หรือ 4 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด แต่เมื่อพิจารณาถึงความยาวยอดที่ยาวมากที่สุดประกอบ จะพบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. และ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เป็นสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ย 8 ยอดต่อชิ้นพืช โดยยอดที่เกิดขึ้นมีความสูงเฉลี่ย 2.5 ซม. ทั้งนี้ในเวลา 4 สัปดาห์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่ายอดที่เคยผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมาก่อนสามารถเกิดรากได้ โดยให้รากเฉลี่ยสูงสุด 17 รากต่อชิ้นพืช และรากมีความยาวเฉลี่ย 4 ซม. โดยสรุปแล้วถ้าต้องการเพาะเลี้ยงดอกดินเมืองกาญจน์ให้เกิดขึ้นที่สมบูรณ์ได้จำนวนมากในหลอดทดลองควรใช้อาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และย้ายไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนาน 4 สัปดาห์

ตารางที่ 3-7 จำนวนเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ย ของยอดที่เกิดขึ้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงโคนของต้นอ่อนดอกดินเมืองกาญจน์ (*C. candida*) บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์

| สารควบคุมการเจริญเติบโต | ความเข้มข้น (มก./ล.) | จำนวนยอดใหม่ (ยอด) | ความยาวยอดใหม่ (ซม.) |
|-------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|                         |                      | เฉลี่ย             | เฉลี่ย               |
| BA                      | 0                    | 7.4440             | 2.3783               |
|                         | 1                    | 8.3330             | 2.1461               |
|                         | 2                    | 9.4440             | 1.9656               |
|                         | 4                    | 9.556              | 2.2083               |
| F-test                  |                      | Ns                 | ns                   |
| KN                      | 0                    | 8.6111             | 2.2394               |
|                         | 0.5                  | 8.7778             | 2.1097               |
| F-test                  |                      | Ns                 | ns                   |
| BA*KN                   | 0*0                  | 6.7778 b           | 2.8033 a             |
|                         | 1*0                  | 6.3333 b           | 2.3156 bc            |
|                         | 2*0                  | 10.4444 a          | 1.9400 c             |
|                         | 4*0                  | 10.8889 a          | 1.8989 c             |
|                         | 0*0.5                | 8.1111 ab          | 1.9533 c             |
|                         | 1*0.5                | 10.3333 a          | 1.9767 c             |
|                         | 2*0.5                | 8.4444 ab          | 1.9911 c             |
|                         | 4*0.5                | 8.2222 ab          | 2.5178 ab            |
| F-test                  |                      | *                  | *                    |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 3-8 จำนวนเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ย ของรากที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงโคนของต้นอ่อนดอกดินเมืองกาญจน์ (*C. candida*) บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์

| สารควบคุมการเจริญเติบโต | ความเข้มข้น (มก./ล.) | จำนวนรากใหม่ (ราก) | ความยาวรากใหม่ (ซม.) |
|-------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|                         |                      | เฉลี่ย             | เฉลี่ย               |
| BA                      | 0                    | 9.3330 c           | 4.7556 a             |
|                         | 1                    | 10.5560 c          | 3.7833 ab            |
|                         | 2                    | 13.3330 b          | 3.2833 b             |
|                         | 4                    | 15.7220 a          | 4.0056 ab            |
| F-test                  |                      | *                  | *                    |
| KN                      | 0                    | 11.6111            | 3.8972               |
|                         | 0.5                  | 12.8611            | 4.0167               |
| F-test                  |                      | Ns                 | ns                   |
| BA*KN                   | 0*0                  | 8.5556 d           | 5.1444               |
|                         | 1*0                  | 8.5556 d           | 3.1556               |
|                         | 2*0                  | 14.7778 ab         | 3.7778               |
|                         | 4*0                  | 14.5556 ab         | 3.5111               |
|                         | 0*0.5                | 10.1111 cd         | 4.3667               |
|                         | 1*0.5                | 12.5556 bc         | 4.4111               |
|                         | 2*0.5                | 11.8889 bc         | 2.7889               |
|                         | 4*0.5                | 16.8889 a          | 4.5000               |
| F-test                  |                      | *                  | ns                   |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**ตารางที่ 3-9** จำนวนเฉลี่ยของใบที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงโคนของต้นอ่อนดอกดินเมืองกาญจน์ (*C. candida*) บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์

| สารควบคุมการเจริญเติบโต | ความเข้มข้น (มก./ล.) | จำนวนเฉลี่ยของใบที่เกิดใหม่ (ใบ) |
|-------------------------|----------------------|----------------------------------|
| BA                      | 0                    | 2.3050 b                         |
|                         | 1                    | 2.3561 b                         |
|                         | 2                    | 2.5606 b                         |
|                         | 4                    | 2.8972 a                         |
| F-test                  | ns                   | *                                |
| KN                      | 0                    | 2.3547 b                         |
|                         | 0.5                  | 2.7047 a                         |
| F-test                  | ns                   | *                                |
| BA*KN                   | 0*0                  | 2.2967 b                         |
|                         | 1*0                  | 2.3044 b                         |
|                         | 2*0                  | 2.6167 b                         |
|                         | 4*0                  | 2.2011 b                         |
|                         | 0*0.5                | 2.3133 b                         |
|                         | 1*0.5                | 2.4078 b                         |
|                         | 2*0.5                | 2.5044 b                         |
|                         | 4*0.5                | 3.5933 a                         |
| F-test                  | ns                   | *                                |

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.3 การวิเคราะห์ทางพันธุกรรม

การศึกษาวิเคราะห์พันธุกรรมในตัวอย่างดอกดินเมืองกาญจน์และเอื้องดินถิ่นไทย โดย DNA barcode

ทำการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอต้นดอกดินเมืองกาญจน์ (*Curcuma candida*) จำนวน 9 ตัวอย่าง และดีเอ็นเอต้นเอื้องดินถิ่นไทย (*Ipsea thailandica* Seidenf.) จำนวน 6 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3-10

**ตารางที่ 3-10** ตัวอย่างและแหล่งที่มาของดอกดินเมืองกาญจน์ที่ใช้ในการศึกษา

| ตัวอย่าง                                                 | ชื่อตัวอย่าง | แหล่งที่มาของตัวอย่าง                             |
|----------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------|
| ดอกดินเมืองกาญจน์<br>( <i>Curcuma candida</i> )          | C8           | Tissue จาก ห้วยอูล่ง กาญจนบุรี เขตที่ 8           |
|                                                          | C9           | Tissue จาก ห้วยอูล่ง กาญจนบุรี เขตที่ 9           |
|                                                          | C10          | Tissue จาก ห้วยอูล่ง กาญจนบุรี เขตที่ 10          |
|                                                          | C11          | เขื่อนวชิราลงกรณ์ สังขละบุรี กาญจนบุรี (NNSB156)  |
|                                                          | C12          | บ้านลิเจีย สังขละบุรี กาญจนบุรี (NNSB147)         |
|                                                          | C13          | Tissue จาก บ้านลิเจีย สังขละบุรี กาญจนบุรี (FO-3) |
|                                                          | C14          | Tissue จาก บ้านลิเจีย สังขละบุรี กาญจนบุรี (FO-5) |
|                                                          | C15          | Tissue จาก บ้านลิเจีย สังขละบุรี กาญจนบุรี (FO-3) |
|                                                          | C16          | Tissue จาก บ้านลิเจีย สังขละบุรี กาญจนบุรี (FO-4) |
| เอื้องดินถิ่นไทย<br>( <i>Ipsea thailandica</i> Seidenf.) | A1           | Tissue จาก ด่านเจดีย์สามองค์ กาญจนบุรี เขตที่ 1   |
|                                                          | A2           | Tissue จาก ด่านเจดีย์สามองค์ กาญจนบุรี เขตที่ 2   |
|                                                          | A3           | Tissue จาก ด่านเจดีย์สามองค์ กาญจนบุรี เขตที่ 3   |
|                                                          | A4           | พม่า (พิกัด: 15.304680/98.362113)                 |
|                                                          | A5           | พม่า (พิกัด: 15.306447/98.353460)                 |
|                                                          | A6           | พม่า (พิกัด: 15.295973/98.376298)                 |

#### ดอกดินเมืองกาญจน์ (*Curcuma candida*)

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอต้นดอกดินเมืองกาญจน์ (*Curcuma candida*) จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน matK rbcL ITS2 และ psbA-trnH (ตารางที่ 3-11)

**ตารางที่ 3-11** รายละเอียดของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน matK rbcL ITS2 และ psbA-trnH

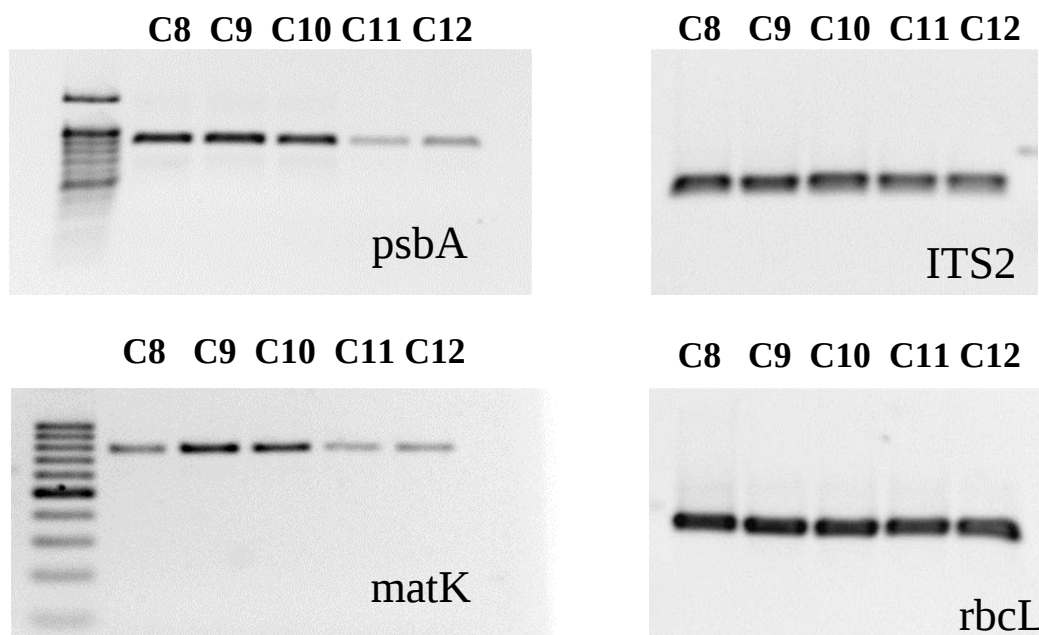
| Primer names                |           | Sequence (5'-3') |                            | Ta | Size<br>(bp.) |
|-----------------------------|-----------|------------------|----------------------------|----|---------------|
| matK<br>(Yu et al. 2011)    | matK472   | F:               | CCCRTYCATCTGGAAATCTTGGTTC  | 55 | 800           |
|                             | matK1248  | R:               | GCTRTRATAATGAGAAAGATTTCTGC |    |               |
| rbcL<br>(Kress et al. 2009) | rbcL      | F:               | ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC | 55 | 600           |
|                             | rbcL      | R:               | GTAAATCAAGTCCACCRGC        |    |               |
| ITS2<br>(Gu et al. 2013)    | ITSS2     | F:               | ATGCGATACTTGGTGTGAAT       | 55 | 400           |
|                             | ITSS3     | R:               | TCCTCCGCTTATTGATATGC       |    |               |
| psbA-trnH<br>(Thomas 2009)  | psbA-trnH | F:               | ATTCACAATCCACTGCCT TG      | 60 | 500           |
|                             | psbA-trnH | R:               | ATG GCT TTC AAC CTA AAT GG |    |               |

พบว่ายีน matK ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp. (สามารถ amplify ได้ 5 ตัวอย่าง) ยีน rbcL ขนาด 600 bp. (8 ตัวอย่าง) ยีน psbA-trnH ขนาด 500 bp. (5 ตัวอย่าง) และยีน ITS2 มีขนาด 400 bp. (9 ตัวอย่าง) (รูปที่ 3-19) ซึ่งทุกไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจงในตัวอย่างดอกดินเมืองกาญจน์ จึงสามารถส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing หลังจากนั้นนำ sequence ทั้ง 4 ยีน มาเปรียบเทียบกับข้อมูล nucleotide จากฐานข้อมูล (NCBI) พบว่า sequence จากยีน matK rbcL psbA-trnH และ ITS2 มีความคล้ายกับ sequence จาก specie ใน genus *Curcuma* หลายสปีชีส์ที่ Identity >99% นอกจากนี้พบว่าในฐานข้อมูล NCBI มีข้อมูล sequence จากยีน matK และ ITS2 อย่างละ 1 sequence เท่านั้น

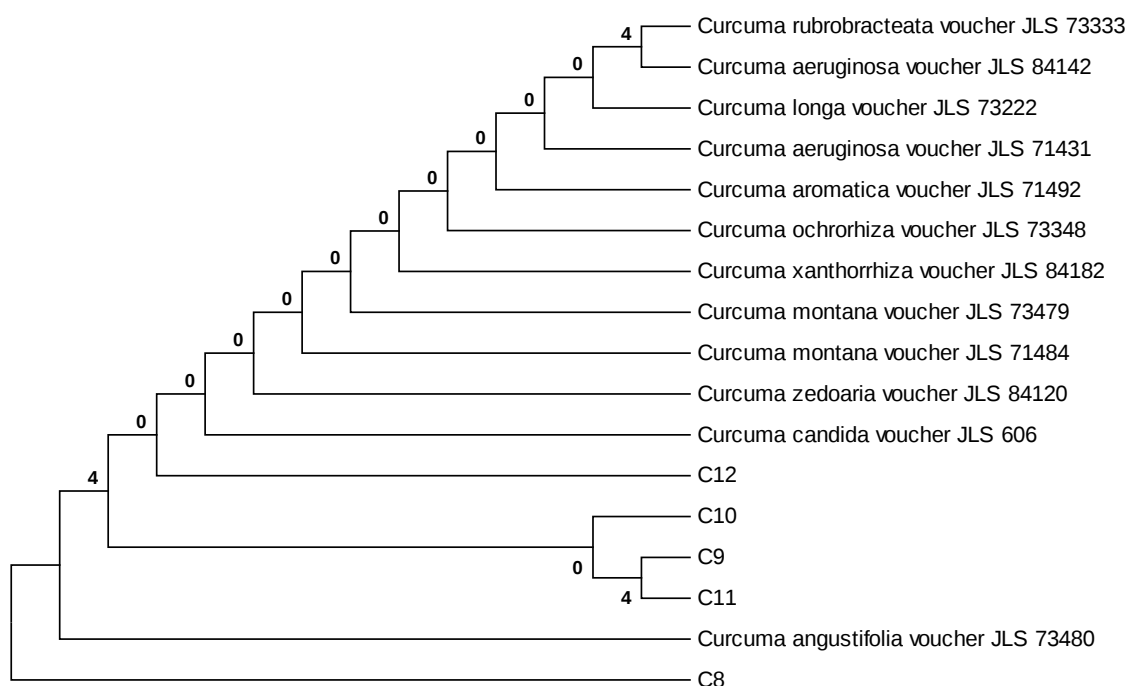
จากการวิเคราะห์ Neighbour-joining tree ของ ยีน matK (รูปที่ 3-20) rbcL (รูปที่ 3-21) ITS2 (รูปที่ 3-22) และ psbA-trnH (รูปที่ 3-23) ที่ถูกสร้างจาก genetic distance พบว่า Phylogenetic tree ของ ITS2 และ psbA-trnH สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างดอกดินเมืองกาญจน์ ออกจากพืช-สปีชีส์ ในสกุลเดียวกันได้อย่างชัดเจน แต่ Phylogenetic tree ของยีน matK และ rbcL นั้นไม่สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างดอกดินเมืองกาญจน์ได้

เมื่อคำนวณค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างและพืช-สปีชีส์ ในสกุลเดียวกันของ sequence matK rbcL ITS2 และ psbA-trnH โดยใช้โปรแกรม MEGA version 6 (Tamura et al. 2013) ด้วยสมการ K2P model และทดสอบความแตกต่างด้วย Wilcoxon 2-sample tests พบว่า ค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด (mean interspecific distance) และค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิด (mean intraspecific distance) ของ ITS2 และ psbA-trnH นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

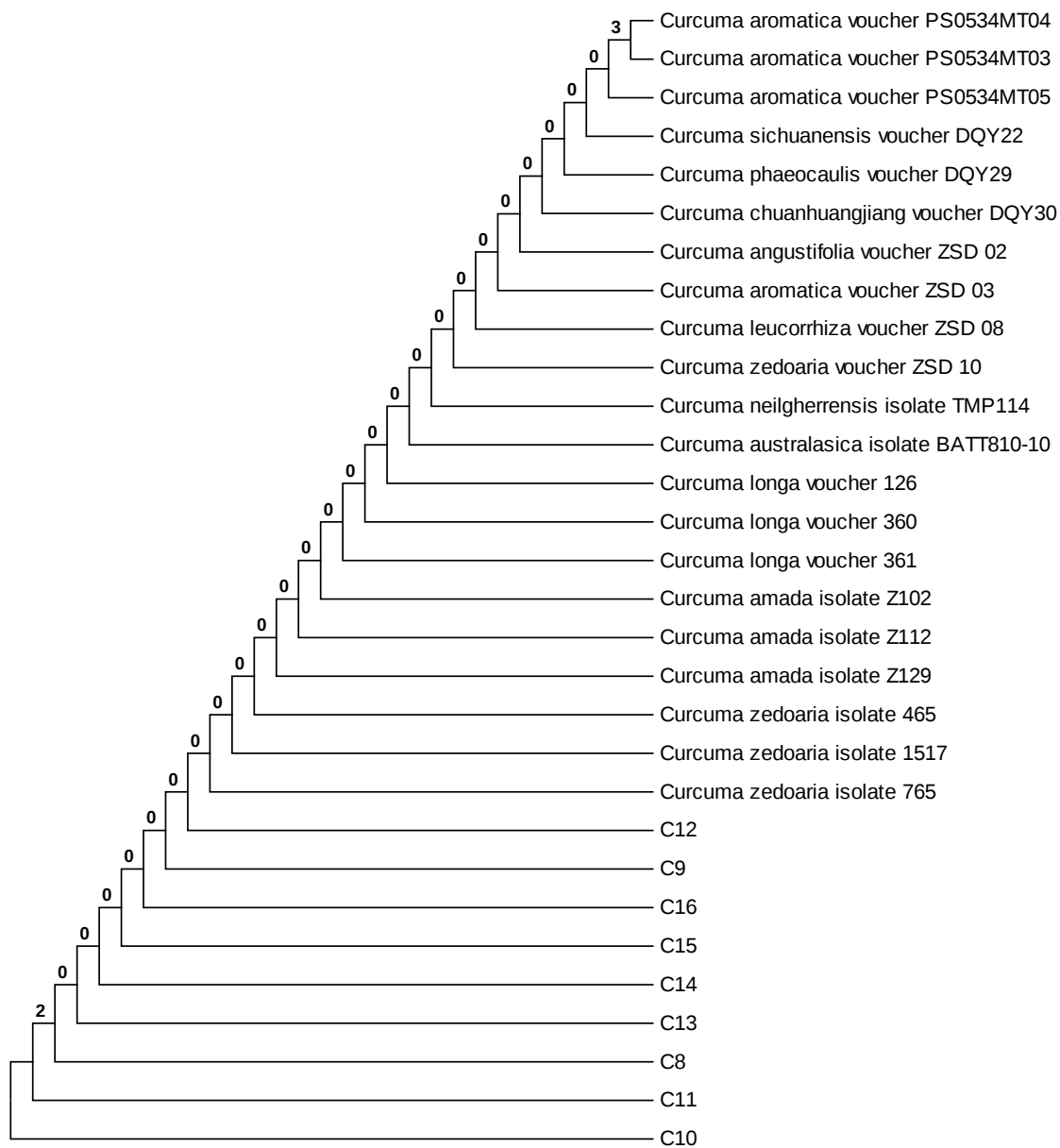
จากการวิเคราะห์ค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ และประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด matK rbcL ITS2 และ psbA-trnH และด้วยการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ในตัวอย่างดอกดินเมืองกาญจน์ รวมถึงพืชในสกุลเดียวกัน ในเบื้องต้นพบว่า ส่วน ITS2 และ psbA-trnH เป็น barcode ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกตัวอย่างตัวอย่างดอกดินเมืองกาญจน์ ออกจากพืช-สปีชีส์ ในสกุลเดียวกันได้



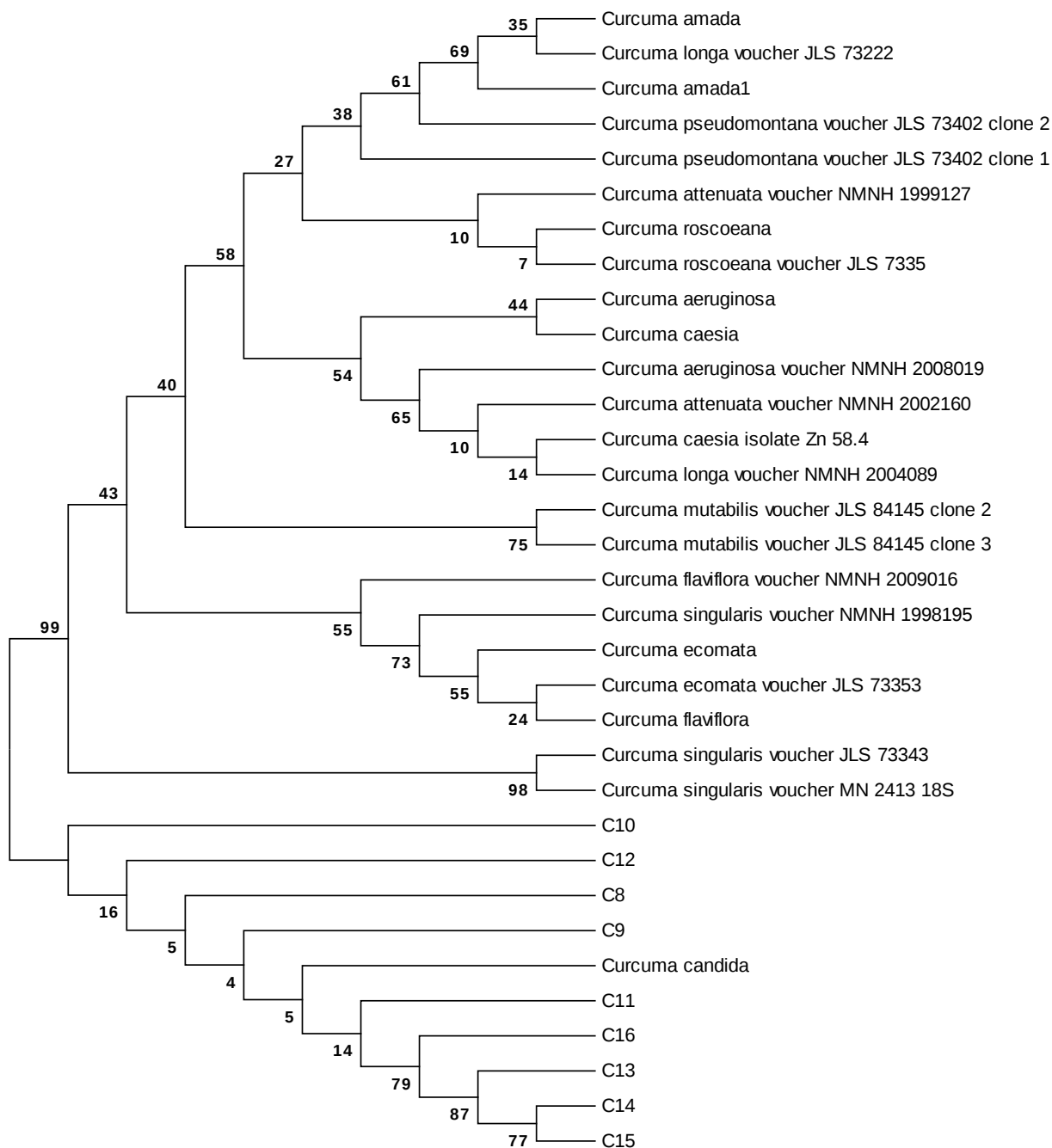
รูปที่ 3-19 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของต้นดอกดินเมืองกาญจน์จากการใช้ไพรเมอร์ยืน matK ขนาด 800 bp., rbcL ขนาด 600 bp., ITS2 ขนาด 400 bp. และ psbA-trnH ขนาด 500 bp.



รูปที่ 3-20 The Neighbour-joining tree จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างดอกดินเมืองกาญจน์ 5 ตัวอย่างและพืช- สปีชีส์อื่นๆ ในสกุลจากฐานข้อมูล (NCBI) โดยใช้ DNA barcode matK



รูปที่ 3-21 The Neighbour-joining tree จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างดอกดินเมืองกาญจน์ 8 ตัวอย่างและพืช- สปีชีส์อื่นๆ ในสกุลเดียวกันจากฐานข้อมูล (NCBI) โดยใช้ DNA barcode rbcl



รูปที่ 3-22 The Neighbour-joining tree จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างดอกดินเมืองกาญจน์ 9 ตัวอย่างและพืช- สปีชีส์อื่นๆ ในสกุลเดียวกันจากฐานข้อมูล (NCBI) โดยใช้ DNA barcode ITS2



จากการเปรียบเทียบพบว่า sequence จากยีน matK ของตัวอย่างเอื้องดินถิ่นไทยเหมือนกับ sequence จากตัวอย่างของ genus *Coelogyne*, genus *Otochilus* และ genus *Dendrobium* ที่ 93% และ genus *Bulbophyllum* (Identity=92%)

ส่วน sequence ของยีน rbcL นั้นเหมือนกับ sequence จากตัวอย่างของ genus *Calanthe*, genus *Bothriochilus* และ genus *Coelia* (Identity=98%) และเหมือนกับ genus *Spathoglottis*, genus *Dendrobium* และ genus *Cymbidium* (Identity=97%) ซึ่งจากการเปรียบเทียบ นั้นไม่พบ sequence ของยีน matK และ rbcL จาก genus *Ipsea* ในฐานข้อมูล NCBI

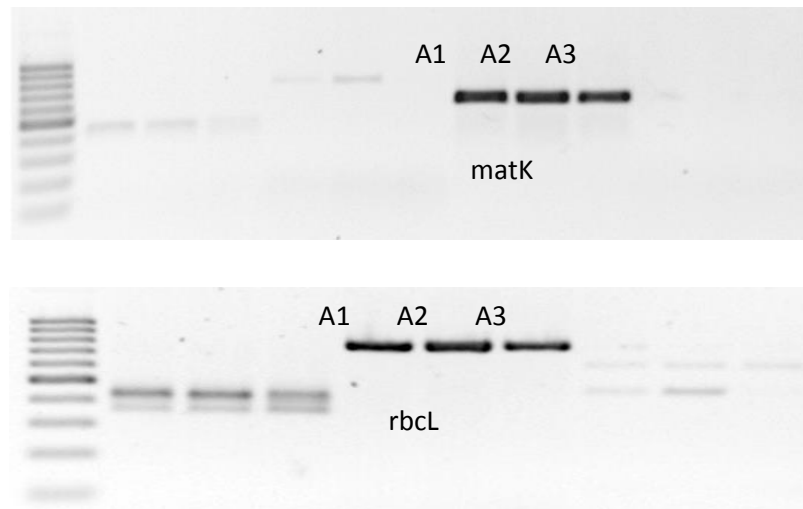
จากการวิเคราะห์ Neighbour-joining tree จากยีน ของ matK ที่ถูกสร้างจาก genetic distance โดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเอื้องดินถิ่นไทยจำนวน 4 ตัวอย่าง กับตัวอย่างที่ได้จาก ฐานข้อมูล NCBI พบว่า Phylogenetic tree ของ matK (รูปที่ 3-25) แยกออกเป็น 2 กลุ่มโดยตัวอย่างเอื้องดินถิ่นไทยอยู่ในกลุ่มกับตัวอย่างจาก genus *Dendrobium* และนอกจากนี้สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างเอื้องดินถิ่นไทยออกจากตัวอย่างใน genus *Dendrobium* ได้อย่างชัดเจน

สำหรับ Phylogenetic tree ของ rbcL (รูปที่ 3-26) จากตัวอย่างเอื้องดินถิ่นไทยจำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าไม่สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างเอื้องดินถิ่นไทยออกจาก genus อื่นได้เลย

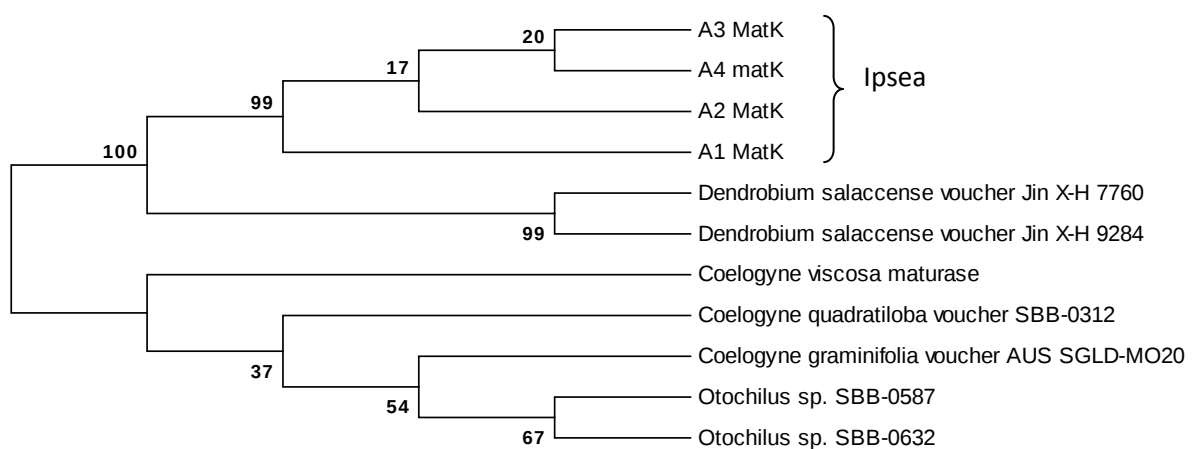
### สรุปผลการวิจัย

จากการเปรียบเทียบ sequence จากยีน matK และ rbcL กับฐานข้อมูล NCBI นั้นไม่พบตัวอย่างที่อยู่ใน genus เดียวกับเอื้องดินถิ่นไทย เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลของเอื้องดินถิ่นไทยและ species อื่นๆของ genus *Ipsea* ในฐานข้อมูล

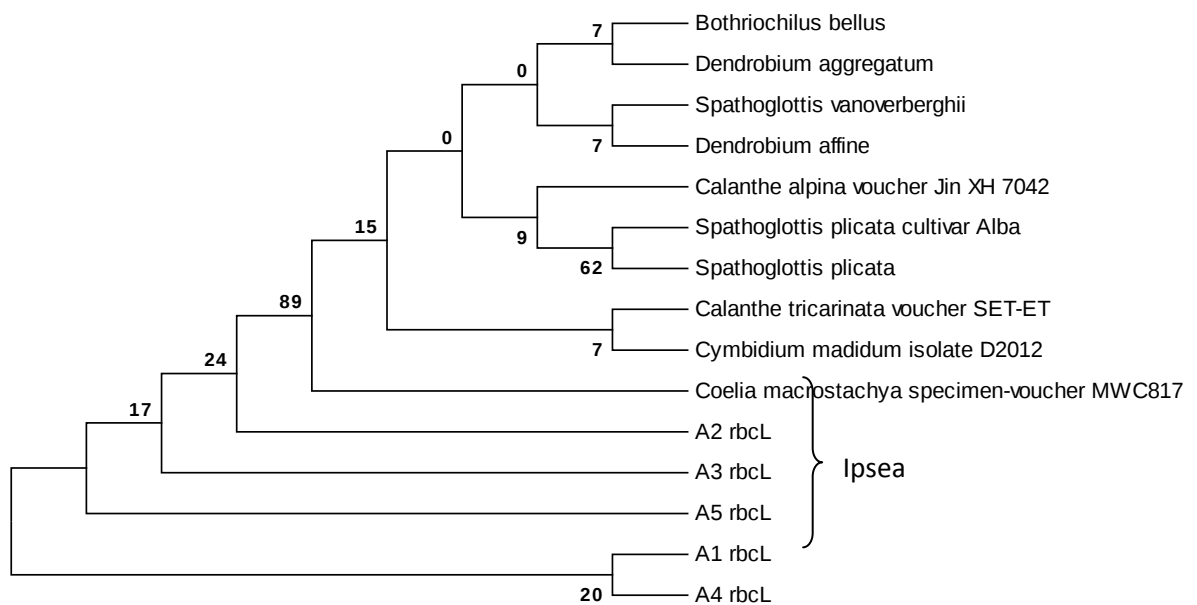
จากการวิเคราะห์ค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ และประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด matK และ rbcL ด้วยการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ในตัวอย่างเอื้องดินถิ่นไทยรวมถึงพืชในสกุลอื่น พบว่า DNA barcode matK นั้นสามารถจำแนกตัวอย่างเอื้องดินออกจากพืชในสกุลอื่นได้อย่างชัดเจน ในขณะที่ DNA barcode rbcL ไม่สามารถจำแนกได้ ดังนั้นในเบื้องต้น DNA barcode matK นั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกพืช genus *Ipsea* ออกจากพืชในสกุลอื่นได้ สำหรับการจำแนกพืชใน genus *Ipsea* นั้นต้องศึกษาเพิ่มเติมโดยการเปรียบเทียบกับ sequence จากยีน matK จาก species ใน genus *Ipsea* ต่อไป



รูปที่ 3-24 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของต้นเอื้องดินถิ่นไทยจากการใช้ไพรเมอร์ยืน matK ขนาด 800 bp. และ rbcL ขนาด 700 bp.



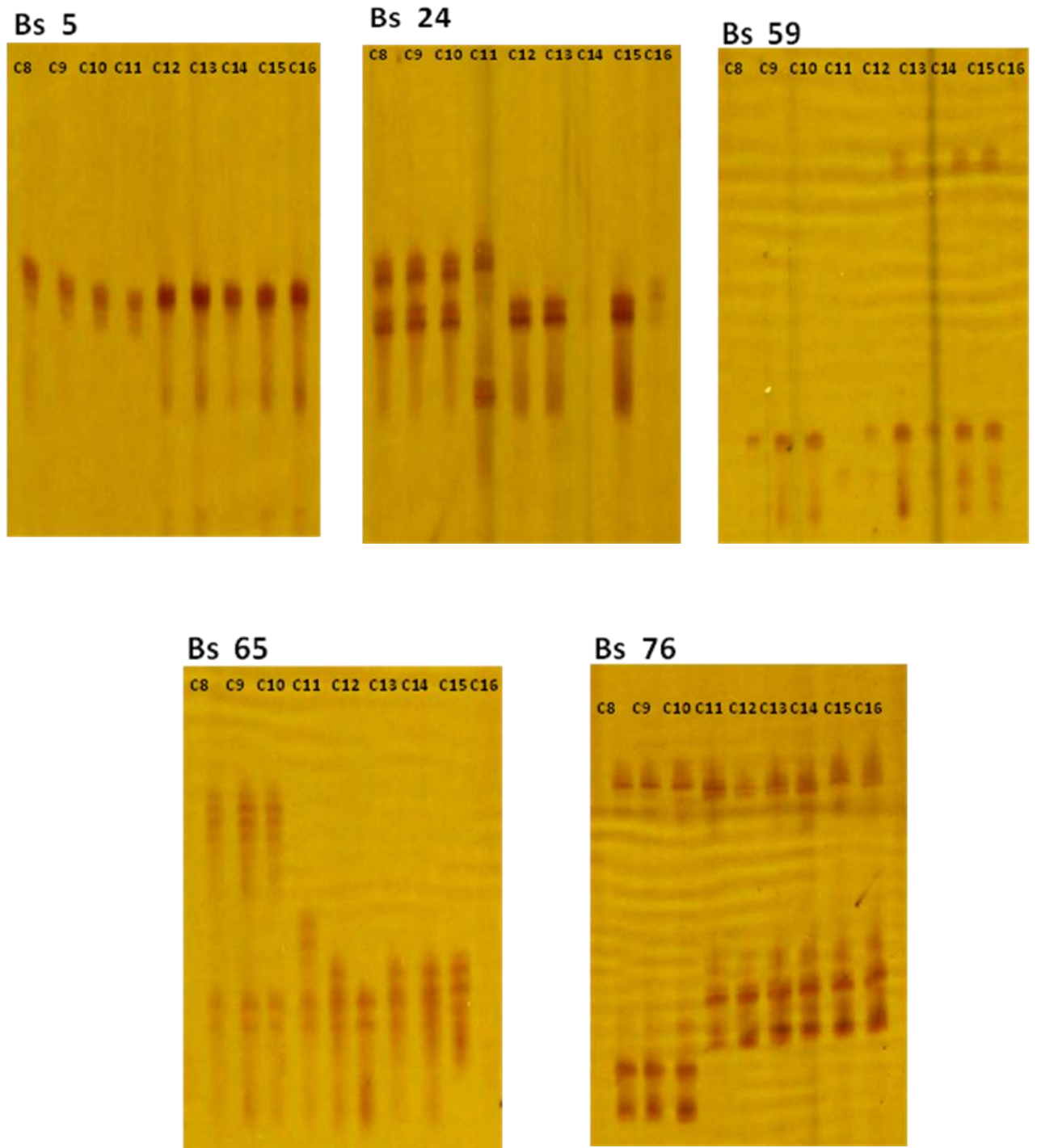
รูปที่ 3-25 The Neighbour-joining tree จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างเอื้องดินถิ่นไทย 4 ตัวอย่าง และพืชใน genus อื่นๆจากฐานข้อมูล (NCBI) โดยใช้ DNA barcode matK



รูปที่ 3-26 The Neighbour-joining tree จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างเอื้องดินถิ่นไทย 5 ตัวอย่าง และพืช genus อื่นๆจากฐานข้อมูล (NCBI) โดยใช้ DNA barcode rbcL

### การวิเคราะห์พันธุกรรมของดอกดินเมืองกาญจน์ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาจากกระชายสยาม ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) เช่นเดียวกับดอกดินเมืองกาญจน์ ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของดอกดินเมืองกาญจน์ เบื้องต้นจากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ พบว่า 5 คู่ไพรเมอร์ (8.6%) BS5, BS24, BS65, BS76, และ BS59 แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ทั้ง (รูปที่ 3-27) ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 5 คู่ นั้นถูกนำมาทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของดอกดินเมืองกาญจน์ ทั้ง 9 ตัวอย่าง พบว่าค่า expect heterozygosity (0.543) สูงกว่าค่า observed heterozygosity (0.511) เล็กน้อย แสดงถึงการเกิดภาวะ inbreeding ขึ้นในกลุ่มประชากรศึกษา อย่างไรก็ตามจากข้อจำกัดในจำนวนตัวอย่าง รวมถึงความหลากหลายของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ อาจมีผลต่อความความถูกต้องแม่นยำของการศึกษาในครั้งนี้



ภาพที่ 3-27 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์พันธุกรรมตัวอย่างดอกดินเมืองกาญจน์ทั้ง 9 ตัวอย่าง โดยเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาจากกระชายสยาม

## 5. อภิปรายและวิจารณ์ผล

### 5.1 เอื้องดินถิ่นไทย

จากการศึกษาการขยายพันธุ์เอื้องดินถิ่นในหลอดทดลองโดยใช้ตายอดเลี้ยงในอาหารเหลว 1/2MS, MS และ VW ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA) พบว่า ตายอดส่วนใหญ่ที่ได้จากการทดลองเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และบางส่วนถูกชักนำให้เกิดเป็นยอดขึ้น เนื่องจากตายอดของพืชทุกชนิดนั้นจะมีฮอร์โมนประเภทออกซินอยู่บริเวณตายอดอยู่แล้ว และการที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มของออกซินลงไปในการเลี้ยงทำให้ชิ้นส่วนพืชได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินมากเกินไป ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชและทำให้ชิ้นส่วนพืชไม่สามารถเจริญเติบโตและตายลง ผลการทดลองดังกล่าวทำให้ทราบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (NAA) ไม่เหมาะที่จะนำมาเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มจากตายอดในเอื้องดินถิ่นไทย

### 5.2 ดอกดินเมืองกาญจน์

ในการศึกษาครั้งนี้มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน 2 ชนิดร่วมกันทั้ง BA และ KN เนื่องจากดอกดินเมืองกาญจน์เคยถูกจัดอยู่ในสกุลเปราะ (*Kaempferia*) ซึ่ง Kochuthressia และคณะ (2012) ได้รายงานว่าการใช้อาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ KN ที่ระดับความเข้มข้น 1 มก./ล. เพาะเลี้ยง *Kaempferia galangal* L. เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้ *K. galangal* เกิดจำนวนยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 11 ยอดต่อชิ้นพืช โดยยอดที่เกิดขึ้นมีความยาวยอดเฉลี่ย 6.1 ซม. และจำนวนรากเฉลี่ย 12 รากต่อชิ้นพืช ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงดอกดินเมืองกาญจน์ที่พบว่าในระยะเวลา 4 สัปดาห์ภายหลังการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดเฉลี่ย 2 ยอดต่อชิ้นพืชเท่านั้น ขณะที่จำนวนรากที่เกิดขึ้นนั้น BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มก./ล. ชักนำให้เกิดรากมากที่สุดเฉลี่ย 2 รากต่อชิ้นพืช และเนื่องจากดอกดินเมืองกาญจน์ถูกย้ายสกุลมาอยู่ในสกุลขมิ้น (*Curcuma*) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงพืชบางชนิดในสกุลนี้มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน เช่น BA และ TDZ โดยถ้าใช้ BA เข้มข้น 5 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้ *Curcuma aromatic* Salsb. เกิดยอดใหม่ได้ 3 ยอดต่อชิ้นพืช (Nayak, 2000) ซึ่งจำนวนยอดที่เกิดขึ้นนี้ใกล้เคียงกับดอกดินเมืองกาญจน์ เนื่องจากการใช้ TDZ ในการเพิ่มปริมาณพืชในสกุลขมิ้นบางชนิดเช่น *Curcuma longa* L. (Prathanturug et al., 2004) และ *Curcuma comosa* Roxb. (Lo-apirukkul et al., 2012) พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี TDZ เข้มข้น 5 และ 4 มก./ล. นาน 8 สัปดาห์ ชิ้นพืชเกิดยอดใหม่ 7 และ 12 ยอด/ชิ้นพืช ตามลำดับ ซึ่งยอดที่เกิดขึ้นมากกว่าการใช้ BA เข้มข้น 2-4 มก./ล. เพาะเลี้ยงดอกดินเมืองกาญจน์ (2-3 ยอด/ชิ้นพืช) อย่างไรก็ตามเมื่อนำดอกดินเมืองกาญจน์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนสารควบคุมการเจริญเติบโตไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าจำนวนยอดต่อชิ้นพืชเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 10 ยอด/ชิ้นพืช โดยได้ต้นที่สมบูรณ์พร้อมจะนำออกอนุบาลภายนอกหลอดทดลองต่อไป

## 6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 6.1 เอื้องดินถิ่นไทย

การขยายพันธุ์เอื้องดินถิ่นไทยในหลอดทดลอง ทำการตัดตายอดเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2MS จนเกิดเป็นต้นอ่อน จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร 1/2MS เพื่อให้เกิดต้นอ่อนที่สมบูรณ์ เมื่อต้นสูงจากโคนถึงปลายใบ ประมาณ 15 เซนติเมตร ตัดให้เหลือโคน ประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร 1/2MS ที่เติม BA 2 มก./ล. พบว่าในเวลา 3 เดือน จะได้ยอดเพิ่มขึ้น ประมาณ 1-2 ยอด/ชิ้นส่วน

### 6.2 ดอกดินเมืองกาญจน์

โดยสรุปแล้วถ้าต้องการเพาะเลี้ยงดอกดินเมืองกาญจน์ให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ได้จำนวนมากในหลอดทดลองควรใช้อาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และย้ายไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนาน 4 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงดอกดินเมืองกาญจน์ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เป็นงานวิจัยที่ควรนำมาศึกษาเปรียบเทียบต่อไป

## 7. บรรณานุกรม

1. พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง, ครรชิต ธรรมศิริ, ทยา เจนจิตติกุล, งามนิจ ชื่นบุญงาม, สมภาพ ประธานธรรักษ์. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการความหลากหลายทางชีวภาพและการอนุรักษ์พันธุ์พืชใกล้สูญพันธุ์ พืชเฉพาะถิ่น พืชอาหาร พืชสมุนไพร และพืชที่มีศักยภาพเป็นไม้ดอกไม้ประดับในพื้นที่ปกปักรักษาพันธุ์กรรมพืช ในพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งเป็นโครงการย่อยในแผนงานวิจัยเรื่อง การถ่ายทอดความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์พืชท้องถิ่นจังหวัดกาญจนบุรี; 2554.
2. ธวัชชัย สันติสุข. พืชถิ่นเดียวและพืชหายากของประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: อาร์ต อิน โปรดักชั่น; 2543.
3. สลิล สิทธิสังธรรม. 2549. กล้วยไม้ป่าเมืองไทย (Wild orchid of Thailand). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. บ้านและสวน, 495 น.
4. Compton ME. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. Plant Cell Tissue Organ Cult 1994; 37: 217-242.
5. De Vienne D, Santoni S, Falque M. Principle Sources of Molecular Markers. In: de Vienne D, editor. Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology. Enfield, NH: Science Publishers, Inc.; 2002. p. 3-46.
6. Ghosh S., and Jha S. Chelchicine-An overview for plant biologist. In: Ramawat KG, Merillon KM, editors. Bioactive molecules and medicinal plants. Springer: p.215-232; 2008.
7. Gunner seidenfaden. 1978. Orchid Genera in Thailand VI *Neottioideae* Lindl. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehradun

8. Hamann O. The Joint IUCN-WWF plants conservation programme and its interest in medicinal plants. In: Akerele O, Heywood V, Synge H, editors. The conservation of medicinal plants. Cambridge: Cambridge University Press; 1988. p. 13-22.
9. Jacobs J.P., Yoder J.I. Ploidy levels of transgenic tomato plants determined by chloroplast number. Plant Cell Rep., 1989; 7: 662-664
10. Kochuthressia, K.P., John Britto, S., Jaseentha, M.O. 2012. In vitro multiplication of *Kampferia galanga* L. An endangered species. International Research Journal of Biotechnology (ISSN: 2141-5153), pp. 027-031
11. Kress WJ, Larsen K. *Smithatris*, a new Genus of Zingiberaceae from Southeast Asia. Systematic Botany 2001; 26(2): 226-230.
12. Larsen K, Mood J. *Siamanthus* a new genus of Zingiberaceae from Thailand. Nordic J Bot 1998; 18(4): 393.
13. Larsen K. *Geostachys smitinandii* K. Larsen (Zingiberaceae), a new species from Thailand. Thai For. Bull. (Bot.) 2001; 29: 17-22.
14. Larsen K, Larsen SS. Gingers of Thailand. Chiang Mai: Queen Sirikit Botanic Garden; 2006.
15. Lo-apirukkul, S., Jenjittikul, T., Saralamp, Prathanturarug, S. 2012. Micropropagation of Thai medicinal plant for women's health, *Curcuma comosa* Roxb., via shoot and microrhizome inductions. Journal of Natural Medicines, 66:265-270
16. McCuiston, F., Elmstrom G.W. Identifying polyploids of various cucurbits by various guard cell chloroplast number. Proc. Fla. State Hort. Soc., 1993; 106: 155-157.
17. Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), 1.3: A Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data. <http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/tlem09/docs/TFPGADOC.PDF>
18. Mize C, Chun Y. Analysing treatment means in plant tissue culture research. Plant Cell Tissue Organ Cult 1988;13:201-217.
19. Nayak. 2000. In vitro multiplication and microrhizome induction in *Curcuma aromatic* Salisb. Plant Growth Regulation 32: 41-47.
20. Nguyen HT, Wu X. Molecular Systems for Genetics Mapping. In Meksem K and Kahl G, editors. The Handbook of Plant Genome Mapping: Genetic and Physical Mapping. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2005. p. 22-52.
21. Petersen R. Use and misuse of multiple comparison procedures. Agron J 1977; 69: 205-8.
22. Prathanturarug, S., Soonthornchareonnon, N., Chuakul, W., Phaidee, Y., Saralamp, P. 2004. Rapid micropropagation of *Curcuma longa* L. using bud explants pre-

- cultured inthidiazuron-supplemented liquid medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80:347-351
23. Saensouk S, Jenjittikul T. *Kaempferia grandifolia* sp. nov. (Zingiberaceae) a new species from Thailand. Nord J Bot 2001; 21(2): 139-142.
24. Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjioudjop MN. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology. 5 (25), 2540-2568.
25. Shinichi A., Daisuke S. In vitro induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. Scientia Horticulturae 2001; 88 (4): 277-287.
26. Techaprasan J, Skornickova J L. Transfer of *Kaempferia candida* to Curcuma (Zingiberaceae) based on morphological and molecular data. Nord J Botany 2011; 29: 773-779.
27. Theilade I. A synopsis of the genus *Zingiber* (Zingiberaceae) in Thailand. Nord J Bot 1999; 19(4): 389-410.

ผลผลิตจากโครงการการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเพิ่มปริมาณ  
ต้นเอื้องดินถิ่นไทยและดอกดินเมืองกาญจน์ในหลอดทดลอง

1. นำเสนอผลการวิจัยในการสัมมนาระดับชาติ/นานาชาติ

Sraphet S, Saengsri A, Smith DR, Triwitayakorn K. Genetic analysis of *Cheirostylis* sp. based on microsatellite markers. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization. NIAB 2014.

© NIAB 2014  
ISSN 1479-2621

Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization; 1–4  
doi:10.1017/S1479262114000914

## Short Communication

# Genetic analysis of *Cheirostylis* species based on microsatellite markers

Supajit Sraphet\*, Anuwat Saengsri, Duncan R. Smith and  
Kanokporn Triwitayakorn\*

*Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom 73170,  
Thailand*

Received 24 April 2014; Accepted 1 August 2014

### Abstract

Microsatellite markers specific to *Cheirostylis yunnanensis* Rolfe were developed using an enriched genomic DNA library technique. The library was constructed using (AG)<sub>20</sub> and (CAG)<sub>20</sub> oligonucleotide repeats. A total of 48 primer pairs were designed and tested with 48 *C. yunnanensis* Rolfe samples, resulting in 11 polymorphic loci. The number of alleles per locus ranged from 2 to 12, with an average of six alleles. The observed and expected heterozygosity ranged from 0.0426 to 0.8085 and 0.0421 to 0.9078, respectively. Of the 11 polymorphic loci, three showed a significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium and one exhibited linkage disequilibrium. Cross-species amplification was tested with five samples of *Cheirostylis* of unknown species resulting in eight loci that could be amplified, with the number of alleles ranging from one to two. The microsatellite markers developed in this study will be useful for the genetic analysis of *C. yunnanensis* in order to differentiate species as well as to establish a conservation plan for this species.

**Keywords:** *Cheirostylis* sp; cross-amplification; enriched genomic library; microsatellite

## 2. บทความตีพิมพ์ในวารระดับชาติ/นานาชาติ

ได้รับรางวัล Best Poster Award: 16th Flora of Thailand Conference, KEW Royal Botanic Garden

Nattapon Nopporncharoenkul, Thaya Jenjittikul and Puangpaka Soontornchainaksaeng.  
Cytogenetic characters of *Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Škorničk (Zingiberaceae).  
16<sup>th</sup> Flora of Thailand Conference, KEW Royal Botanic Garden .



### Cytogenetic characters of *Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Škorničk (Zingiberaceae)

Nattapon Nopporncharoenkul<sup>1</sup>, Thaya Jenjittikul<sup>1</sup> and Puangpaka Soontornchainaksaeng<sup>1,\*</sup>  
<sup>1</sup> Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.  
\*Corresponding author (✉) : puangpaka.ump@mahidol.ac.th

#### ABSTRACT

*Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Škorničk is a semi-endemic, rare and vulnerable plant in Thailand. Some morphological characters of *C. candida* are similar to those of *Kaempferia* and *Curcuma*. The objective of this study is to investigate chromosome number, meiotic figure and DNA content of *C. candida* in comparison to some *Curcuma* and *Kaempferia*. The results revealed that *C. candida* has very small chromosomes less than 2  $\mu$ m of  $2n=42$  in somatic cells with nuclear DNA content of 1.77 pg. While meiotic figure of this plant shows 21 bivalents in first metaphase of pollen mother cell. These chromosome characters and genome size are similar to those found in some *Curcuma*, which are different from those of *Kaempferia*. Therefore, the results of this study suggested that *C. candida* is evidently belonged to genus *Curcuma*.

#### BACKGROUND

*Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Škorničk or *Kaempferia candida* as previous name has the beautiful inflorescences which are used as vegetable and also has a potential to become medicinal and ornamental plant (Jenjittikul & Larsen, 2000; Picheansoonthon & Koonterm, 2008). It is a semi-endemic species in Burma and rare plant in Thailand, vulnerable and endangered species at present (Leong-Skornickova, 2012). Some morphological characters of *C. candida* are similar to those of both *Kaempferia* and *Curcuma*.  
Cytogenetic approach can be used to accurately verify the plant taxonomic classification to the genera. However, chromosome characteristic of *C. candida* have never been studied.

#### METHODOLOGY

Chromosome number was investigated by using Feulgen squash method with minor modification (Soontornchainaksaeng & Jenjittikul, 2010) and nuclear DNA content was estimated using propidium iodide flow cytometry (Dolezel & Borto, 2005).

#### RESULTS

*Curcuma candida* contains very small chromosomes less than 2  $\mu$ m of  $2n=42$  in somatic cells with nuclear DNA content of 1.77 pg. While meiotic figure of this plant shows 21 bivalents in first metaphase of microsporocyte.



◀ Fig 1. Some *Kaempferia* and *Curcuma* plant. (A) *Kaempferia rotunda* L. and (B) *Curcuma camosa* Roxb.

#### OBJECTIVES

To clarify chromosome number, meiotic configuration and genome size of *Curcuma candida* in comparison to some *Curcuma* and *Kaempferia*.

#### PLANT MATERIALS

- Curcuma candida* (Wall.) Techaprasan & Škorničk

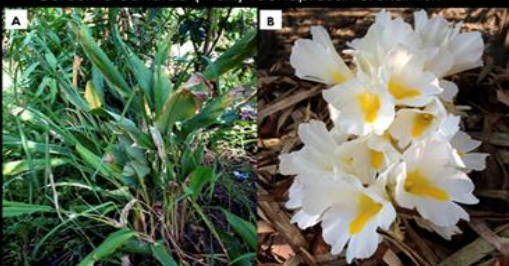


Fig 2. *Curcuma candida* from Sangkhlaburi and Thong Pha Phum District of Kanchanaburi Province, Thailand. (A) Pseudostems and leaves and (B) inflorescences.

#### DISCUSSIONS AND CONCLUSIONS

Previous records of chromosome study show that *Kaempferia* has chromosome numbers of  $2n=22, 33$ , and rare 44, while *Curcuma* contains a wide range of somatic numbers ( $2n$ ) from 20 to 42, 63, and 84 (Soontornchainaksaeng & Jenjittikul, 2010; Chen & Xia, 2013).  
Nuclear DNA content of *Kaempferia* plant is variable ranging from 2.33-5.26 pg in diploid plants (Chandmai, 2012), while *Curcuma* are variable ranging from 1.79-2.45 pg in diploidy with  $2n=42$ .  
*Curcuma candida* has very small chromosomes less than 2  $\mu$ m and contains  $2n=42$  with nuclear DNA content of 1.77 pg. The results of cytogenetic study indicate that *C. candida* is a member of *Curcuma*.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST)  
National Research Council of Thailand (NRCT)  
Plant Cytogenetic Laboratory, Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University.

#### REFERENCES

Chen, J. & Xia, N. 2013. Chromosome numbers and ploidy levels of Chinese *Curcuma* species. *HortScience* 48:525-530.  
Chandmai, J., Jenjittikul, T. & Soontornchainaksaeng, P. 2012. Genome size Chromosome number and Leaf character of *Kaempferia*. *Proceedings of the 38th Congress on Science and Technology of Thailand (STT38)*. 17-19 Oct 2012, Erawan Convention Centre, Chiang Mai, Thailand.  
Dolezel, J. & Borto, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. [J]. *Annals of Botany* 95:99-110.  
Jenjittikul, T. & Larsen, K. 2000. *Kaempferia candida* Wall. (Zingiberaceae), a new record for Thailand. *Thai For Bull* (Bot) 128:45-49.  
Picheansoonthon, C. & Koonterm, S. 2008. Notes on the genus *Kaempferia* L. (Zingiberaceae) in Thailand. *Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine*, 6(1):27-51.  
Soontornchainaksaeng, P. & Jenjittikul, T. 2010. Chromosome number variation of phytoestrogen-producing *Curcuma* (Zingiberaceae) from Thailand. *J Natl. Med* (2010). 64:370-377.  
Leong-Skornickova, J., Tron, H.D., Newman, M., Lamay, V. & Bouamamwong, S. 2012. *Curcuma candida*. In: IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 June 2014.

### 3. ผลิตภัณฑ์รุ่นใหม่

น.ส. สิริวิภา แสงคำ

นักศึกษา ป.โท ภาควิชาพฤกษศาสตร์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ เรื่อง “การขยายพันธุ์เอื้องดินถิ่นไทย เพื่อการอนุรักษ์”

อยู่ระหว่างการจัดทำบทความ เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร ScienceAsia