



กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 – 2557 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งมา ณ ที่นี้

บทคัดย่อภาษาไทย

ปัจจุบันมีการส่งเสริมให้มีการใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการรักษาโรค เพื่อทดแทนยาแผนปัจจุบัน เป็นการลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ และเพิ่มรายได้ให้กับท้องถิ่นให้มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ อย่างไรก็ตาม จากปัญหาของสมุนไพรต่างชนิดที่เรียกชื่อเหมือนกันแต่มีสรรพคุณแตกต่างกันเป็นจำนวนมากทำให้มีความสับสนในการนำพืชสมุนไพรเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ ซึ่งอาจเกิดผลเสียแก่ผู้บริโภคได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเอกลักษณ์ระดับโมเลกุลโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของพืชสมุนไพร พืชถิ่นเดียว พืชหายากและพืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย เพื่อสร้างความเข้าใจอย่างถูกต้อง และสร้างจิตสำนึกในการอนุรักษ์ และมีการถ่ายทอดภูมิปัญญา เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างเป็นระบบ และเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ต้องการตามหลักพฤกษศาสตร์ ซึ่งจะเป็ประโยชน์ในการจัดการและวางนโยบายการพัฒนาการใช้ทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน นอกจากนี้แล้วเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นนั้น ยังเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพต่อการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการวิเคราะห์ชนิดและความถูกต้องของสมุนไพรที่นำมาใช้เป็น ส่วนประกอบหลักของตำรับยาต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ และ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ระดับโมเลกุลโดยใช้เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช และศึกษาความเป็นไปได้และประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นในการตรวจสอบชนิดและความถูกต้องของพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการผลิตยาสมุนไพร โดยในงานวิจัยนี้ศึกษาพืช 5 ชนิด ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่ง เทียนนางคาร์ หน่อก้านแดงหรือขยัน ปุดเดือน และเปราะราศี ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนตัวอย่างพืชมีน้อย และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ อาจเนื่องมาจากพืชเหล่านี้เป็นพืชหายาก และ/หรือเป็นพืชถิ่นเดียวที่มีการกระจายตัวอยู่ในบริเวณที่จำกัด ดังนั้น ภาวะการผสมพันธุ์แบบ inbreeding จึงเกิดขึ้นได้สูงมากในกลุ่มประชากรพืชเหล่านี้ เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ไมโครแซทเทลไลท์ ทำให้พบว่ามีเครื่องหมายที่แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมจำนวนไม่มากนัก จึงได้ทำการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ *matK* *rbcL* และ *ITS2* เข้ามาใช้ในการศึกษาวิจัยของโครงการเพิ่มเติม เพื่อจำแนกชนิดของพืชทั้ง 5 ชนิดนี้ พบว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถจำแนกพืชทั้ง 5 ชนิด ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณยีนที่เลือกมาใช้นั้นมีความแตกต่างจากพืชชนิดอื่นโดยสิ้นเชิง ดังนั้นจึงมีความจำเพาะสูงมากกับชนิดของพืชที่ใช้ตรวจสอบ

คำสำคัญ: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด พืชสมุนไพร พืชอาหาร พืชถิ่นเดียว พืชหายาก พืชใกล้สูญพันธุ์ คลังดีเอ็นเอของจีโนม เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)

Currently, products from medicinal plants have been promoted for disease treatment to replace and reduce the amount of imported modern drugs. Additionally, this strategy can significantly increase revenue for locals. However, there are still the problems of different types of herbs having the same common name but different properties, leading to confusion in the use that might affect to the customers. Therefore, it is necessary to identify molecular markers for genetic conservation of endemic plants and endangered plants of Thailand. This helps to create awareness on conservation and knowledge transfer to set up the sustainable exploitation system with the accurate information on botanical principles. This will be also practical for environmental policy and sustainable management of natural resources. Moreover, the molecular marker is also a powerful tool for identification of the accurate medicinal plants that will be used as components of traditional herb medicinal recipe as well. This research aims to develop a system for medicinal plant identification based on microsatellite markers and DNA barcoding. These markers will be used for plant genetic diversity analysis and concerned for the feasibility of potential applications in identification of accurate plants used for medicinal products. In this research, five selected plants, *Buchanania siamensis* Miq., *Impatiens skerriae* Craib, *Bauhinia strychnifolia* Craib, *Hedychium longicornutum* Griff. ex Baker, and *Kaempferia larsenii* Sirirugsa have been concerned. These five selected plants are rare and/or endemic species which may particularly have frequently narrow ecological niches, small distributional ranges and close inbreeding. Accordingly, just small amount of microsatellite markers developed in this study could display significant polymorphism. Thus, DNA barcode including *matK*, *rbcL* and *ITS2* were then tested for discrimination of these 5 plant species. As a result, all *matK*, *rbcL* and *ITS2* regions showed the effectiveness in the discrimination of the species tested from their related species. Nucleotide sequences of these barcode DNA regions could reveal polymorphisms at interspecific level.

Key words: DNA fingerprint, DNA barcoding, medicinal plant, edible plant, endemic plant, rare plant, threatened genomic DNA library, microsatellite marker

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
ส่วนประกอบตอนต้น	
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อภาษาไทยและคำสำคัญ	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษและคำสำคัญ	3
สารบัญเรื่อง	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญภาพ	6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	7
ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง	8
1. บทนำ	8
2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	8
3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	10
4. ผลการวิจัย	11
5. อภิปรายและวิจารณ์ผล	18
6. สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ	18
7. บรรณานุกรม	19
8. ภาคผนวก	21
ส่วนประกอบตอนท้าย	
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยและคณะนักวิจัยโครงการที่ 3	78



สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่		หน้า
1	พืชที่ใช้ในการทำวิจัย	13
1	แสดงรายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการในแต่ละชนิดพืช	13
2	สรุปผลความก้าวหน้าการดำเนินงานของโครงการ	14
3	งานที่ทำเพิ่มเติมจากข้อเสนอโครงการ	14

สารบัญภาพ (List of Illustration)

รูปที่		หน้า
1	ตัวอย่างผลการตัดชิ้นดีเอ็นเอตั้งต้นด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ	15
2	ตัวอย่างผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ผ่านกระบวนการติด Adapter ใน กระบวนการพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่สมกับ Adapter	15
3	ตัวอย่างผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ผ่านกระบวนการไฮบริดเซชันเพื่อ คัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีไมโครแซทเทลไลต์ในกระบวนการพีซีอาร์	16
4	ตัวอย่างการออกแบบไพรเมอร์โดยโปรแกรม WebSat	16
5	ลักษณะผลการวิเคราะห์ polymorphic screening ในตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ PK91 (a) และ PK01 (b) บน 5 % Acrylamide gel	17



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

NS	หมายถึง	Non specific PCR products
PCR	หมายถึง	Polymerase Chain Reaction
SSR	หมายถึง	Simple Sequence Repeat

1. บทนำ

1.1 หลักการเหตุผลและระบุสาเหตุที่ต้องดำเนินการวิจัย

ปัจจุบันมีการส่งเสริมให้มีการใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการรักษาโรค เพื่อทดแทนยาแผนปัจจุบัน เป็นการลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ และเพิ่มรายได้ให้กับท้องถิ่นให้มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ โดยถือเป็นวาระแห่งชาติ ทั้งนี้จากร่างคู่มือการใช้ยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2554 ซึ่งกำหนดตัวยาที่อยู่ในตำรับยาจำนวน 247 ชนิด และเนื่องจากการที่พบว่า มีสมุนไพรต่างชนิดที่เรียกชื่อเหมือนกันแต่มีสรรพคุณแตกต่างกันเป็นจำนวนมากทำให้มีความสับสนในการนำพืชสมุนไพรเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ ซึ่งอาจเกิดผลเสียแก่ผู้บริโภคได้ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาเอกลักษณ์ระดับโมเลกุลโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของพืชสมุนไพร พืชถิ่นเดียว พืชหายากและพืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย เพื่อสร้างความเข้าใจอย่างถูกต้อง และสร้างจิตสำนึกในการอนุรักษ์ และมีการถ่ายทอดภูมิปัญญา เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างเป็นระบบ และเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องตามหลักพฤกษศาสตร์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการจัดการและวางนโยบายการพัฒนาการใช้ทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน นอกจากนี้แล้ว เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นนั้น ยังเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพต่อการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการวิเคราะห์ชนิดและความถูกต้องของสมุนไพรที่นำไปใช้เป็นส่วนประกอบหลักของตำรับยาต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ที่จำเพาะต่อพืช 5 ชนิด ได้แก่ ธนนิไชย เทียนนางคาร์ ภูพานางแดงหรือขยัน ปุดเดือน และ เปราะราศี
- 2) เพื่อศึกษาเอกลักษณ์ระดับโมเลกุลของพืชทั้ง 5 ชนิดโดยใช้เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
- 3) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชทั้ง 5 ชนิด
- 4) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้และประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจสอบชนิดและความถูกต้องของพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการผลิตยาสมุนไพร

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเฉพาะพันธุ์พืชเป็นจำนวนมาก จากการสำรวจเบื้องต้นพบพืชสมุนไพร พืชถิ่นเดียว พืชหายากและพืชใกล้สูญพันธุ์ ของประเทศไทยเป็นจำนวนมากที่ยังไม่เป็นที่รู้จัก และยังไม่มีการศึกษาวิจัยเอกลักษณ์ระดับโมเลกุลและอนุรักษ์พันธุกรรม ดังนั้น จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาเพื่อประโยชน์ทั้งในด้านการอนุรักษ์และการประยุกต์ใช้ในด้านอื่น ๆ ต่อไป ซึ่งปัจจุบันเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker technology) เป็นเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular genetics) ที่เข้ามามีบทบาทสำคัญในการศึกษาทางด้านพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด รวมถึงการศึกษาวิจัยทั้งทางด้านการเกษตร การแพทย์ และงานด้านการอนุรักษ์ การคัดเลือกปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์พืชและสัตว์ (Semagn et al., 2006, Hubert และ Hedgecock, 2004, Sekin และ Hara, 2007) จากข้อมูลงานวิจัย พบว่ามีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลขึ้นหลากหลายชนิด และการ

นำไปประยุกต์ใช้นั้นก็แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของเครื่องหมายแต่ละชนิดและลักษณะของงานวิจัย อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลโลท์ หรือ เอสเอสอาร์ (Microsatellite or SSR: Simple Sequence Repeat) เป็นชนิดที่ได้รับความนิยมและมีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย (Varshney et al., 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการวิเคราะห์การถ่ายทอดทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

ไมโครแซทเทลโลท์ คือ บริเวณของเส้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเป็นยูนิตจำนวน 2-6 เบส เช่น (AG) n , (GCT) n , (ATGC) n , (CAGGC) n เป็นต้น (Tautz et al., 1986 และ Morgante et al., 2002) โดยที่ n เป็นจำนวนซ้ำตั้งแต่ 4 ซ้ำไปจนถึงหลายสิบซ้ำ โดยการเรียงตัวของลำดับเบสซ้ำนี้อาจเกิดจากการแทรก หรือการแทนที่ของลำดับเบสที่ไม่ใช่ลำดับเบสซ้ำ แล้วทำให้เกิดลำดับเบสซ้ำเรียงตัวกันซึ่งอาจจะเกิดจากการทำงานที่ผิดพลาดของเอนไซม์ DNA polymerase ในบริเวณลำดับเบสซ้ำระหว่างกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ ที่เรียกว่า DNA replication (Levinson et al., 1987) เกิดจาก retrotransposition (Nadir et al., 1996) หรือ unequal crossing over (Richard และ Paques, 2000) ไมโครแซทเทลโลท์จะกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม โดยปกติพบในพืช ทุกๆ 29 kb ถึง 50 kb (Morgante และ Olivieri, 1993, Wang et al., 1994) และไมโครแซทเทลโลท์แบบซ้ำที่มีสองเบส (di nucleotide repeat) จะพบได้บ่อยครั้งที่สุด (Varshney et al., 2000) ในพืช di nucleotide repeat แบบ AT, GA และ GT พบมากที่สุด (Gupta et al., 2000, Morgante et al., 2002) ในขณะที่ tri nucleotide repeat แบบ AAG และ AAT motifs พบมากที่สุด (Morgante และ Olivieri et al., 1993, Gupta et al., 1996). นอกจากนี้ จำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลโลท์ที่ตำแหน่งเดียวกันของจีโนมนั้นทำให้เกิดความแตกต่าง (Polymorphism) ระหว่างจีโนไทป์ (Lagercrantz et al., 1993) ซึ่งสามารถตรวจได้ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไมโครแซทเทลโลท์นั้นอยู่ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) โดยอาศัยไพรเมอร์ชนิดไมโครแซทเทลโลท์ที่ออกแบบจากบริเวณที่ครอบคลุมบริเวณส่วนหัวและท้ายของไมโครแซทเทลโลท์ (Abdelkrim et al., 2009) ดังนั้น ไพรเมอร์แต่ละคู่จะสามารถตรวจสอบไมโครแซทเทลโลท์ในตำแหน่งที่จำเพาะ (Locus-specific marker)

เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลโลท์ มีข้อดีคือ สามารถแสดงจีโนไทป์แบบข่มร่วม (codominant) ให้ polymorphism สูงระหว่างจีโนไทป์ สามารถนำมาใช้ในสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกัน (transferability) และยังให้ผลเหมือนเดิมเมื่อทำซ้ำ (reproducibility) นอกจากนี้ เป็นการง่ายในการนำมาใช้เพื่อศึกษาข้อมูลพันธุกรรมเพราะใช้เพียงเทคนิค PCR (Gupta และ Varshney, 2000 และ Butcher et al., 2000) แต่อย่างไรก็ตาม การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลโลท์นั้นยังมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก (Li et al., 2001)

ในปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลโลท์คือ การวิเคราะห์หาไมโครแซทเทลโลท์จากฐานข้อมูลทั้งที่เป็น genomic DNA และ cDNA หรือ gene และออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรมต่าง ๆ (Tangphatsornruang et al., 2008) เช่น WebSat-web tools (Martins et al., 2009) วิธีนี้นั้นรวดเร็ว และประหยัด (Zhan et al., 2009) แต่มีข้อจำกัดในสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีฐานข้อมูล (Varshney et al., 2005) ดังนั้น ในกรณีของสิ่งมีชีวิตที่มีข้อมูลทางพันธุกรรมน้อยหรือไม่มี เช่น พืชสมุนไพร พืชถิ่นเดียว พืชหายาก และพืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย วิธีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลโลท์ด้วยการสร้างคลังดีเอ็นเอของจีโนมแบบ enriched (enriched libraries) จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด ข้อดีคือ พบไมโครแซทเทลโลท์เป็นจำนวนมาก (Zane et al., 2002 และ Nunome et al., 2006) แม้ว่าจะมีการซ้ำของไมโคร

รแซทเทลไลท์ที่เหมือนกันเป็นจำนวนมาก และมีค่าใช้จ่ายสูง (Squirrell et al., 2003 และ Burns et al., 2001)

3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. สํารวจและเก็บตัวอย่างในบริเวณพื้นที่ศึกษา (โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากโครงการย่อยที่ 1)
สํารวจโดยการจดบันทึกลักษณะนิสัย (habit) และสภาพทางนิเวศวิทยาของพื้นที่ที่พืชสมุนไพร พืชอาหาร พืชถิ่นเดียว และพืชหายากใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทยอาศัยอยู่ เก็บตัวอย่างใบอ่อนของพืชเพื่อส่งวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ
2. สร้างคลังดีเอ็นเอของจีโนมที่มี microsatellite
สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบพืช ตัดชิ้นดีเอ็นเอตั้งต้นด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *AluI*, *HaeIII* และ *AfaI* โดยตัดใน tube แยกกัน และทำความสะอาดดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System ทำการติด double strand adapters เข้าที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอ จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอดังกล่าวมาใช้ในการ Hybridization กับดีเอ็นเอโพรบซึ่งเป็นเส้นดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำๆ (เช่น AC_{12} , AT_{12} , CTT_8) ตามด้วยการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีอาร์ (PCR) โดยใช้ single strand adapter เป็นไพรเมอร์ นำ PCR product มาแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบน agarose gel จากนั้นตัดเจลในช่วงระหว่าง 500-1,500 เบส เพื่อคัดเลือขนาดชิ้นดีเอ็นเอและสกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจล agarose ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit ก่อนที่จะทำการใส่เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequencing)
3. การวิเคราะห์หาลำดับไมโครแซทเทลไลท์และออกแบบไพรเมอร์
นำผลลำดับเบสหาลำดับไมโครแซทเทลไลท์ และออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Websat (<http://wsmartins.net/websat/>)
4. การวิเคราะห์ทางพันธุกรรม (genotyping)
สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบพืช ด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Doyle และ Doyle (1987) โดยบดตัวอย่างใบพืชด้วยไนโตรเจนเหลว เติมน extraction buffer และแช่ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 20 นาที เติมน choroform:isoamyl alcohol และปั่นตกเพื่อเก็บส่วนของเหลวส่วนบน นำมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol และตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย distilled water ที่มี RNase A และเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C
นำดีเอ็นเอมาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้ทำการออกแบบไว้แล้วในเบื้องต้นตามวิธีที่อธิบายโดย Kunkeaw และคณะ (2010) ซึ่ง PCR ปริมาตร 15 μ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 25 ng, forward และ reverse ไพรเมอร์อย่างละ 0.2 μ M, dNTP 0.2 mM, 1x PCR buffer, $MgCl_2$ 1.5 mM และ *Taq* DNA polymerase 1 U และใช้ PCR cycle ดังนี้
 - a. Denaturation 94 °C 2 นาที
 - b. ตามด้วย 30 รอบของ Denaturation 94°C 45 วินาที Annealing (โดยเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละคู่ไพรเมอร์) 45 วินาที และ Extension 72°C 1 นาที
 - c. จากนั้น Final extension 72 °C 5 นาที

นำ PCR product มาแยกขนาดบน 5% denaturing polyacrylamide gel และนำเจลมาย้อม แอบตีเอ็นเอด้วยวิธี Silver Staining (Benbouza et al. 2006) นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผล

5. วิเคราะห์ข้อมูล

จากข้อมูลพันธุกรรมของตัวอย่างศึกษา หรือ genotypic data ที่ได้ทำการทดสอบกับไพรเมอร์ที่ได้ พัฒนาขึ้นแล้วนั้น ข้อมูลดังกล่าวจะถูกนำมาวิเคราะห์ดูความสามารถในการตรวจสอบและจำแนกชนิดพืช สมุนไพร พืชอาหาร พืชถิ่นเดียว และพืชหายากใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย

นอกจากนี้ นำข้อมูลพันธุกรรมมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (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 โดยจะทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบทั้งภายในกลุ่มและระหว่าง กลุ่มประชากรตัวอย่างศึกษา

6. การศึกษาศักยภาพเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาได้ ในการประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการ ตรวจวิเคราะห์ความถูกต้องของตัวอย่างวัตถุดิบในการผลิตยาสมุนไพรไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างสมุนไพร แห่งจากแหล่งต่างๆ มาทำการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ได้รับการตรวจสอบความ ถูกต้องแล้ว โดยวิธี PCR ดังรายละเอียดข้างต้น

4. ผลการวิจัย

4.1 พืชตัวอย่าง

ตารางที่ 1 พืชที่ใช้ในการทำวิจัย

ชื่อวิทยาศาสตร์ วงศ์	ชื่อไทย
<i>Buchanania siamensis</i> Miq. ANACARDIACEAE	ธนนไชย
<i>Impatiens kerriae</i> Craib BALSAMINACEAE	เทียนนางคาร์
<i>Bauhinia strychnifolia</i> Craib LEGUMINOSAE	หญ้านางแดง หรือ ขยั่น
<i>Hedychium longicornutum</i> Griff. ex Baker ZINGIBERACEAE	ปุดเดือน
<i>Kaempferia larsenii</i> Sirirugsa ZINGIBERACEAE	เปราะราศี

4.2 การสร้างคลังดีเอ็นเอของจีโนมที่มีไมโครแซทเทลไลต์มาก

ทำการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบของพืชแต่ละชนิด จากนั้นจึงทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอตั้งต้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (รูปที่ 1) และนำตัวอย่างที่ได้ทำผ่านขั้นตอนในการคัดเลือกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะเลือกชิ้นที่มีขนาด 500-1500 เบสมาทำการติด Adapter เข้าที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอ และนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในกระบวนการพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่สมกับ Adapter (รูปที่ 2) จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอดังกล่าวมาใช้ในการ Hybridization กับดีเอ็นเอโพรบซึ่งเป็นเส้นดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำๆ และนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีส่วนของเบสซ้ำมาเพิ่มจำนวนอีกครั้งโดยพีซีอาร์ (รูปที่ 3) ก่อนที่จะทำการ clone เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequencing) และนำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยขั้นตอนนี้ ได้ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้วในตัวอย่างพืช 5 ชนิด คือ ขยันทัน ไชย ปุดเดียน เทียนนางคาร์ และเปราะราศี

4.3 การออกแบบไพรเมอร์

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้มานั้น ถูกนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม WebSat (รูปที่ 4) ทั้งนี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ของตัวอย่างพืช 4 ชนิด แล้ว ยกเว้นเทียนนางคาร์ ซึ่งจะได้ดำเนินการในพืชชนิดนี้ต่อไป

4.4 การทดสอบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้นั้น ถูกนำมาวิเคราะห์กับดีเอ็นเอของพืชแต่ละชนิด เพื่อวิเคราะห์หาไพรเมอร์ที่ให้ผลแสดงความแตกต่างในพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ โดยในขั้นตอนนี้ ได้ดำเนินการในพืชขยันทัน โดยพบว่า จากไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งสิ้น 17 คู่ นั้น 13 คู่ แสดงความแตกต่างในพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ ซึ่งไพรเมอร์เหล่านี้จะถูกนำไปวิเคราะห์กับตัวอย่างทั้งหมดต่อไป ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 5

4.5 การศึกษาวิเคราะห์พันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลรหัสแท่งสารพันธุกรรม (DNA barcode) *matK*, *rbcl* และ *ITS2*

ทำการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชแต่ละต้นจากตัวอย่างใบ เพื่อนำมาใช้ในการกระบวนการพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *matK*, *rbcl* และ *ITS2* จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของพืชชนิดนี้ต่อไป

รายละเอียดของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *matK* (Yu et al., 2011); *rbcl* (Kress et al., 2007; 2009) และ *ITS2* (Gu et al., 2013)

<i>matK</i>	<i>matK472F</i> (forward): 5'-CCCRTYCATCTGGAAATCTTGGTTC-3'
	<i>matK1248R</i> (reverse): 5'-GCTRTRATAATGAGAAAGATTTCTGC-3'
<i>rbcl</i>	<i>rbcl</i> (forward): 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'
	<i>rbcl</i> (reverse): 5'-GTAAAATCAAGTCCACCRGC-3'
<i>ITS2</i>	<i>ITS2F</i> (forward): 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'
	<i>ITS2R</i> (reverse): 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

โดยการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของพืชชนิดนี้จะดำเนินการโดยใช้โปรแกรม TFGA และ โดยใช้โปรแกรม MEGA version 6 เพื่อให้ทราบถึงความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดนี้ ทั้งในกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากแหล่งเดียวกันและจากต่างแหล่งพื้นที่ โดยรายละเอียดผลการศึกษได้แสดงในภาคผนวก

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการในแต่ละชนิดพืช

	รนไนย	เทียนนางคาร์	ขยัน	ปุดเดือน*	เปราะราศี
จำนวนตัวอย่าง	11	9	7	2	10
Library construction					
Sequencing (clones)	102	20	96	92	96
containing SSR					
(clones)	42	***	30	19	82
design primer					
(pairs)	30	***	17	14	82
Test amplification	23	***	13	NA	54
Polymorphic					
markers	8	***	7	NA	24
Genotyping	completed	***	Completed	NA	completed
Data analysis	completed	***	Completed	NA	completed
DNA barcode					
	จำนวนตัวอย่างทดสอบ				
<i>matK</i>	11	9-10	7-8	2	NP
<i>rbcl</i>	11	9-10	8	2	2
<i>ITS2</i>	11	11	9	NS	5
psbA-trnH	11	NA**	NA**	NA**	NA**
Data analysis	completed	completed	Completed	completed	NA**

Note: NS: none specific PCR products; NP: no PCR product; NA: not analyze

*ตัวอย่างพืชปุดเดือน มีเพียง 2 ตัวอย่าง ดังนั้น จึงไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

**เนื่องจากการศึกษาเพิ่มเติม ดังนั้นผลการศึกษายังไม่สมบูรณ์ แต่อยู่ระหว่างการดำเนินการ

***เนื่องจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสนั้น มีจำนวนตัวอย่างที่สามารถนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ได้น้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชเทียนนางคาร์

ตารางที่ 3 สรุปผลความก้าวหน้าการดำเนินงานของโครงการ

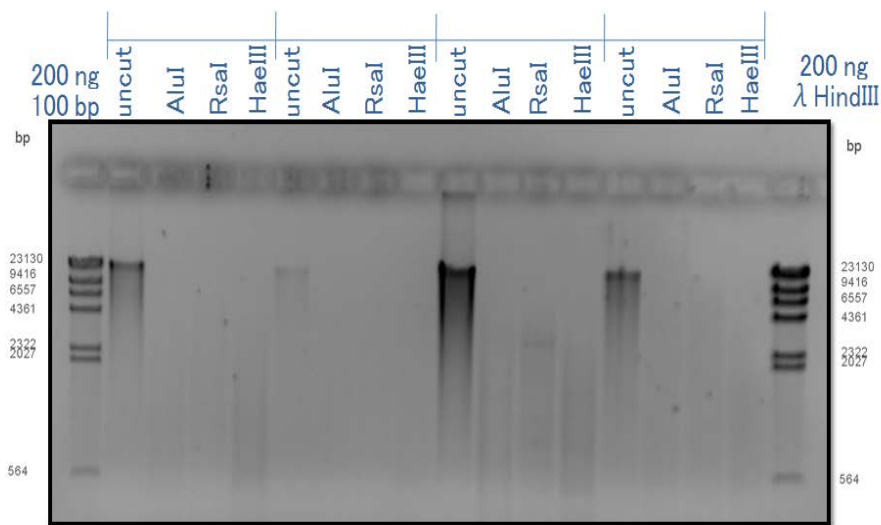
ชนิดพืช	DNA Extraction	Library construction	Primer design	Polymorphic screening	Genotyping	Data analysis
ธนนไชย						
เทียนนาง คาร์**			** (ศึกษาเพิ่มเติมโดย DNA barcode)			
หญ้านางแดง						
ปุดเดือน*				* (ศึกษาเพิ่มเติมโดย DNA barcode)		
เปราะราศี						

*ตัวอย่างพืชปุดเดือน: เนื่องจากมีเพียง 2 ตัวอย่าง ดังนั้น จึงไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

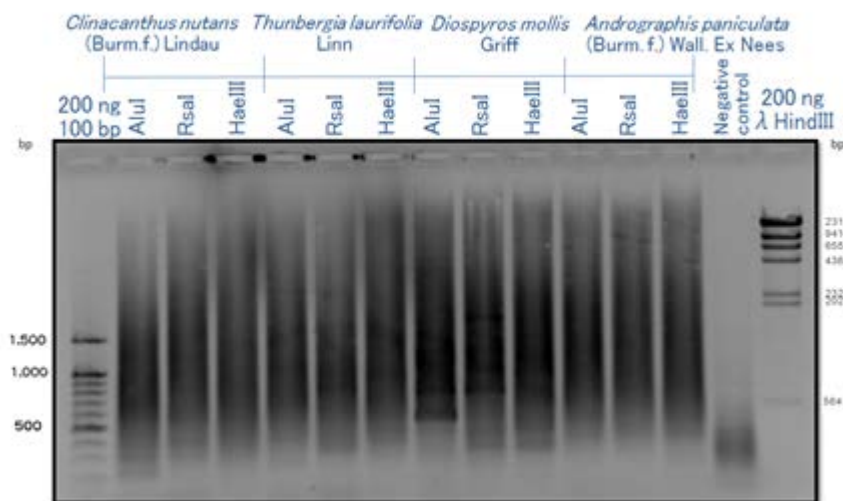
**ตัวอย่างพืชเทียนนางคาร์: เนื่องจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสสั้น มีจำนวนตัวอย่างที่สามารถนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ได้น้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชเทียนนางคาร์

ตารางที่ 4 งานที่ทำเพิ่มเติมจากข้อเสนอโครงการ

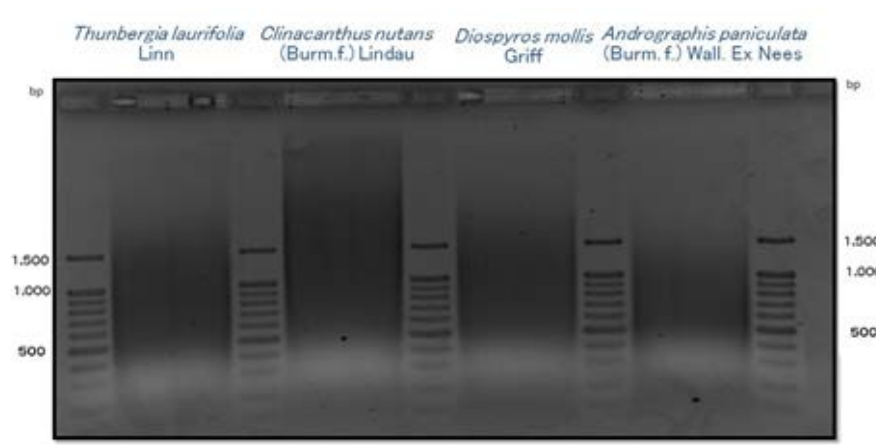
ชนิดพืช	DNA barcode (จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์)		
	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>ITS2</i>
ขยันทัน	7	8	9
ธนนไชย	11	11	11
ปุดเดือน	2	2	No PCR product
เทียนนางคาร์	9	9	11
เปราะราศี	No PCR product	2	5



รูปที่ 1 ตัวอย่างผลการตัดชิ้นดีเอ็นเอตั้งต้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ



รูปที่ 2 ตัวอย่างผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ผ่านกระบวนการติด Adapter ในกระบวนการพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์คู่สมกับ Adapter



รูปที่ 3 ตัวอย่างผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ผ่านกระบวนการไฮบริดเซชันเพื่อคัดเลือกขึ้นดีเอ็นเอที่มีไมโครแซทเทลไลต์ในกระบวนการพีซีอาร์

■ SSR ■ Primer ■ Selected Primer ■ Overlaped SSR

>26949-61A-T7.AB1

```

1 CTCCACCACG AGATGACCAT CAGGGTCGAG GAGACCGAGG CAGGGGGCGG AATGACAAC TCCGACCCCC
71 ACAGCACAAG CAACAGGGCC GCGAGGGCCA GGGCCAGG GC CTGAACATAT ATCGCAAGGA TTAGTGCCGA
141 CATGGACGCG TGCCAGGCCC AGACATTCGT GTGCTTTAAC TGCCAGCAGG AAGGGCACAC GACGAGGTAG
211 TGCCCAAATC GGCAGGGCCG TGATTAGCAG CTAAGAGAG C AGCACCAGCA CCAGCACCAG CACCAGCAC
281 GAGGCAGGCA CCGGCTCAGG CAAGGCCAGC CGAGCCACAG GCCGCAGCAG GAGGAGTTGG CCGAGGACGC
351 CCGCCTCAGG GCAATGCTAG AGTCTACGCC ATGGGAGGCG ATGGCGAGGA CCAGGTGATC GTAGGTATGC
421 CCGATTACGT TACGACAATC TCGTAATAGA TTTCTTAGCA TGCCTTTGTT ATATCTAGGT GATATAACGA
491 TAGATGGCCT TAGAGCACTG CGTTATACGA TACCAGA
    
```

■ SSR ■ Primer ■ Selected Primer ■ Overlaped SSR

Forward Primer	GACATTCGTGTGCTTTAACTGC	Tm (°C)	59.819	Product Size (bsp)
Reverse Primer	AGTGCTCTAAGGCCATCTATCG	Tm (°C)	59.898	348

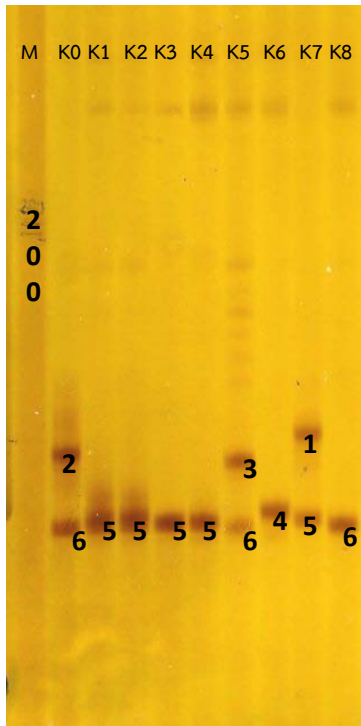
>26949-61A-T7.AB1

```

1 CTCCACCACG AGATGACCAT CAGGGTCGAG GAGACCGAGG CAGGGGGCGG AATGACAAC TCCGACCCCC
71 ACAGCACAAG CAACAGGGCC GCGAGGGCCA GGGCCAGG GC CTGAACATAT ATCGCAAGGA TTAGTGCCGA
141 CATGGACGCG TGCCAGGCCC AGACATTCGT GTGCTTTAAC TGCCAGCAGG AAGGGCACAC GACGAGGTAG
211 TGCCCAAATC GGCAGGGCCG TGATTAGCAG CTAAGAGAG C AGCACCAGCA CCAGCACCAG CACCAGCAC
281 GAGGCAGGCA CCGGCTCAGG CAAGGCCAGC CGAGCCACAG GCCGCAGCAG GAGGAGTTGG CCGAGGACGC
351 CCGCCTCAGG GCAATGCTAG AGTCTACGCC ATGGGAGGCG ATGGCGAGGA CCAGGTGATC GTAGGTATGC
421 CCGATTACGT TACGACAATC TCGTAATAGA TTTCTTAGCA TGCCTTTGTT ATATCTAGGT GATATAACGA
491 TAGATGGCCT TAGAGCACTG CGTTATACGA TACCAGA
    
```

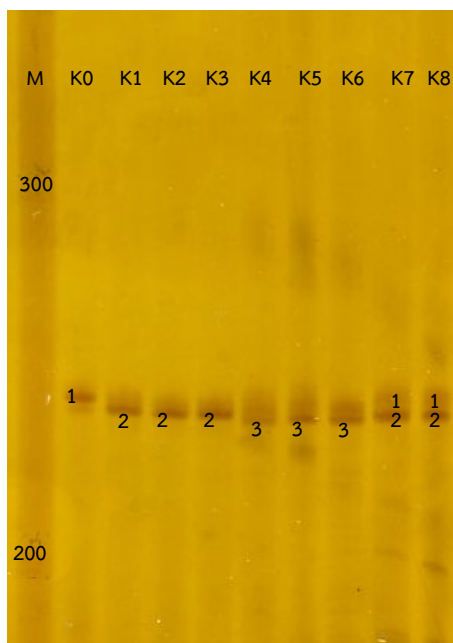
รูปที่ 4 ตัวอย่างการออกแบบไพรเมอร์โดยโปรแกรม WebSat

(a) Marker name: PK91



Primer PK91 ถูกทดสอบในตัวอย่างพืชหญ้านางแดง (*B. strychnifolia*) 9 ตัวอย่าง ให้ผลเป็น polymorphic marker มี ทั้งหมด 6 alleles

(b) Marker name: PK01



Primer PK01 ถูกทดสอบในตัวอย่างพืชหญ้านางแดง (*B. strychnifolia*) 9 ตัวอย่าง ให้ผลเป็น polymorphic marker มี ทั้งหมด 3 alleles

รูปที่ 5 ลักษณะผลการวิเคราะห์ polymorphic screening ในตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ PK91 (a) และ PK01 (b) บน 5 % Acrylamide gel

4.6 งานตามโครงการที่จะทำต่อไป

ดำเนินการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมโดยใช้ DNA barcode ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ในพืชชนิดอื่นอีกต่อไป

4.7 คำชี้แจงเกี่ยวกับอุปสรรคหรือปัญหาพร้อมวิธีการแก้ปัญหา

จำนวนตัวอย่างที่ได้นั้นมีน้อย และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ดังนั้น การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์นั้น ทำให้พบว่ามีเครื่องหมายที่แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมจำนวนไม่มากนัก ดังนั้น จึงได้ทำการนำเครื่องหมาย DNA barcode เข้ามาใช้ในการศึกษาวิจัยของโครงการเพิ่มเติม

5. อภิปรายและวิจารณ์ผล

พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ และ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ระดับโมเลกุลโดยใช้เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช และศึกษาความเป็นไปได้และประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นในการตรวจสอบชนิดและความถูกต้องของพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการผลิตยาสมุนไพร โดยในงานวิจัยนี้ใช้พืช 5 ชนิด คือ หน่อไชย เทียนนางคาร์ ญ่านางแดงหรือขยัน ปุดเดือน และ เปราะราศี โดยผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า จำนวนตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษามีน้อย และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ดังนั้น การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ ทำให้พบว่ามีเครื่องหมายที่แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมจำนวนไม่มากนัก ดังนั้น จึงได้ทำการนำเครื่องหมาย DNA barcode เข้ามาใช้ในการศึกษาวิจัยของโครงการเพิ่มเติม

6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ และ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ระดับโมเลกุลโดยใช้เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช และศึกษาความเป็นไปได้และประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นในการตรวจสอบชนิดและความถูกต้องของพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการผลิตยาสมุนไพร โดยในงานวิจัยนี้ใช้พืช 5 ชนิด คือ หน่อไชย เทียนนางคาร์ ขยันหรือญ่านางแดง ปุดเดือน และ เปราะราศี โดยผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้จำนวนตัวอย่างพืชมีน้อย และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ดังนั้น การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ทำให้พบว่ามีเครื่องหมายที่แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมจำนวนไม่มากนัก ดังนั้น จึงได้ทำการนำเครื่องหมาย DNA barcode เข้ามาใช้ในการศึกษาวิจัยของโครงการเพิ่มเติม อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาของโครงการแสดงให้เห็นว่า พืชทั้ง 5 ชนิดนี้ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ทั้งนี้เนื่องมาจากพืชเหล่านี้เป็นพืชหายาก และ/หรือ เป็นพืชถิ่นเดียวที่มีการกระจายตัวอยู่ในบริเวณที่จำกัด ดังนั้น ภาวะการผสมพันธุ์แบบ inbreeding จึงเกิดขึ้นได้สูงมากในกลุ่มประชากรพืชเหล่านี้

การจำแนกชนิดของพืชทั้ง 5 ชนิดนี้ พบว่า การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบ นั้น สามารถจำแนกได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณยีนที่เลือกมาใช้นั้น มีความแตกต่างจากพืชชนิดอื่นโดยสิ้นเชิง ดังนั้นจึงมีความจำเพาะสูงมากกับชนิดของพืชที่ใช้ตรวจสอบ

7. บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Abdelkrim J, Robertson B, Stanton JA, Gemmell N. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *Biotechniques*. 2009; 46 (3): 185-92.
2. Burns MJ, Edwards KJ, Newbury HJ, Ford-Lloyd BV, Baggott CD. Development of simple sequence repeat (SSR) markers for the assessment of gene flow and genetic diversity in pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Molecular Ecology Notes*. 2001; 1 (4): 283-5.
3. Butcher PA, Decroocq S, Gray Y, Moran GF. Development, inheritance and cross-species amplification of microsatellite markers from *Acacia mangium*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2000; 101: 1282-90.
4. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. 1987; 19: 11-5.
5. Gupta PK, Balyan HS, Sharma PC, Ramesh B. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Curr Sci*. 1996; 70: 45-54.
6. Gupta PK, Varshney RK. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*. 2000; 113 (3): 163-85.
7. Hubert S, Hedgecock D. Linkage Maps of Microsatellite DNA Markers for the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*. 2004; 168 (1): 351-62.
8. Kunkeaw S, Tangphatsornruang S, Smith DR, Triwitayakorn K. Genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on AFLP and SSR markers. *Plant Breeding*. 2010; 129 (1): 112-5.
9. Lagercrantz U, Ellegren H, Andersson L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*. 1993; 21 (5): 1111-5.
10. Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol*. 1987; 4: 203 - 21.
11. Li C-D, Eckstein PE, Lu M, Rossmann BG, Scoles GJ. Targeted development of a microsatellite marker associated with a true loose smut resistance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular Breeding*. 2001; 8 (3): 235-42.
12. Martins WS, Lucas DC, Neves KF, Bertioli DJ. WebSat—a web software for microsatellite marker development. *Bioinformatics*. 2009; 3 (6): 282-3.

13. Miller MP. (1997) Tools for Population Genetic Analyses TFGA V13: A Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Genetic Data, Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff.
14. Morgante M, Hanafey M, Powell W. Microsatellites are preferentially associated with non-repetitive DNA in plant genomes. Nat Genet. 2002; 30: 194 - 200.
15. Morgante M, Olivieri AM. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. The Plant Journal. 1993; 3 (1): 175-82.
16. Nadir E, Margalit H, Gallily T, Ben-Sasson SA. Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 6470-5.
17. Nunome T, Negoro S, Miyatake K, Yamaguchi H, Fukuoka H. A Protocol for the Construction of Microsatellite Enriched Genomic Library. Plant Molecular Biology Reporter. 2006; 24: 305-12.
18. Richard GF, Paques F. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. EMBO Rep. 2000; 1 (2): 122-6.
19. Sekino M, Hara M. Linkage maps for the Pacific abalone (genus *Haliotis*) based on microsatellite DNA markers. Genetics. 2007; 175 (2): 945-58.
20. Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjondjop MN. An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology. 2006; 5: 2540-68.
21. Squirrell J, Hollingsworth PM, Woodhead M, Russell J, Lowe AJ, Gibby M, et al. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? Molecular Ecology. 2003; 12 (6): 1339-48.
22. Tautz D, Trick M, Dover GA. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. Nature. 1986; 322 (6080): 652-6.
23. Tangphatsornruang S, Sraphet S, Singh R, Okogbenin E, Fregene M, Triwitayakorn K. Development of polymorphic markers from expressed sequence tags of *Manihotesculenta* Crantz. Molecular Ecology Resources. 2008; 8 (3): 682-5.
24. Varshney RK, Kumar A, Balyan HS, Roy JK, Prasad M, Gupta PK. Characterization of microsatellites and development of chromosome specific STMS markers in bread wheat. Plant Molecular Biology Reporter. 2000; 18 (3): 299-301.
25. Varshney RK, Sigmund R, Brner A, Korzun V, Stein N, Sorrells ME, et al. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. Plant Science. 2005; 168 (1): 195-202.
26. Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD. Survey of plant short tandem DNA repeats. Theoretical and Applied Genetics. 1994; 88 (1): 1-6.
27. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology. 2002; 11 (1): 1-16.

28. Zhan A, Bao Z, Hu X, Lu W, Hu J. Methods comparison for microsatellite marker development: Different isolation methods, different yield efficiency. Journal of Ocean University of China (English Edition). 2009; 8 (2): 161-5.

8. ภาคผนวก (Appendix)

รายละเอียดผลการศึกษาของพืชแต่ละชนิด

ชื่อวิทยาศาสตร์ วงศ์	ชื่อไทย
<i>Buchanania siamensis</i> Miq. ANACARDIACEAE	ธนนไชย
<i>Impatiens kerriae</i> Craib BALSAMINACEAE	เทียนนางคาร์
<i>Bauhinia strychnifolia</i> Craib LEGUMINOSAE	หญ้านางแดง หรือ ขยัน
<i>Hedychium longicornutum</i> Griff. ex Baker ZINGIBERACEAE	ปุดเดือน
<i>Kaempferia larsenii</i> Sirirugsa ZINGIBERACEAE	เปราะราศี

ผลการศึกษา: หนนไย *Buchanania siamensis* Miq.

ผลการทดลอง

1. พืชที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างหนนไยที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้มีทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างหนนไยที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้

	ชื่อพืชที่ใช้ในการศึกษา	ชื่อที่ใช้เรียกในการศึกษาค้างนี้	GPS		หมายเหตุ
1	<i>B. siamensis</i> Miq.	B1	N 15 33.137	E 105 19.254	
2	<i>B. siamensis</i> Miq.	B2	N 15 32.859	E 105 19.272	
3	<i>B. siamensis</i> Miq.	B3	N 15 33.142	E 105 19.232	
4	<i>B. siamensis</i> Miq.	B4	N 15 33.135	E 105 19.260	
5	<i>B. siamensis</i> Miq.	B5	N 15 33.125	E 105 19.254	
6	<i>B. siamensis</i> Miq.	B6	N 15 17.262	E 105 16.314	
7	<i>B. siamensis</i> Miq.	B7	N 15 51.373	E 104 45.373	
8	<i>B. siamensis</i> Miq.	B8	N 15 17.190	E 105 16.143	
9	<i>B. siamensis</i> Miq.	B9	N 15 32.273	E 105 18.938	
10	<i>B. siamensis</i> Miq.	B10	N 15 36.090	E 105 21.775	
11	<i>B. siamensis</i> Miq.	B11	N 15 33.135	E 105 19.265	
12	<i>B. siamensis</i> Miq.	B12	-	-	จาก Km 16

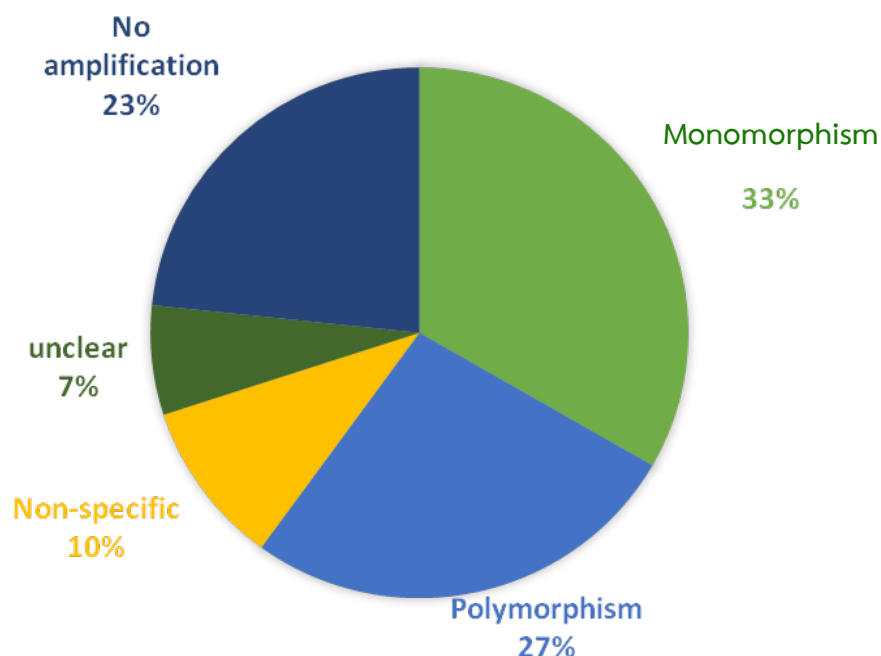
2. ระบุลักษณะของไมโครแซทเทลไลท์ (Identification and characterization of SSRs)

จากการคัดเลือกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลท์อยู่ภายในด้วยวิธีโคลนนิ่งที่อาร์ได้โคลนทั้งหมด 102 โคลน แล้วนำส่งบริษัทเพื่อหาลำดับเบส ทำให้ได้ลำดับเบสที่ภายในมีไมโครแซทเทลไลท์อยู่ทั้งหมด 41 ลำดับเบส จากนั้นนำลำดับเบสดังกล่าวที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ซ้ำกัน ด้วยโปรแกรม CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php/>) ทำให้ได้ลำดับเบส 27 ลำดับเบสแล้วนำไปออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม WebSat (<http://wsmartins.net/websat/>) ซึ่งสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 30 คู่ ไพรเมอร์ทั้งหมดประกอบด้วย 4 ชนิด ได้แก่ di, tri, penta และ hexa ดังแสดงในตารางที่ 2 การศึกษาครั้งนี้พบว่าไมโครแซทเทลไลท์ชนิด hexa-nucleotide repeat พบมากที่สุด, ชนิด tri-, ชนิด penta- และ ชนิด di-nucleotide repeat ตามลำดับ

3. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สร้างจากห้องสมุดยีน (enrich genomic library)

a. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากการคัดเลือกด้วยโพรบ (AG)₂₀ และ (CAG)₂₀

เมื่อนำไพรเมอร์ที่ได้ 30 คู่ มาตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของชนนไชยทั้ง 12 ตัวอย่าง (test amplification) พบว่า ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้แบ่งได้เป็น 5 รูปแบบ ดังนี้ Monomorphism (10 ไพรเมอร์), Polymorphism (8 ไพรเมอร์), Non-specific (3 ไพรเมอร์), Unclear (2 ไพรเมอร์) และ No amplification (7 ไพรเมอร์) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 รูปแบบของไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์

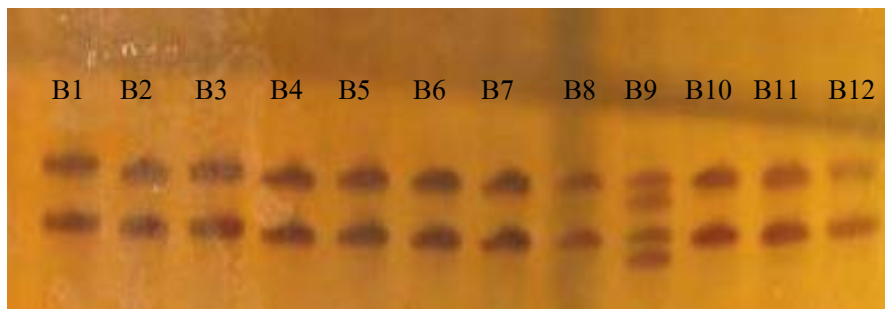
b. การทำจีโนมด้วยไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์

นำไพรเมอร์ที่แสดงลักษณะโพลิมอร์ฟิซึมทั้ง 8 คู่ มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) กับรณนไซยทั้ง 12 ตัวอย่าง (B1-B12) หลังจากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซิสในอะครีลาไมด์เจล (ภาพที่ 2) ซึ่งสามารถศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมดังแสดงในตารางที่ 3

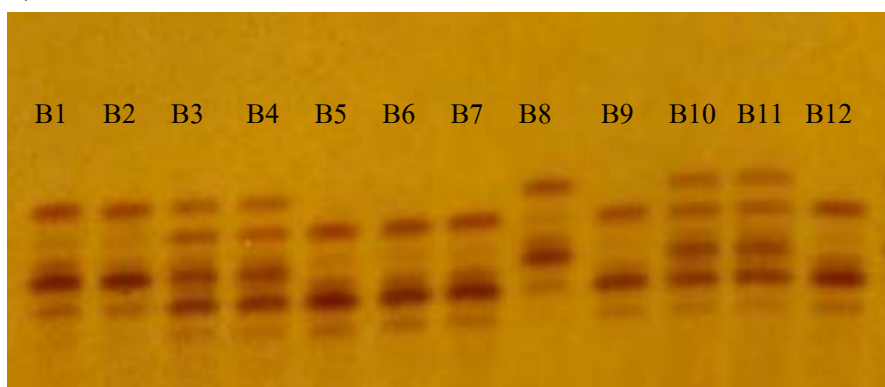
ตารางที่ 2 Type and number of microsatellite motifs

Type of SSR motif	No. of clones	Repeat motif	No. of clones
Di-nucleotide repeats	1	AG/CT	1
Tri-nucleotide repeats	8	TGC/GCA	5
		AAG/TTC	1
		TCT/AGA	1
		GAA/CTT	1
Penta-nucleotide repeats	5	AAAAG/TTTTTC	3
		CTTTT/GAAAA	2
Hexa-nucleotide repeats	16	GGATGA/CCTACT	1
		TGAAAG/ACTTTC	1
		TTTTCC/AAAAGG	1
		TGGCTG/ACCGAC	1
		TGTGTT/ACACAA	1
		AGAAAG/TCTTTC	1
		AAATTA/TTTAAT	1
		CAACAG/GTTGTC	1
		ATTTTT/TAAAAA	1
		TGTGAC/ACACTG	1
		ACAATT/TGTTAA	1
		TTTATA/AAATAT	1
		AAAAC/TTTTGA	1
		ATGAAG/TACTTC	1
		TTGTGA/AACACT	1
		AATAAA/TTATTT	1

a) BUS 17



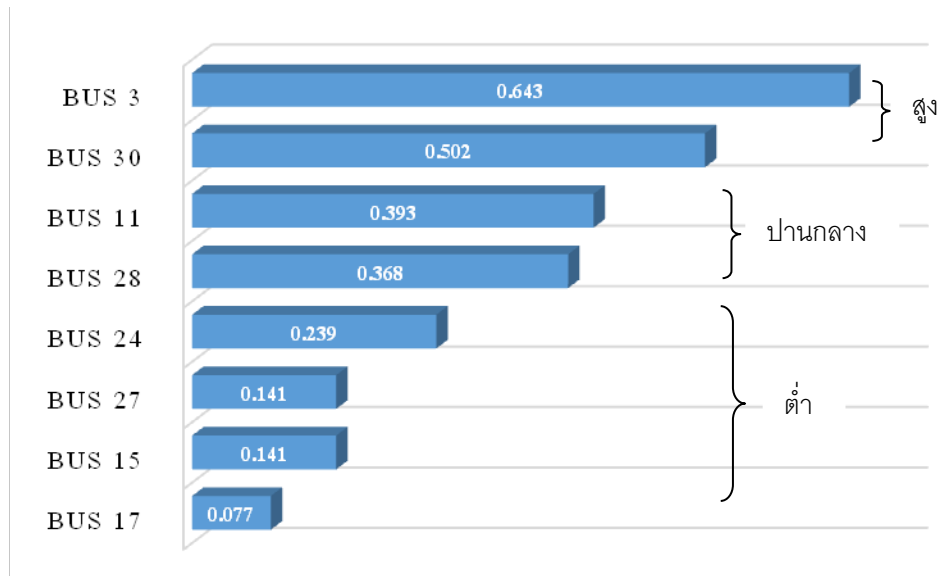
b) BUS 28



ภาพที่ 2 ตัวอย่างไพรเมอร์ BUS 17 (a) และ BUS 28 (b) บนเจลอะครีลาไมด์

จากไพรเมอร์ที่แสดงลักษณะเป็นแบบโพลิมอร์ฟิซึมทั้ง 8 ไพรเมอร์ สามารถสร้างแบน (allele) ได้ทั้งหมด 22 แบน โดยไพรเมอร์ BUS 11 (5 แบน) ให้จำนวนแบนที่มากที่สุด ค่า Heterozygosity (Ho), Gene diversity หรือ expected heterozygosity (He) และค่า PIC (Polymorphic information content) ได้มาจากการใช้โปรแกรม PowerMarker V3.25 (1) พบว่า ค่า Heterozygosity (Ho) อยู่ระหว่าง 0-0.333 โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.176 ขณะที่ค่า Expected heterozygosity (He) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.08-0.691 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.399 จากค่าดังกล่าวจะเห็นว่า ค่าเฉลี่ยของ He มีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยของ Ho ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า สภาวะของกลุ่มประชากรธนไนไซที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้อยู่ในภาวะที่ค่อนข้างผสมตัวเอง (Inbreeding situation) ส่งผลให้กลุ่มประชากรมีลักษณะพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน

ค่า PIC เป็นค่าที่อธิบายถึงคุณสมบัติของไพรเมอร์ (allele ณ ตำแหน่งนั้น) ที่มีโอกาสแสดงลักษณะเป็น Heterozygous เมื่อใช้ทดสอบกับรุ่นลูกของประชากร (1) ถ้า PIC มีค่ามาก โอกาสที่จะเกิด Heterozygous ก็จะสูงซึ่ง Botstein และคณะ (2) ได้กล่าวไว้ว่า ระดับของค่า PIC ที่สูงคือ $PIC > 0.5$, ระดับปานกลาง คือ $0.5 > PIC > 0.25$ และ ระดับต่ำอยู่ที่ $PIC < 0.25$ จากผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ไพรเมอร์ BUS 3 ให้ค่า PIC สูงสุดขณะที่ ไพรเมอร์ BUS 17 ให้ค่าน้อยที่สุด (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงค่า PIC ของ ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 8 คู่

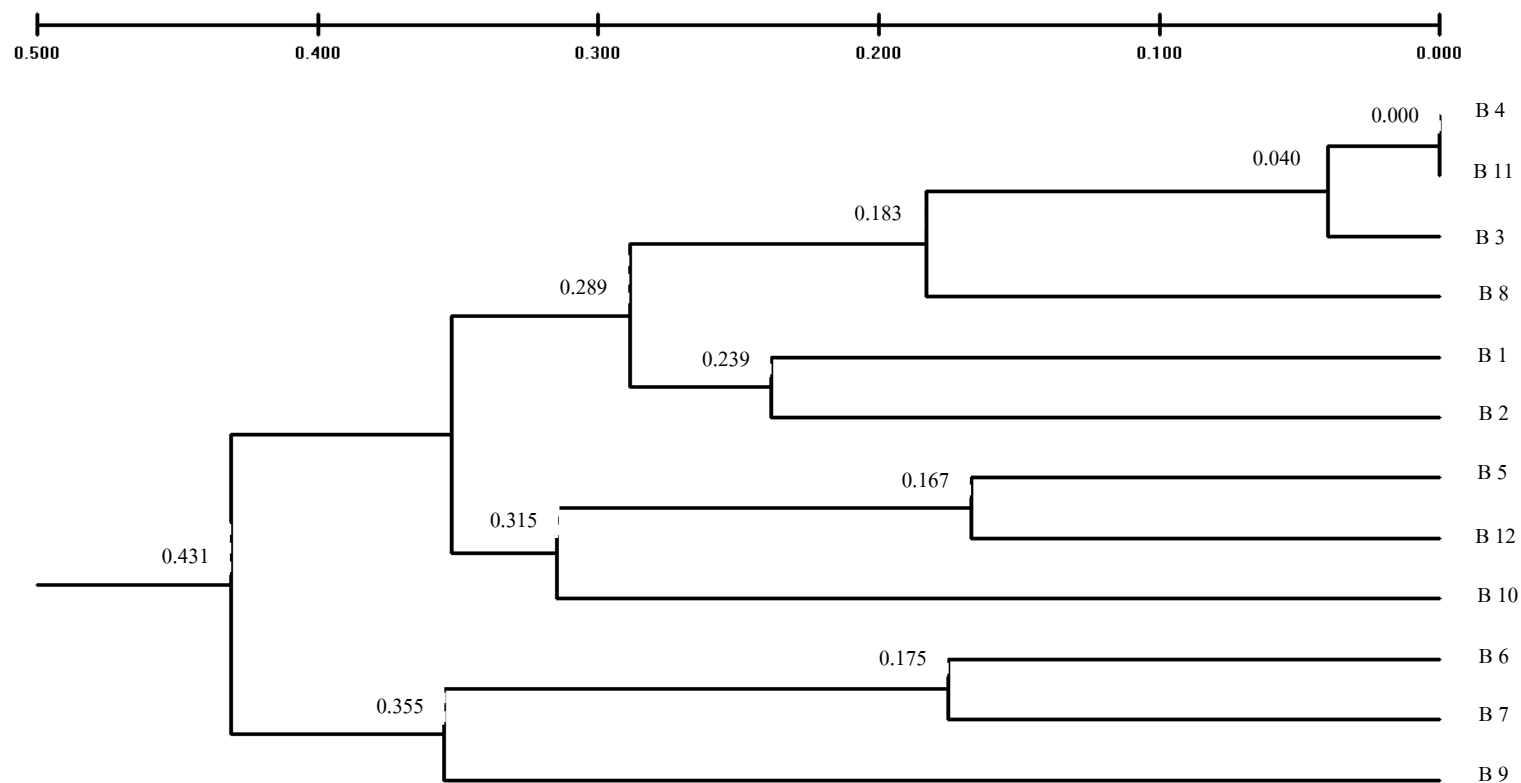
4. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยการแบ่งกลุ่มโดยใช้โปรแกรม TFGA

จากการนำไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 8 คู่มาวิเคราะห์กับตัวอย่างชนนไชยทั้ง 12 ตัวอย่าง สามารถสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Dendrogram) แบบ Nei (1972) ด้วยโปรแกรม TFGA (3) ดังแสดงไว้ในภาพที่ 4 เพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของชนนไชยทั้ง 12 ตัวอย่าง ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง B4 และ B11 มีค่าความห่างกันน้อยที่สุด (Distance = 0.000) ซึ่งสอดคล้องกับค่า GPS บอกตำแหน่ง (B4; N 15 33.135, E 105 19.260 ขณะที่ B11; N 15 33.135, E 105 19.265) ค่าความห่าง Distance = 0.4311 สามารถแบ่งตัวอย่างชนนไชย ได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรก ประกอบด้วยชนนไชย 9 ตัวอย่าง ได้แก่ B4, B11, B3, B8, B1, B2, B5, B12 และ B10 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยชนนไชย 3 ตัวอย่าง ได้แก่ B6, B7 และ B9



ตารางที่ 3 ไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์ของธนนไชย

ไพรเมอร์	ไมโครแซทเทลไลต์	Product size	ลำดับเบสไพรเมอร์	TM	Allele No.	Heterozygosity (Ho)	Gene Diversity (He)	PIC
BUS 3	(TGAAAG)2	229	F: TGCTGCTGGCTTGACTCTT R: ATATGCGCCGTGGAAACT	60.18	4	0.083	0.691	0.643
BUS 11	(TGC)6	300	F: AGACGTGTCGTGTCGTTGAG R: CCTCTGCCTTCTTCTCTCCC	60.20	5	0.167	0.417	0.393
BUS 15	(CAACAG)2	281	F: TGAGACAACATCAGTTCGCC R: GCATTTCTGCTTCCATAGCC	59.83	2	0.000	0.153	0.141
BUS 17	(TGTGAC)2	222	F: ATTATTTACAGGCGTTGGCAG R: CAACCATTACCACCATCACAAC	59.59	2	0.083	0.080	0.077
BUS 24	(TTGTGA)4	222	F: TGTGGTTGCTGTTGTTGTTG R: GCAGCTTCTTCATACCCAGC	59.59	2	0.333	0.278	0.239
BUS 27	(AAAAG)3	287	F: GCAAGGAGAACCCAAAAGAA R: ACCAAAGGAAGATGTGAGCC	59.21	2	0.167	0.153	0.141
BUS 28	(AG)10	140	F: GTTGTGCGGTGTAGTTTCCA R: TGTTGCCACTTCCATTACTGA	59.40	2	0.333	0.486	0.368
BUS 30	(GAA)5	313	F: TCGATCCACAGGGAAGAGA R: TGTTGTAGAGGAGGAGTTTTGG	58.82	3	0.083	0.580	0.502



ภาพที่ 4 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance ระหว่างธนนไชย 12 ตัวอย่าง

5. สรุปผลการวิจัย

ข้อมูลทางพันธุกรรมของธนนไชยมีความจำเป็นอย่างมากต่อการอนุรักษ์สายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของธนนไชยที่ศึกษาได้ซึ่งพบว่าค่าความห่าง Distance มีค่าอยู่ระหว่าง 0.000-0.4311 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างธนนไชยที่ใช้ศึกษามีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมาก แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งต่อไปควรเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ในการศึกษาให้มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้จากการศึกษาค่า Heterozygosity พบว่าธนนไชยค่อนข้างเป็นพืชที่เข้าสู่การผสมพันธุ์แบบผสมตัวเองซึ่งจะส่งผลทำให้ธนนไชยในระบบนิเวศนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันไม่มีความหลากหลาย และท้ายที่สุดคือเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ได้

บรรณานุกรม

- 1 Liu K, Spencer VM. Integrated analysis environment for genetic marker data. Bioinformatics. 2005;21(9):2128-9.
- 2 Botstein D, Whitw RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet. 1980;32(3):314-31.
- 3 Miller MP. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA). 1.3 ed: Dept of Biological Sciences, Northern Arizona Univ,Flagstaff, AZ; 1997.

ผลการศึกษา: เทียนนางคาร์ *Impatiens kerriae* Craib

ผลการศึกษา DNA Barcoding

1) พืชที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างพืชจริงที่ได้สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อใช้เป็นมาตรฐาน ได้แก่ เทียนนางคาร์ หรือ เหยื่อจ (*I. kerriae* Craib.) ที่ระบุชนิดได้ถูกต้องแล้วด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชที่ดึงมาจากฐานข้อมูล BOLD (Barcoding of Life Database) ซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกับเทียนนางคาร์ (*Impatiens* sp.)

2) ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีนที่ใช้ในการศึกษา

```
matK>Impatiens_kerriae0_matK      785
ATCGGGAAGAGACAGCAGCGACAGCGAACAATCAATGCATTATTAGCAACTCTTTCTGCATGA
GTATTGTAATTTGAACAGTCTTATTATTCCACATATATTTATTACTATTTTATAAAAAGGAAT
CCCATATTTTTCTTGTTCTATATAATTCTCATGTATATGAATACGAATCCTTCTTCTTTTTTCT
CCGTAACCAATCACTTTTCATTTACGATCAATATTTTTGCGAGTCCTTCTTGAACATAATTTTTT
CTATGGAAAAATAGAACATTTTGCAGGAAGTCTTTGCTAATGATTTTCAGGCCATCTTGTGGTTG
TTCTAGGATCCTTTTCATGCGTTATGTTAGATATCAAGGAAGATCAATTCTGGCTTCAAAAGATC
GGCCTTTTCTGATGAAAAAATGGAAATATTACCTTGTCAACTTATGTCAATGTCAATTTTATGT
CTGGTTTCAACCAGAAAAGATCTATATTTATTCAATTATCCAAGCATTCTCTCAACTTTTTGGGC
TATCTTTCAAATGTACAATTAAATCCTTTGGTGGTACGGAGTCAAATGTTAGAAAATTCATTTA
TAATAGATAAAGATAGTACTATGAAGAACTCGATACAATAGTTCCTATTATTCCGTTAATTGG
ATCATTGGCAAAAACGAAATTTTGTAAACGCAGTAAGACATCCCAGTAGTAAACCGATTGAGGC
GGATTCTGCGGATTCTGATATTATCGACCGATTGTGCGTTATACAAAAATCTTAACCATAATT
GAAGGCAAAAAACAAGGA
```

```
rbcL>Impatiens_kerriae0_rbcL      601
AGAGGGTTGGGAACACAGCTGGTGTTAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGAATATGA
AACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAAGTCCTCAACCCGGGGTTCCCCCTGA
AGAAGCAGGTGCCGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGTGGACCGA
TGGACTTACTAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTATCACATCGAGCCAGTTGCTGGAGA
AGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGTTCTGTTACT
AACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTTTACGTCTG
GAAGATTTGCGAATTCCTCCTTCGTATACTAAAACCTTTCCAAGGACCGCCTCATGGCATCCAA
GTTGAAAGAGATAAGTTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTGTTGGGATGTACTATTAAGCCTAAA
```

TTGGGGTTATCCGCTAAAACTATGGTAGAGCAGTTTATGAATGTCTCCGCGGTGATTAATTT
TTTTAAAAAAAAAAGAAATATTCTTTTAATT

ITS2 > Impatiens_kerrieae0 ITS2 238

CGCTTCGTTTCGTCTCAATTCACCAGCTCCTTTCTCTTGATAGATTAAGTTAGGAAGAGACTTG
TGAATTGGGCTTACATTGGCCTCCCGTGCGTATATTATCGTGCGGCCGGTGCAGAAATACACGTC
CAAGCGGAAGGGACACACGGTTTTGTGGTGGTTGATAAACTGTTTCGAACCGGCGAAGCTTTCT
CTTGGAACCTGTTGACCCTTGCTCCTCGAGGGATGTGCATCTAAGG

3) ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในและระหว่างสปีชีส์ (Genetic variation within and between species)

เมื่อคำนวณค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเทียนนางคาร์ 12 ตัวอย่างและพืชสปีชีส์อื่นๆ ในสกุลเดียวกันโดยใช้โปรแกรม MEGA version 6 ด้วยสมการ K2P model จะได้ค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้ ค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด (mean interspecific distance) ค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิด (mean intraspecific distance) ค่าความผันแปรต่ำสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด (least interspecific distance) ค่าความผันแปรสูงสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิด (maximum intraspecific variation) ของแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด (ตารางที่ 4) จากการวิเคราะห์พบว่า บริเวณ ITS2 มีค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดสูงที่สุด (0.556 ± 0.069) เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ *matK* (0.051 ± 0.007) และ *rbcL* (0.019 ± 0.006) ตามลำดับค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดของแต่ละบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่ำกว่าค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 Inter- and intraspecific variations of *matK*, *rbcL* and *ITS2* sequences in *Impatiens* sp.

ประเภทความแปรผัน	Distance value (K2P)		
	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>ITS2</i>
Mean inter-species	0.051 ± 0.007	0.019 ± 0.006	0.556 ± 0.069
Min inter-species	0.062 ± 0.009	0.014 ± 0.005	0.556 ± 0.069
Mean intra-species	0.015 ± 0.002	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Max intra-species	0.036 ± 0.007	0.000	0.000

ตารางที่ 5 Wilcoxon sign rank tests for the distribution if intra- vs. interspecific distances

Barcode	N _{inter-}	N _{intra-}	Wilcoxon W	P value (2-tailed)
<i>matK</i>	24	81	531.50	1.569×10^{-8}
<i>rbcL</i>	59	241	2136.5	1.378×10^{-29}
<i>ITS2</i>	46	185	1081.0	5.790×10^{-26}

4) การทดสอบขอบเขตระหว่าง ค่าความแปรผันระหว่างสปีชีส์กับ ค่าความแปรผันภายในสปีชีส์ (Assessment of barcoding gap)

การปรากฏขอบเขตระหว่างค่าความแปรผันระหว่างชนิดกับค่าความแปรผันภายในชนิด (barcoding gap) นั้นใช้ในการบ่งชี้ว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้นเหมาะที่จะนำมาใช้ในการระบุชนิดสปีชีส์หรือไม่โดยเราสามารถตรวจสอบ barcoding gap ได้โดยการพล็อตกราฟ 1:1 สำหรับแต่ละชุดข้อมูลของแต่ละเครื่องหมายโดยแต่ละจุดข้อมูล (Data point) แทนค่าระยะพิกัดบนกราฟ X-Y (X-Y coordinate) ค่า X แทนค่าความผันแปรสูงสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิด (maximum intraspecific distances) และค่า Y แทนค่าความผันแปรต่ำสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด (minimum interspecific distance) ของแต่ละคู่ตัวอย่างที่ทำการเปรียบเทียบ

สำหรับชุดข้อมูลของทั้ง 3 บริเวณ (*matK*, *rbcL* และ *ITS2*) พบว่าจุดข้อมูล (Data point) ทั้งหมด (100%) ของแต่ละบริเวณมีพิกัดอยู่เหนือเส้น 1:1 แสดงให้เห็น ขอบเขตอย่างชัดเจนระหว่างค่าความแปรผันระหว่างชนิดกับค่าความแปรผันภายในชนิด (barcoding gap) สรุปได้ว่าทั้ง *matK*, *rbcL* และ *ITS2* ต่างก็มีประสิทธิภาพ ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสมุนไพรเทียนนางคาร์ได้ (รูปที่ 6)

5) การประเมินประสิทธิภาพของ เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธีการวิเคราะห์แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ด้วยวิธี Neighbour-Joining (Evaluating the efficiency of the barcodes for species discrimination by Neighbour-Joining phylogeny analysis)

จากการวิเคราะห์ Neighbour-joining tree ที่ถูกสร้างจาก genetic distance ซึ่งคำนวณด้วยสมการ K2P และตรวจสอบความน่าเชื่อถือ (reliability) ของ Phylogenetic trees ที่สร้างขึ้นด้วยวิธี 1000-Bootstrapping พบว่า Phylogenetic (NJ) tree ของ *matK* (รูปที่ 7) และ *rbcL* (รูปที่ 8) แสดงการแยกกลุ่ม (cluster) ของเทียนนางคาร์ (*I. kerriae*) ออกจากกลุ่มของพืชอื่นๆ ในสกุลเดียวกันได้อย่างชัดเจน โดยที่ความเชื่อถือได้ของ tree อยู่ที่ 100% และ 99% NJ bootstraps ตามลำดับ แสดงให้เห็นขอบเขตที่ชัดเจน (discrete boundary) ระหว่างกลุ่มของสปีชีส์เทียนนางคาร์ (*I. kerriae*) กับกลุ่มของสปีชีส์อื่นๆ ในตระกูลเดียวกัน เมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณในการวิเคราะห์

สำหรับ Phylogenetic (NJ) tree ของ *ITS2* นั้น (รูปที่ 9) แสดงให้เห็นว่าสปีชีส์อื่นในสกุลเดียวกันที่นำมาสร้าง tree เป็นรากของสปีชีส์ที่กำลังศึกษาซึ่งผลการวิเคราะห์เช่นนี้อาจมีสาเหตุเนื่องจากการวิเคราะห์ในครั้งนี้มีจำนวน ลำดับนิวคลีโอไทด์ของต่างสปีชีส์ที่นำมาเปรียบเทียบน้อยเกินไป (มีเพียง 1 sequence) ซึ่งไม่เหมาะในการที่จะนำ NJ method มาใช้ในการคำนวณและสร้าง phylogenetic tree (29)

จากผลการวิเคราะห์ Phylogenetic (NJ) tree สรุปได้ว่าบริเวณ *matK* และ *rbcL* นั้นมีประสิทธิภาพในการจำแนกและระบุพืชสำหรับเทียนนางคาร์ (*I. kerriae*) ส่วนบริเวณ *ITS2* นั้นควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนสปีชีส์อื่นเพื่อนำมาคำนวณเปรียบเทียบ

สรุปผลการวิจัย

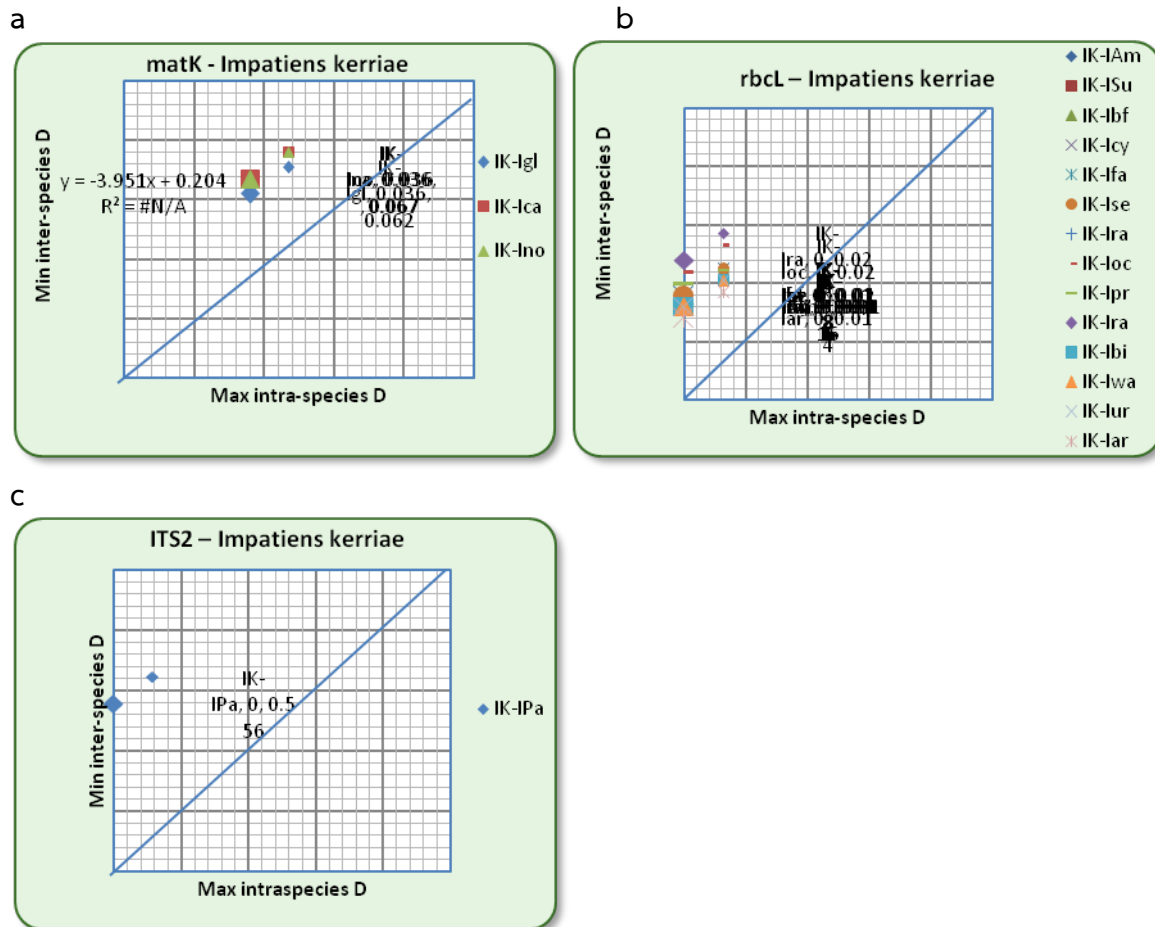
จากการศึกษาครั้งนี้ เราได้สร้างเครื่องมือในการระบุพืช “ดีเอ็นเอบาร์โค้ด” ที่เป็นมาตรฐานสำหรับพืชสมุนไพรเทียนนางคาร์ (*I. kerriae*) โดยใช้พืชสปีชีส์อื่นๆ ในตระกูลเดียวกัน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกับเทียนนางคาร์และอาจก่อให้เกิดความสับสนในการจำแนก มาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างเครื่องมือดังกล่าว ตัวอย่างพืชเทียนนางคาร์จริง ที่นำมาใช้ในการศึกษาและสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้นได้รับการระบุชนิดที่ถูกต้องแล้วด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยา โดยผู้เชี่ยวชาญด้านอนุกรมวิธานของพืช ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสปีชีส์อื่นๆ ที่เหลือทั้งหมดถูกดึงมาจากฐานข้อมูล BOLD สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเทียนนางคาร์ (*I. kerriae*) ที่ได้รับการวิเคราะห์และคำนวณหาค่าความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนั้น เราสามารถนำไปฝากจัดเก็บไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank เพื่อให้นักวิจัยและผู้สนใจสามารถเข้าถึงและดึงข้อมูลเหล่านี้ ไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ได้ต่อไป

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับพืชเทียนนางคาร์ที่สร้างขึ้นนี้ ใช้บริเวณมาตรฐาน 3 แห่ง ได้แก่ บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนของยีน *matK* และ *rbcL* ซึ่งอยู่บนคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *ITS2* ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *rRNA* ที่อยู่บนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (nuclear DNA) เมื่อนำบริเวณมาตรฐานทั้ง 3 บริเวณมาคำนวณหาค่าความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วได้ช่วงของค่าที่แตกต่างกัน เนื่องจากแต่ละบริเวณที่ศึกษา มีความแตกต่างของจำนวนและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เท่ากัน โดยพบว่าบริเวณ *ITS2* มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างเทียนนางคาร์กับพืชชนิดอื่นๆ สูงที่สุด ในขณะที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างแต่ละตัวอย่างต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ *rbcL* และ *matK* ตามลำดับซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ (6, 7, 28)

เมื่อนำค่าความแปรผันลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละบริเวณ มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของแต่ละบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด ในการจำแนกสปีชีส์บน Phylogenetic tree ด้วยวิธีการ Neighbour-joining (NJ) พบว่า ทั้งบริเวณ *matK* และ *rbcL* สามารถจำแนกเทียนนางคาร์จากพืชชนิดอื่นได้ แต่บริเวณ *ITS2* นั้นจะต้องมีการศึกษาวิเคราะห์เพิ่มเติม โดยการเพิ่มสปีชีส์อื่นที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ ทั้ง 3 บริเวณ *matK*, *rbcL* และ *ITS2* จึงเหมาะที่จะนำทั้ง 3 บริเวณมาใช้ในการวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อสร้างความเชื่อมั่นในการจำแนกและระบุพืช

เมื่อนำค่าความแปรผันลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละบริเวณ มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของแต่ละบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด ในการจำแนกสปีชีส์บน Phylogenetic tree ด้วยวิธีการ Neighbour-joining (NJ) พบว่า ทั้งบริเวณ *matK* และ *rbcL* สามารถจำแนกเทียนนางคาร์จากพืชชนิดอื่นได้ แต่บริเวณ *ITS2* นั้นจะต้องมีการศึกษาวิเคราะห์เพิ่มเติม โดยการเพิ่มสปีชีส์อื่นที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์

จากงานวิจัยนี้ สรุปได้ ทั้งบริเวณ *matK* และ *rbcL* มีทั้งประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือ ที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อระบุพืชสำหรับเทียนนางคาร์ สิ่งที่เราสามารถศึกษาเพิ่มเติมคือ การสร้างและวิเคราะห์ความสามารถของบริเวณ *psbA-trnH* สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งบริเวณดังกล่าวนี้ เป็นอีกหนึ่งบริเวณที่มีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ว่ามีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดพืชได้ดีเช่นกัน (12)



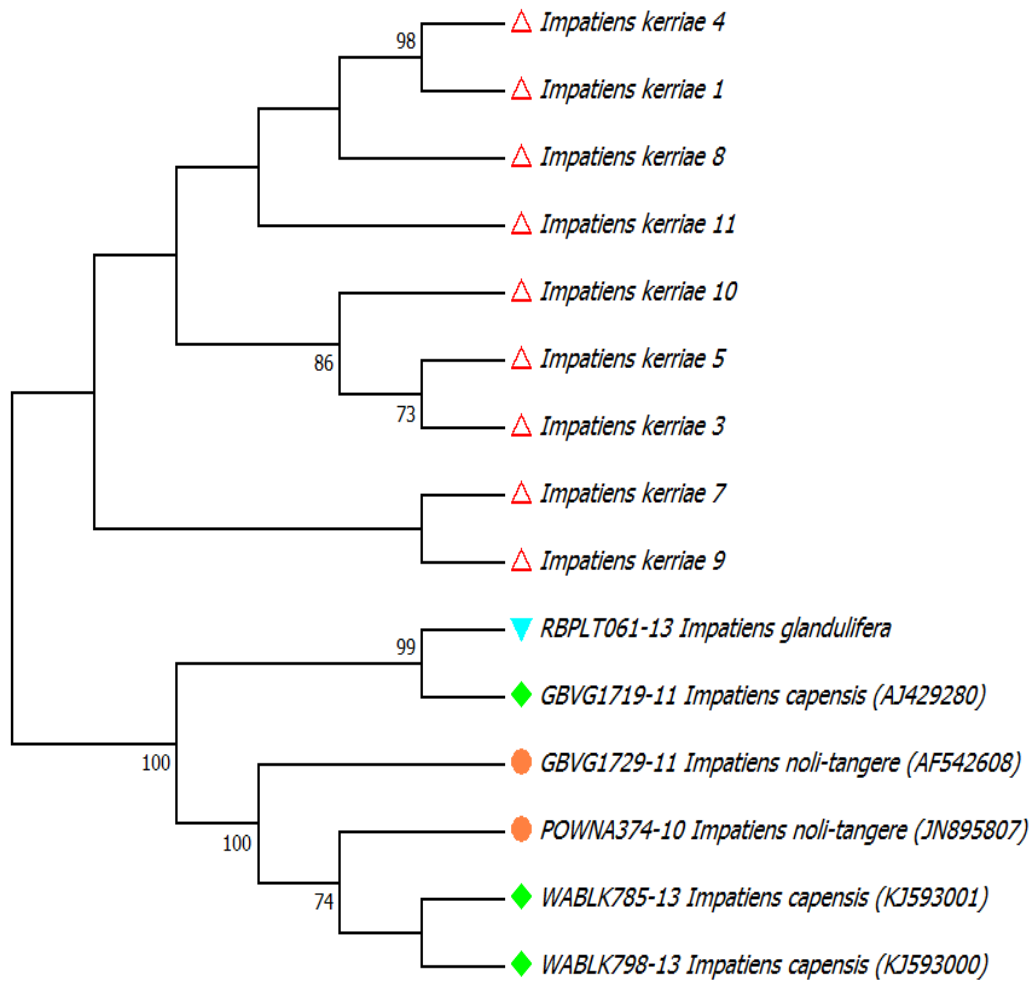
รูปที่ 6 Dot plots of maximal intraspecific distance versus minimal interspecific (nearest neighbor) distance for analyzing the presence of barcode gap in: (a) *matK*; (b) *rbcl* and (c) *ITS2*. Each data point-legend represents ratio (difference) of minimum inter- to maximum intraspecific distances of an individual-pair of comparing species.

IK = *I. kerriae*

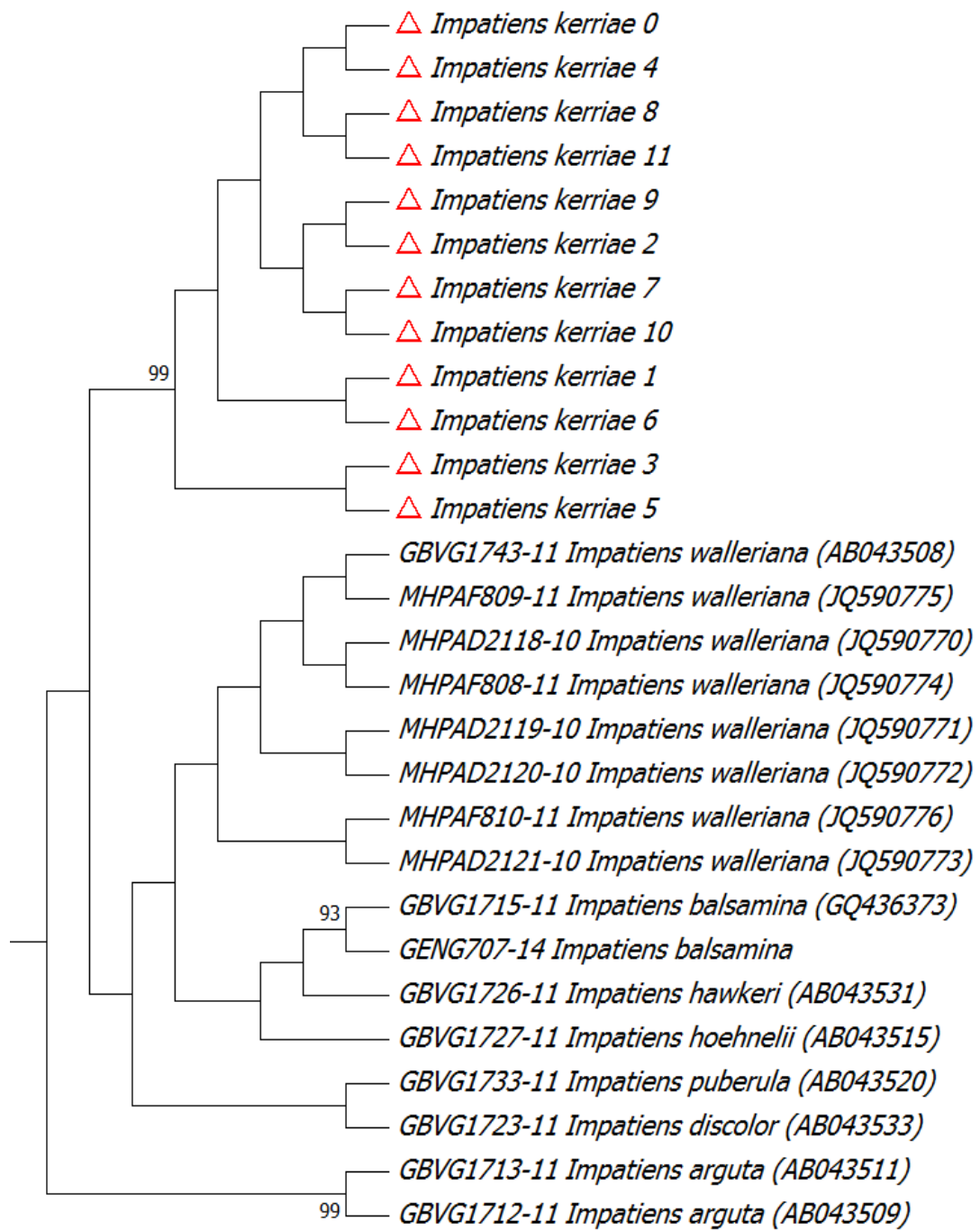
IAm = *I. amplexicaulis*

ISu = *I. sulcata*

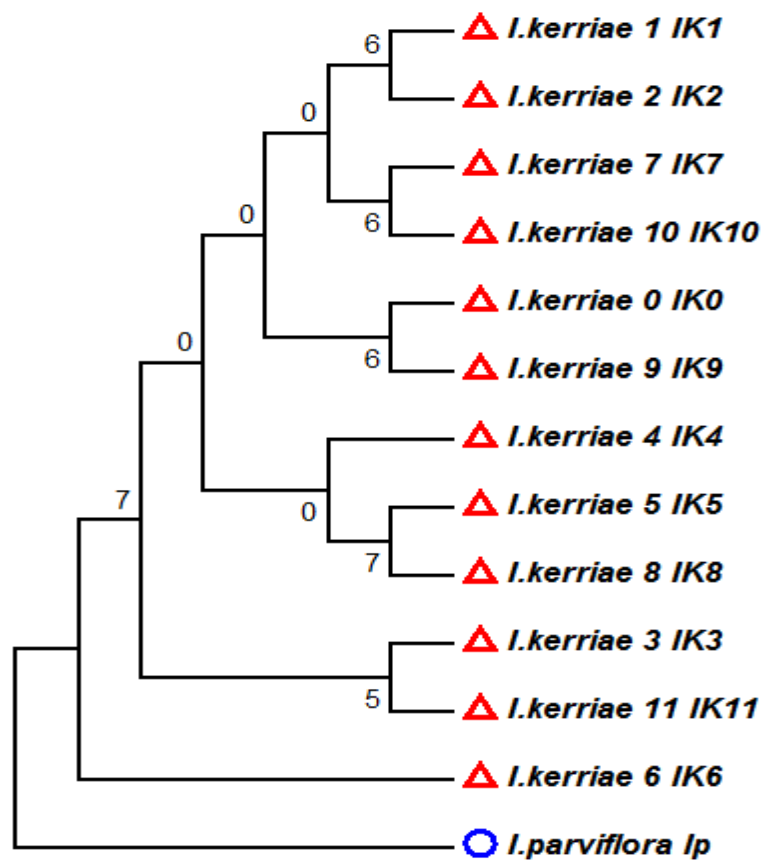
IBf = *I. balfourii*



รูปที่ 7 The Neighbour-joining tree of the *matK* sequences from four *Impatiens* sp. Bootstrap values (>70%) are shown next to the branches.



รูปที่ 8 The Neighbour-joining tree of the *rbcL* sequences from eight *Impatiens* sp. Bootstrap values (>70%) are shown next to the branches.



รูปที่ 9 The Neighbour-joining tree of the ITS2 sequences from two *Impatiens* sp. Bootstrap values (>70%) are shown next to the branches.

บรรณานุกรม

1. Gutteridge A and Burns M. The Application of DNA Molecular Approaches for the Identification of Herbal Medicinal Products. *Journal of the Association of Public Analysts*. 2013; 41: 53-66.
2. Kaewpiboon C, Lirdprapamongkol K, Srisomsap C et al. Studies of the in vitro cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 12: 217.
3. Sayompark S, Itharat A and Hansakul P. Comparative Study of Antioxidant Activities and Total Phenolic Content of *Bauhinia strychnifolia* Leaves Extracts. The 1st Conference on Graduate Student Network of Thailand (GS-NETT 2012). *Sci-Health* 011.
4. <http://web3.dnp.go.th/botany/index.aspx>
5. Hollingsworth PM, Graham SW and Little DP. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE*. 2011; 6(5): e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254.
6. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *PNAS*. 2009; 106 (31): 12794-97.
7. Hollingsworth PM. Refining the DNA barcode for land plants. *PNAS*. 2011; 108 (49): 19451-2.
8. Han J, Zhu Y and Chen X. The Short ITS2 Sequence Serves as an Efficient Taxonomic Sequence Tag in Comparison with the Full-Length ITS. *Hindawi – BioMed Research International*. 2013; 741476; dx.doi.org/10.1155/2013/741476.
9. Gu W, Song J, Cao Y, Sun Q, Yao H, et al. Application of the ITS2 Region for Barcoding Medicinal Plants of Selaginellaceae in Pteridophyta. *PLoS ONE*. 2013; 8 (6): e67818; DOI:10.1371/journal.pone.0067818.
10. Murray MG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*. 8: 4321-4325.
11. Yu J, Xue JH and Zhou SL. New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*. 2011; 49 (3): 176-81.
12. Kress WJ, Erickson DL. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLoS one*. 2007; 2: e508.
13. Kress WJ, Erickson DL, Andrew Jones F, et al. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106: 18621-6.
14. de Vere N, Rich TCG, Ford CR, et al. DNA Barcoding the Native Flowering Plants and Conifers of Wales. *PLoS ONE*. 2012; 7(6): e37945. doi:10.1371/journal.pone.0037945.

15. Selvaraj D, Shanmughanandhan D, Sarma RK, et al. DNA Barcode ITS Effectively Distinguishes the Medicinal Plant *Boerhavia diffusa* from Its Adulterants. *Genomics Proteomics Bioinformatics*:10 (2012) 364–367.
16. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 4673-80.
17. Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology.* 1990; 215: 403–410. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)
18. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *MolBiolEvol.* 2007; 24: 1596-9.
19. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731–9.
20. Meyer, C.P. & Paulay, G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology* 3: 2229-38.
21. Robinson EA, Blagoev GA, Hebert PDN, Adamowicz SJ (2009) Prospects for using DNA barcoding to identify spiders in species-rich genera. *ZooKeys*, 46, 27–46.
22. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
23. Wiemers M, Fiedler K (2007) Does the DNA barcoding gap exist? A case study in blue butterflies (Lepidoptera: lycaenidae). *Frontiers in Zoology*: 4, 8.
24. Tamura K, Battistuzzi FU, Billing-Ross P, Murillo O, Filipski A, Kumar S. (2012) Estimating Divergence Times in Large Molecular Phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2012) 109: 19333-8.
25. Barry G. Hall. (2013) Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.* doi: 10.1093/molbev/mst012.
26. Mukund V. KattiPKR, and Vidya S. Gupta. Differential Distribution of Simple Sequence Repeats in Eukaryotic Genome Sequences.
27. N.Tsukasa, M.Koji, A.Hirotaka, F.Hiroyuki. A Protocol for the Construction of Microsatellite Enriched Genomic Library. *Plant molecular biology.* 2006; 24: 305-12.
28. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, et al. (2010) Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE* 5 (1): e8613. doi:10.1371/journal.pone.0008613.
29. Saitou N, Nei M. "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Molecular Biology and Evolution*, volume 4, issue 4, pp. 406-425, July 1987.

ผลการศึกษา: ญานางแดง หรือ ขยั้น (*Bauhinia strychnifolia* Craib.)

ไมโครแซทเทลไลต์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของญานางแดง (*Bauhinia strychnifolia* Craib.)

ผลการทดลอง

1. พืชที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างญานางแดงที่ใช้ในการศึกษานี้มีทั้งหมด 13 ตัวอย่าง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างญานางแดงที่ใช้ในการศึกษานี้

	ชื่อพืชที่ใช้ในการศึกษา	รหัสตัวอย่าง	แหล่งตัวอย่าง
1	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K0	กาญจนบุรี
2	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K1	สระบุรี
3	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K2	เลย
4	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K3	ปราจีนบุรี
5	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K4	นครนายก
6	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K5	กรุงเทพฯ (จรัญสนิทวงศ์)
7	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K6	ยโสธร
8	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K7	กรุงเทพฯ (สวนหลวง)
9	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K8	สระแก้ว
10	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K9	ปทุมธานี
11	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K10	นครปฐม (พุทธมณฑล)
12	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K11	นครปฐม (สามพราน)
13	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	K12	ขอนแก่น

2. การระบุลักษณะของไมโครแซทเทลไลต์ (Identification and characterization of SSRs)

จากการคัดเลือกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์อยู่ภายในด้วยวิธีโคลนนิ่งที่ได้ออกมาทั้งหมด 98 โคลน แล้วนำส่งบริษัทเพื่อหาลำดับเบส ทำให้ได้ลำดับเบสที่ภายในมีไมโครแซทเทลไลต์อยู่ทั้งหมด 60 ลำดับเบส จากนั้นนำลำดับเบสดังกล่าวที่ได้ไปเปรียบเทียบลำดับเบสที่ซ้ำกัน ด้วยโปรแกรม CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php/>) ทำให้ได้ลำดับเบส 17 ลำดับเบสแล้วนำไปออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม WebSat (<http://wsmartins.net/websat/>) ซึ่งสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 14 คู่ ไพรเมอร์ทั้งหมดประกอบด้วย 4 ชนิด ได้แก่ di, tri, tetra และ hexa ดังแสดงในตารางที่ 2 การศึกษานี้พบว่าไมโครแซทเทลไลต์ชนิด di-nucleotide repeat พบมากที่สุด รองลงมาคือ ชนิด tetra-, ชนิด tri-และ ชนิด Hexa-nucleotide repeat ตามลำดับ

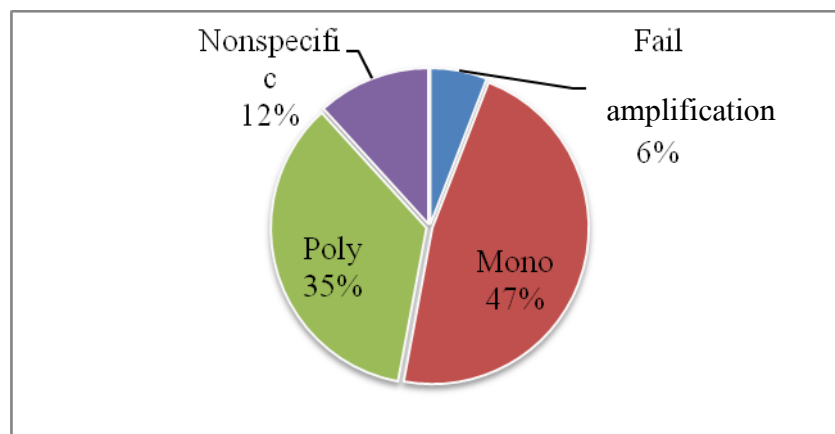
ตารางที่ 2 Type and number of microsatellite motifs

Type of SSR motif	No. of clones	Repeat motif	No. of clones
Di-	8(57.14%)	GA/CT	8(57.14%)
Tri-	2(21.43%)	CCA/GGT	1(7.14%)
		GCT/CGA	1(7.17%)
Tetra-	2(14.29%)	GATA/CTAT	1(7.14%)
		ATAA/TATT	1(7.14%)
		AAAT/TTTA	1(7.14%)
Hexa-	1(7.14%)	TCAGCA/AGTCGT	1(7.14%)

3. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่สร้างจากห้องสมุดยีน (enrich genomic library)

3.1 เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากการคัดเลือกด้วยโพรบ (CT)₂₀ และ (CAG)₂₀

เมื่อนำไพรเมอร์ที่ได้ 17 คู่ มาตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของย่านางแดงทั้ง 13 ตัวอย่าง (test amplification) พบว่า ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้แบ่งได้เป็น 4 รูปแบบ ดังนี้ Monomorphism (8 ไพรเมอร์), Polymorphism (6 ไพรเมอร์), Non-specific (2 ไพรเมอร์), และ No amplification (1 ไพรเมอร์) ดังสรุปในภาพที่ 1



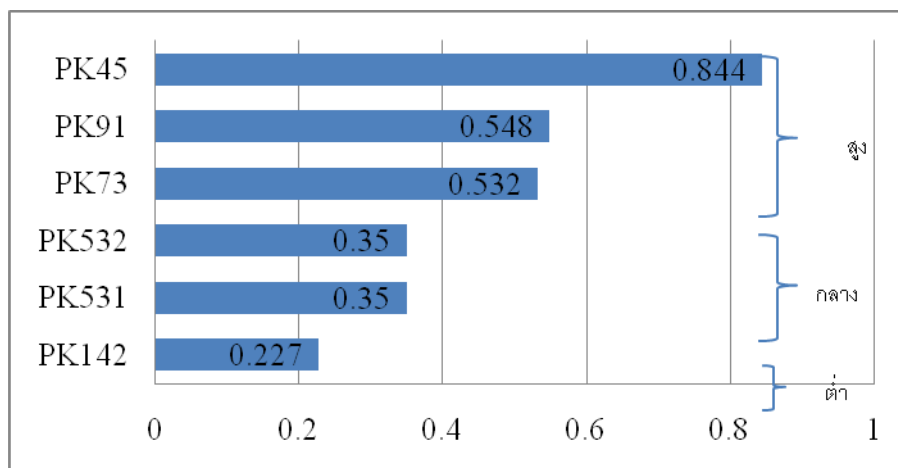
ภาพที่ 1 ผลการทดสอบไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์

3.2 การทำจีโนไทป์ด้วยไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์

นำ ไพรเมอร์ที่แสดงลักษณะโพลิมอร์ฟิซึมทั้ง 6 คู่ มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) กับย่านางแดงทั้ง 13 ตัวอย่าง (K0-K12) หลังจากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะครีลาไมด์เจล เพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากไพรเมอร์ที่แสดงลักษณะเป็นแบบโพลิมอร์ฟิซึมทั้ง 6 ไพรเมอร์ สามารถสร้างแบนหรือ แอลลีล (allele) ได้ทั้งหมด 27 แอลลีล โดยไพรเมอร์ PK45 ให้จำนวนแบนที่มากที่สุด (10 แอลลีล) ค่า Heterozygosity (Ho), Gene diversity หรือ expected heterozygosity (He) และค่า PIC (Polymorphic information content) คำนวณจากการใช้โปรแกรม PowerMarker V3.25 (1) พบว่า ค่า Heterozygosity (Ho) อยู่ระหว่าง 0.2308 – 0.8462 โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.3974 ขณะที่ ค่า Expected heterozygosity (He) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.2708 – 0.8923 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.5503 จากค่าดังกล่าวจะเห็นว่า ค่าเฉลี่ยของ He มีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยของ Ho ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า สถานะของตัวแทนประชากรย่านางแดงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้อยู่ในภาวะที่ค่อนข้างผสมตัวเอง (Inbreeding situation) ส่งผลให้กลุ่มประชากรมีลักษณะพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน

ค่า PIC เป็นค่าที่อธิบายถึงคุณสมบัติของไพรเมอร์ (allele ณ ตำแหน่งนั้น) ที่มีโอกาสแสดงลักษณะเป็น Heterozygous เมื่อใช้ทดสอบกับรุ่นลูกของประชากร (1) ถ้า PIC มีค่ามาก โอกาสที่จะเกิด Heterozygous ก็สูงซึ่ง Botstein และคณะ (2) ได้กล่าวไว้ว่า ระดับของค่า PIC ที่สูงคือ PIC >0.5, ระดับปานกลาง คือ 0.5 > PIC >0.25 และ ระดับต่ำอยู่ที่ PIC <0.25 จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ไพรเมอร์ PK45 ให้ค่า PIC สูงสุดขณะที่ ไพรเมอร์ PK14-2 ให้ค่าน้อยที่สุด (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงค่า PIC ของ เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 6 คู่

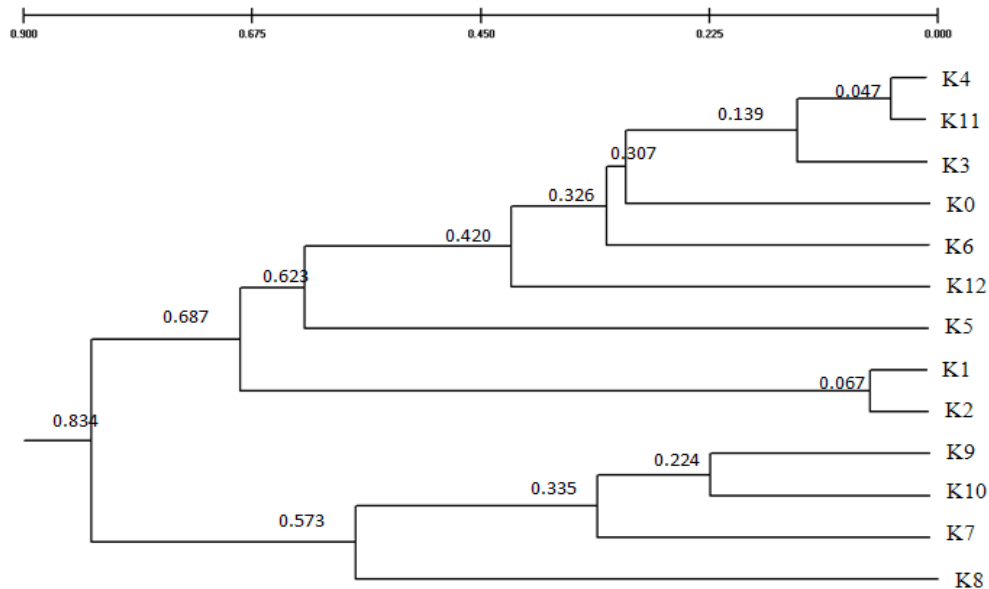
3.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยการแบ่งกลุ่มโดยใช้โปรแกรม TFPGA

จากการนำไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 6 คู่มาวิเคราะห์กับตัวอย่างเหูานางแดงทั้ง 13 ตัวอย่าง สามารถสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Dendrogram) แบบ Nei (1972) ด้วยโปรแกรม TFPGA (3) ดังแสดงไว้ในภาพที่ 3 เพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเหูานางแดงทั้ง 13 ตัวอย่าง ค่าความห่าง Distance = 0.834 สามารถแบ่งตัวอย่างเหูานางแดง ได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรก ประกอบด้วย 9 ตัวอย่าง ได้แก่ K4, K11, K3, K0, K6, K12, K5, K1 และ K2 กลุ่มที่ 2 มี 4 ตัวอย่าง ได้แก่ K9, K10, K7 และ K8 อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์นั้นไม่บ่งบอกถึงแหล่งที่มาของตัวอย่าง ทั้งนี้เนื่องจากมีการการได้มาของตัวอย่างจากสถานที่ต่างๆ นั้น ไม่เป็นไปตามแหล่งที่มาเริ่มต้นของตัวอย่างเหล่านี้



ตารางที่ 3 เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ของพืชขยัน

Primer	Repeat type	Product size (bp)	ลำดับเบสไพรเมอร์	TM	Allele No.	Heterozygosity (Ho)	Gene Diversity (He)	PIC
PK45	(AG)21	185	F AACGATGAAGTGTGATTCTTGC R TTTTCAGTCTCCTCTCTCTCCG	54.67	10	0.8462	0.8923	0.8439
PK73	(GA)10	263	F CTTTATCCAGTGCTTTTGTGCATC R CCTTGTCCTCTTCACTAGCAGC	57.14	5	0.2308	0.5938	0.5315
PK91	(CT)12	154	F TCACATACATTAACAGACCCGC R GAGATGAAGGGAAGAGTTGCTG	55.12	6	0.3846	0.6031	0.5475
PK14-2	(CT)13	323	F CCAAGAACCACTCAAACGTAC R CGACGTGAACAAGAGAGAGATAC	54.21	2	0.3077	0.2708	0.2265
PK53-1	(ATAA)3	346	F CGCATTAGGAGTGGGTGATATTG R CAGGGGAGATCCGTCTACATTG	56.18	2	0.2308	0.4708	0.3502
PK53-2	(AAAT)3	211	F GGACAGATGGCTATTATTGG R CCACCCTCTCAGTTTCACTTG	52.93	2	0.3846	0.4708	0.3502



ภาพที่ 4 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance ระหว่างย่านางแดง 13 ตัวอย่าง

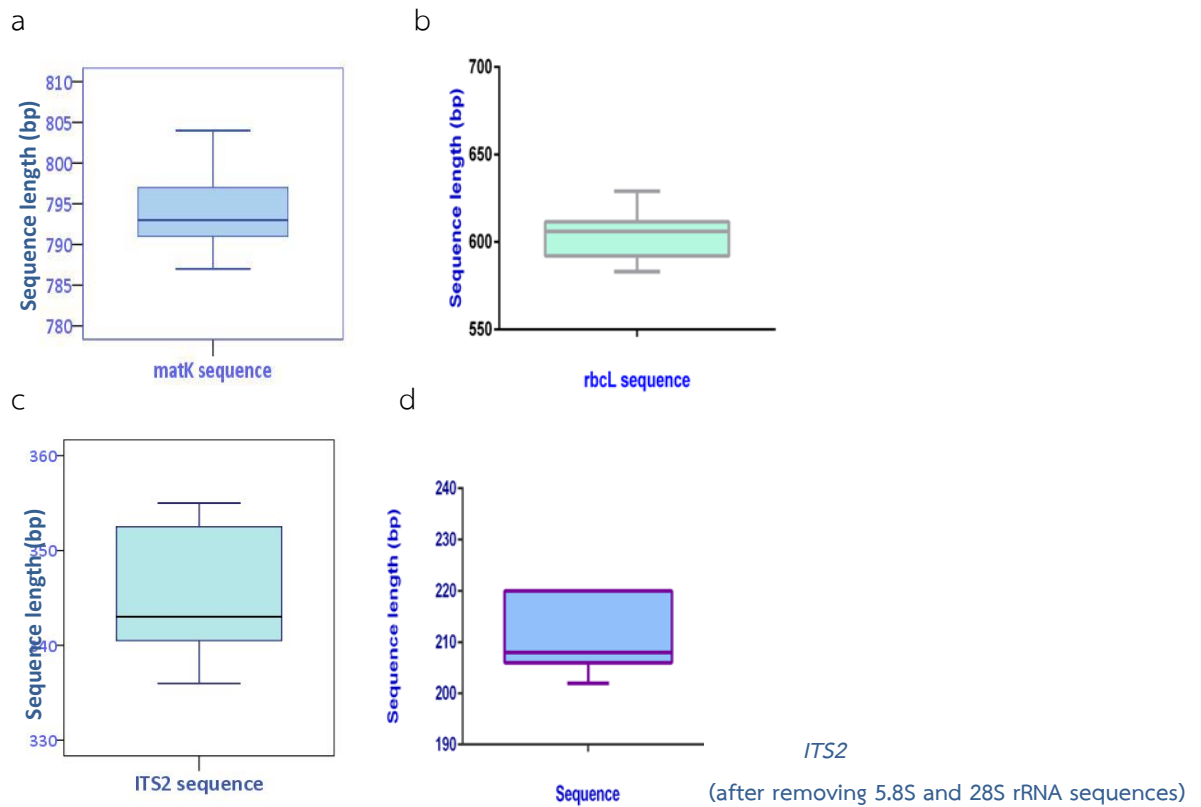
DNA Barcoding

1) พืชที่ใช้ในการศึกษา

พืชที่ได้สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อใช้เป็นมาตรฐาน ได้แก่ ย่านางแดง (*B. strychnufolia* Craib.) พืชในสกุลเดียวกับย่านางแดง (*Bauhinia* sp.) และย่านางเขียว (*T. triandra* Diels.) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบคล้ายกับใบย่านางแดง ที่ระบุชนิดได้ถูกต้องแล้วด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา แสดงไว้ในตารางที่ 6

2) ลักษณะและขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่ใช้ในการศึกษา

จากการตรวจสอบความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง *Bauhinia* sp. และ *T. triandra* ที่ใช้ในการวิเคราะห์พบว่า ขนาดของ *matK* อยู่ในช่วง 787 ถึง 804 bp (รูปที่ 10a) ในขณะที่ความยาวของ *rbcl* อยู่ที่ 587 – 616 bp (รูปที่ 10b) สำหรับ ITS2 ค่าความยาวจะอยู่ที่ช่วง 336 ถึง 355 bp (รูปที่ 10c)



รูปที่ 10 การกระจายความถี่ค่าความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ
บาร์โค้ด

ตารางที่ 6 List of Plant sample

Code	Scientific Name	Common / Local Name	Place of collection
K0	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	Yanang-daeng / Khayan	Kanchanaburi
K1	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	Yanang-daeng / Khayan	Saraburi
K2	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	Yanang-daeng / Khayan	Loei
K3	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	Yanang-daeng / Khayan	Prachin Buri
K4	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	Yanang-daeng / Khayan	Nakhon Nayok
K5	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	Yanang-daeng / Khayan	Charan Sanit Wong (Bangkok)
K6	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	Yanang-daeng / Khayan	Yasothon
K7	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	Yanang-daeng / Khayan	Suan Luang (Bangkok)
K8	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	Yanang-daeng / Khayan	Srakaew
K9	<i>B. strychnifolia</i> Craib.	Yanang-daeng / Khayan	Pathum Thani
W1	<i>B. winitii</i> Craib.	Khionang / Oraphim	Saraburi – Lopburi
W3	<i>B. winitii</i> Craib.	Khionang / Oraphim	Saraburi – Lopburi
W4	<i>B. winitii</i> Craib.	Khionang / Oraphim	Saraburi – Lopburi
W6	<i>B. winitii</i> Craib.	Khionang / Ora-phim	Saraburi – Lopburi
W8	<i>B. winitii</i> Craib.	Khionang / Ora-phim	Saraburi – Lopburi
W10	<i>B. winitii</i> Craib.	Khionang / Ora-phim	Saraburi – Lopburi
R13	<i>B. siamensis</i> K. & S.S. Larsen.	Sroisiam	Phayathai (Bangkok)
R2	<i>B. malabarica</i> Roxb.	Sieosom	Suan Luang (Bangkok)
R12	<i>B. tomentosa</i> Linn.	Yellow bauhinia / Yothaka	Phayathai (Bangkok)
R10	<i>B. blakeana</i> Dunn.	Hong Kong Orchid Tree	Salaya (Nakhon Pathom)
R16	<i>B. blakeana</i> Dunn.	Hong Kong Orchid Tree	Salaya (Nakhon Pathom)
T1	<i>Tiliacora triandra</i> Diels.	Yanang	SuanLuang (Bangkok)
T2	<i>T. triandra</i> Diels.	Yanang	Samutprakan
T4	<i>T. triandra</i> Diels.	Yanang	Jatujak 1 (Bangkok)
T5	<i>T. triandra</i> Diels.	Yanang	Jatujak 2 (Bangkok)
T6	<i>T. triandra</i> Diels.	Yanang	Yasothon

3) ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีนที่ใช้ในการศึกษา

matK>Bauhinia_strychnifolia1_matK 793

AGAGGTATCGTATAAATCATCACAGCAGAAAGTCATTGCATTTCTTAAGAGTCTTTCTTCACCAATATTG
TAATTCAGAATAGTCTTATTACTCTAAAAAATCGATTTCTACTTTTGGAAAAAGTCATCCAAGATTCTTC
TTGTTCTATATAATTTGCATGTCTTCGAATATGAATCTATCTTCCTTTTTCTCCGTAACAAATCTTCTCA
TTTACGATTAACATCCTCTGGAGTCCTTTTTGAGCGAATCTATTTCTATGGAAAAACAGAACATCTTGTA
GAAGTCTTTGCTAAAGATTTTCTGTGCGACCCTATGGTTTTTCAAGGATCCTTTCATTATTATGTTAGATA
TCAAGGAAAATCTATTCTGGCTTCAACGAATACGCCTCTTTTGATGAATAAATGGAAATACTATCTTATC
AATTTATGGCAATGTAATTTTTATGTTTGGTCTCAACCAGGAAGAATCCATATAAACCAATTATCCGAGC
ATTATTCTACTTTTTGTTTTGGGTATTTTTCAAGTGTGCGGCTGAATCCTTCGGTGGTACGAAGTCG
AATGCTGGAAAATTCATTTCTAATAGAAAATGTTAGGAAAAAGCTTAATACAATAGTTCCAATTATTCCTA
TAATTAGATTATTGGCTAAAGCGAAATTTTGTAACGCATTAGGTCATCCTATAAGTAAACCGGTCTGGGC
CGATTCATCTGATTTTGATATTATTGACCGATTTGTGCGGATATGCAGAAATCTTCTATTTTTTACGGCA
CAACGCAAACCTCTCTCTT

rbcL> Bauhinia_strychnifolia1_rbcL 629

AGCGCTGGGCGGCGGGTCACCGCGCGCTGTTGTCACCGGTAATATCATGCTGGACTCCTTACTAACTTC
CTGCCCTAATGAAACCCAAAAGATAACTGATATTCTTTGGCAGCATTTCCGTGTAACCTTCCTCAACCTTG
GAGTTTCCTTCTGAAAGAAGCAGGTGCCGCGGTAGCTTGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCT
GTGTGGACCGATGGGCTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGCTGCTACCACATCGAGCCCGTTGCT
GGAGAAGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTATCCCTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTA
ACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTTTTTGGATTCAAGGCCCTGCGCGCTCTACGTCTGGAGGATTT
GCGAATCCCTAATGCTTATATTTAACTTTCCAAGGCCCGCCTCACGGCATCCAAGTTGAGAGAGATAAA
TTGAACAAGTACGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGGGGTTATCCGCTAAGAATT
ACGGTCGAGCAGTTTATGAATGTCTCCGCGTGATTTTTTTTTTTTTAAAAAAAATTATTTTTTCTTTTTT

ITS2 >Bauhinia_strychnifolia1 ITS2 215

AACGTCGCTGCCCAAAGCACCAGACTTGTGTGGAGGGCGGATGTTGGCCTCCCGTGAGCATTGCTAGCG
GTTGGCCTAAATGCGAGCTTGCGGTGGCGAGCACCATGACGTACGGTGGTTGAGTCATGCTCGAAGCCT
GTCCTGCGTGCCTCGTCTCAGACAATGGCTCCTACGACCCTCGTGCATCGTGTTGATGCCTTCAACG

4) ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในและระหว่างสปีชีส์ (Genetic variation within and between species)

เมื่อคำนวณค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างพืช 22 ตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม MEGA version 6 ด้วยสมการ K2P model จะได้ค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้ ค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด (mean interspecific distance) ค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิด (mean intraspecific distance) ค่าความผันแปรต่ำสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด (least interspecific distance) ค่าความผันแปรสูงสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิด (maximum intraspecific variation) ของแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด (ตารางที่ 7) จากการวิเคราะห์พบว่า บริเวณ *ITS2* มีค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดสูงที่สุด (0.415 ± 0.065) เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ *matK* (0.191 ± 0.018) และ *rbcL* (0.059 ± 0.010) ตามลำดับ ค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดของแต่ละบริเวณเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่ำกว่า ค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 Inter- and intraspecific variations of *matK*, *rbcL* and *ITS2* sequences in *Bauhinia* sp. And *T. triandra*

ประเภทความแปรผัน	Distance value (K2P)		
	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>ITS2</i>
Mean inter-species	0.191 ± 0.018	0.059 ± 0.010	0.415 ± 0.065
Min inter-species	0.152 ± 0.016	0.028 ± 0.006	0.128 ± 0.030
Mean intra-species	0.038 ± 0.005	0.012 ± 0.003	0.004 ± 0.002
Max intra-species	0.127 ± 0.016	0.022 ± 0.004	0.007 ± 0.004

ตารางที่ 8 Wilcoxon sign rank tests for the distribution if intra- vs. interspecific distances

Barcode	N _{inter-}	N _{intra-}	Wilcoxon W	P value (2-tailed)
<i>matK</i>	24	81	531.50	1.569×10^{-8}
<i>rbcL</i>	59	241	2136.5	1.378×10^{-29}
<i>ITS2</i>	46	185	1081.0	1.790×10^{-26}

5) การทดสอบขอบเขตระหว่าง ค่าความแปรผันระหว่างสปีชีส์ กับ ค่าความแปรผันภายในสปีชีส์ (Assessment of barcoding gap)

การปรากฏขอบเขตระหว่างค่าความแปรผันระหว่างชนิดกับค่าความแปรผันภายในชนิด (barcoding gap) นั้นใช้ในการบ่งชี้ว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้นเหมาะที่จะนำมาใช้ในการระบุชนิดสปีชีส์หรือไม่โดยเราสามารถตรวจสอบ barcoding gap ได้โดยการพล็อตกราฟ 1:1 สำหรับแต่ละชุดข้อมูลของแต่ละเครื่องหมายโดยแต่ละจุดข้อมูล (Data point) แทนค่าระยะพิกัดบนกราฟ X-Y (X-Y coordinate) ค่า X แทนค่าความผันแปรสูงสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิด (maximum intraspecific distances) และค่า Y แทนค่าความผันแปรต่ำสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด (minimum interspecific distance) ของแต่ละคู่ตัวอย่างที่ทำการเปรียบเทียบ

สำหรับชุดข้อมูลของ *matK* พบว่า 50% ของจุดข้อมูล (Data point) มีพิกัดอยู่เหนือเส้นที่เหลือนี้อีกครึ่งตกอยู่ใต้เส้น 1:1 (รูปที่11a) แสดงให้เห็นว่ามีค่าความผันแปรสูงสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิด ของ กล้วยนาเงา (*B. strychnifolia*) สร้อยสยาม (*B. siamensis*) และอรพิม (*B. winitii*) บางตัวอย่าง ที่มากกว่า ค่าความผันแปรต่ำสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวบริเวณ *matK* ไม่เหมาะสมในการนำมาจำแนกสปีชีส์ในระดับสกุล *Bauhinia* ถึงแม้ว่าจะสามารถนำมาใช้จำแนกกล้วยนาเงา (*B. strychnifolia*) จากกล้วยนาเงาเขียว (*T. triandra*) ได้ก็ตาม

กรณีของ *rbcl* พบว่า มีเพียง 13% ของจุดข้อมูล (Data point) เท่านั้นที่มีพิกัดอยู่ใต้เส้น 1:1 (รูปที่ 11b) ซึ่งให้แสดงความเหลื่อมล้ำเล็กน้อยระหว่างค่าความผันแปรต่ำสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดกับค่าความผันแปรต่ำสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดแสดงให้เห็นว่ามีค่าความผันแปรสูงสุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดในพืชบางตัวอย่าง จากผลการวิเคราะห์จึงสรุปได้ว่าบริเวณ *rbcl* มีความสามารถในการนำมาจำแนกสปีชีส์ได้ โดยควรใช้ร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณอื่นด้วยเพื่อความมั่นใจและเชื่อมั่นในการวิเคราะห์

สำหรับบริเวณ *ITS2* พบว่า จุดข้อมูล (Data point) ทั้งหมด มีพิกัดอยู่เหนือเส้น 1:1 แสดงให้เห็นขอบเขตอย่างชัดเจนระหว่างค่าความแปรผันระหว่างชนิดกับค่าความแปรผันภายในชนิด (barcoding gap) สรุปได้ว่า *ITS2* มีประสิทธิภาพมากที่สุด ในการระบุชนิดพืชสมุนไพร (รูปที่ 11c)

จากผลการตรวจสอบขอบเขตระหว่างค่าความแปรผันระหว่างชนิดกับค่าความแปรผันภายในชนิด (barcoding gap) ในการทดลองครั้งนี้ สรุปได้ว่าบริเวณ *rbcl* และ *ITS2* นั้นมี Barcode gap จึงความสามารถที่จะนำมาใช้ร่วมกันในการจำแนกชนิดพืชในสกุล *Bauhinia* ได้ และนอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการแยกแยะกล้วยนาเงา (*B. strychnifolia*) จากกล้วยนาเงาเขียว (*T. triandra*) ได้เช่นกัน

2) การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธีการวิเคราะห์แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ด้วยวิธี Neighbour-Joining (Evaluating the efficiency of the barcodes for species discrimination by Neighbour-Joining phylogeny analysis)

จากการวิเคราะห์ Neighbour-joining tree ที่ถูกสร้างจาก genetic distance ซึ่งคำนวณด้วยสมการ K2P และตรวจสอบความน่าเชื่อถือ (reliability) ของ Phylogenetic trees ที่สร้างขึ้นด้วยวิธี 1000-Bootstrapping พบว่า บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *ITS2* มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการจำแนกสปีชีส์เมื่อ

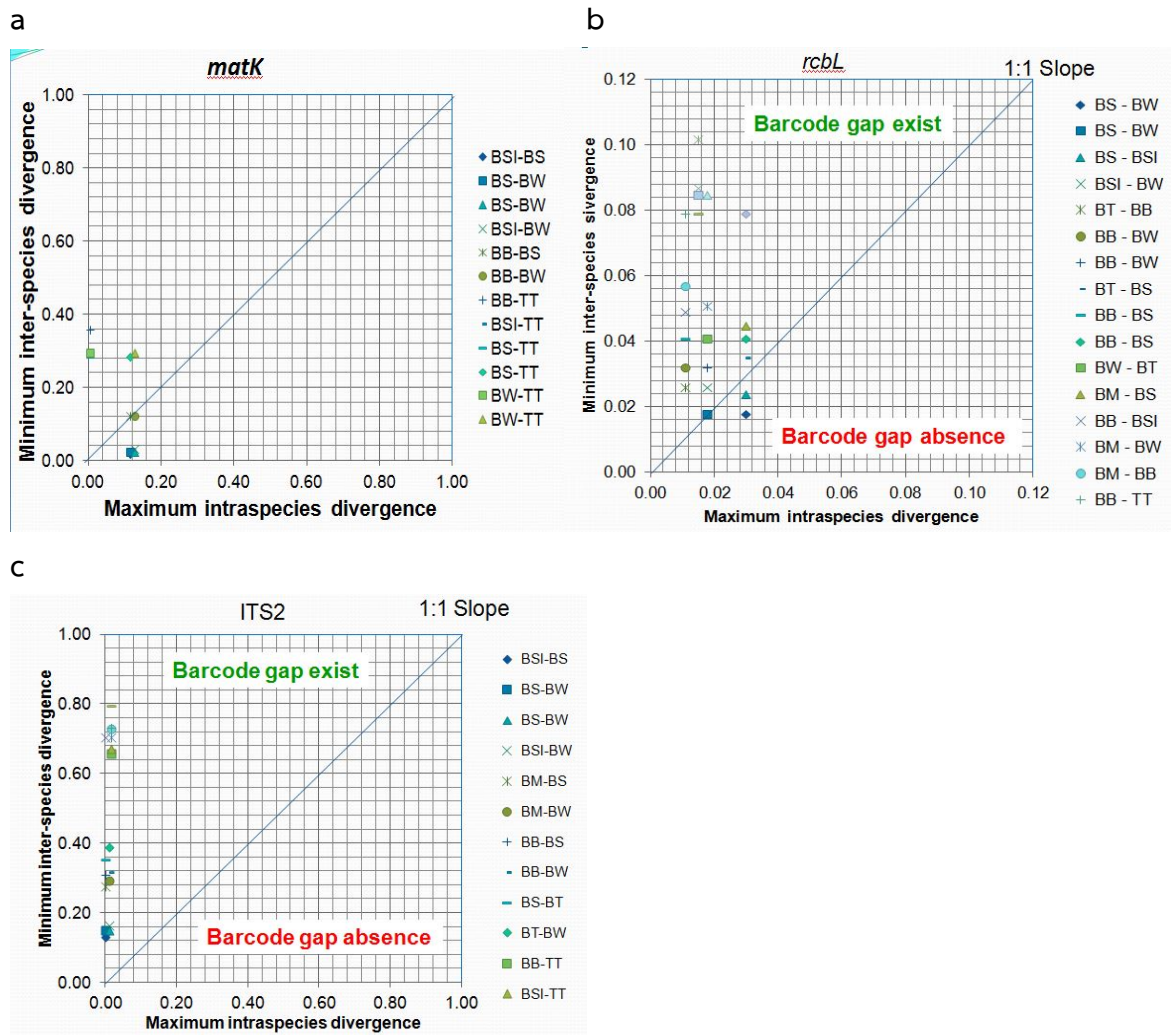
เปรียบเทียบกับ *matK* และ *rbcL* ตามลำดับผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้เคยมีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้โดย CBOL Plant Working (2009) (5, 6).

Phylogenetic (distance) tree ของ *matK* แสดงการจัดกลุ่ม (cluster) ที่ไม่ชัดเจนนักระหว่าง *Bauhinia* sp. ทั้ง 4 ชนิดแต่กลุ่มของหญ้านางเขียว (*T. triandra*) (รูปที่12) นั้นแยกออกจากกลุ่มพืชสกุล *Bauhinia* อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม ค่าความเชื่อมั่น bootstraps phylogeny ที่ 72% ของ Neighbour-Joining tree สำหรับ *matK* แสดงให้เห็นว่าทุก sequences ของขยัน (*B. strychnifolia*) นั้นอยู่ในกลุ่มเดียวกันและมีขอบเขต (boundary) ระหว่างสปีชีส์หญ้านางแดงกับสปีชีส์อื่นๆ ในตระกูลเดียวกัน (รูปที่13)

สำหรับ Phylogenetic tree ของ *rbcL* นั้นค่าความเชื่อมั่น bootstraps phylogeny นั้นต่ำกว่า 70% ระหว่างขยัน (*B. strychnifolia*) กับอรพิม (*B. winitii*) (รูปที่14) แสดงให้เห็นว่า ถึงแม้ทุก sequences ของขยัน (*B. strychnifolia*) นั้นจะอยู่ในกลุ่มเดียวกันแต่มีการเหลื่อมล้ำของขอบเขต (overlapping boundary) ระหว่างสปีชีส์หญ้านางแดงกับสปีชีส์อรพิม

สำหรับ Phylogenetic tree ของ *ITS2* นั้นแสดงให้เห็นขอบเขตที่ชัดเจน (discrete boundary) ระหว่างกลุ่มของสปีชีส์ขยัน (*B. strychnifolia*) กับกลุ่มของสปีชีส์อื่นๆ ในตระกูลเดียวกัน และ หญ้านางเขียว (*T. triandra*) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ต่างวงศ์ (family) ที่ค่าความเชื่อมั่น 100% bootstraps (รูปที่ 15)

จากผลการวิเคราะห์ Phylogenetic (NJ) tree สรุปได้ว่าบริเวณ *ITS2* นั้นมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการระบุสปีชีส์สำหรับขยัน (*B. strychnifolia*) ส่วนบริเวณ *matK* นั้นสามารถใช้ในการวิเคราะห์ด้วย NJ tree เพื่อจำแนกสปีชีส์ได้เช่นกัน ดังนั้น บริเวณ *matK* + *ITS2* จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้จำแนกสปีชีส์ร่วมกันได้ ด้วยวิธีวิเคราะห์ Phylogenetic (NJ) tree



រូបភាព 11 Dot plots of maximal intraspecific distance versus minimal interspecific (nearest neighbor) distance for analyzing the presence of barcode gap in: (a) *matK*; (b) *rbcL* and (c) ITS2. Each data point-legend represents ratio (difference) of minimum inter- to maximum intraspecific distances of an individual-pair of comparing species.

BB = *B. blakeana*; BM = *B. malabarica*; BS = *B. strychnifolia*; BSi = *B. siamensis*;

BW = *B. winitii*; TT = *T. triandra*; BT = *B. tomentosa*

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้ เราได้สร้างเครื่องมือในการระบุพืช “ดีเอ็นเอบาร์โค้ด” ที่เป็นมาตรฐานสำหรับพืชสมุนไพรชนิด (B. strychnifolia) โดยใช้พืชชนิดอื่นๆ ในตระกูลเดียวกัน รวมทั้งสมุนไพรชนิดอื่น (T. triandra) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบที่คล้ายกับขันทองและมักก่อให้เกิดความสับสนในการจำแนกมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างเครื่องมือดังกล่าว พืชทั้งหมดที่นำมาใช้ในการศึกษาและสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้นได้รับการระบุชนิดที่ถูกต้องแล้วด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยา โดยผู้เชี่ยวชาญด้านอนุกรมวิธานของพืช เราสามารถนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับการวิเคราะห์และคำนวณหาความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนั้น ไปฝากจัดเก็บไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank เพื่อให้นักวิจัยและผู้สนใจสามารถเข้าถึงและดึงข้อมูลเหล่านี้ ไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ได้ต่อไป

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับพืชสมุนไพรชนิดที่สร้างขึ้นนี้ ใช้บริเวณมาตรฐาน 3 แห่ง ได้แก่ บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนของยีน *matK* และ *rbcl* ซึ่งอยู่บนคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *ITS2* ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *rRNA* ที่อยู่บนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (nuclear DNA) เมื่อนำบริเวณมาตรฐานทั้ง 3 บริเวณมาคำนวณหาความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วได้ช่วงของค่าที่แตกต่างกัน เนื่องจากแต่ละบริเวณที่ศึกษา มีความแตกต่างของจำนวนและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เท่ากัน โดยพบว่าบริเวณ *ITS2* มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพรรณานางแดงกับพืชชนิดอื่นๆ สูงที่สุด ในขณะที่มีค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพรรณานางแดงแต่ละตัวอย่างต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ *rbcl* และ *matK* ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ (6, 7, 28)

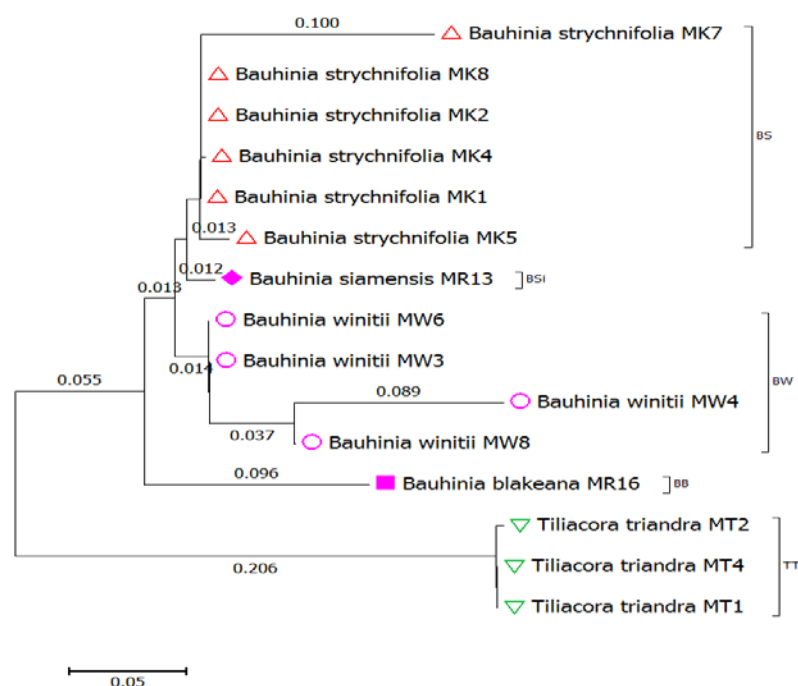
เมื่อนำค่าความแปรผันลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละบริเวณมาวิเคราะห์ การปรากฏขอบเขตระหว่างค่าความแปรผันระหว่างชนิดกับค่าความแปรผันภายในชนิด (barcoding gap) เพื่อตรวจสอบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้นเหมาะที่จะนำมาใช้ในการระบุชนิดพืชหรือไม่ พบว่ามี barcode gap สำหรับบริเวณ *rbcl* และ *ITS2* โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ *ITS2* ให้ผล barcode gap ชัดเจนที่สุดซึ่งช่วยสนับสนุนสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่เคยมีมาก่อนหน้านี้ว่า บริเวณ *ITS2* มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดมากกว่าบริเวณ *matK* (7, 9, 28) ทั้ง 2 บริเวณ (*rbcl* + *ITS2*) จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อสร้างความเชื่อมั่นในการจำแนกและระบุพืช

เมื่อนำค่าความแปรผันลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละบริเวณ มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของแต่ละบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด ในการจำแนกสปีชีส์บน Phylogenetic tree ด้วยวิธีการ Neighbour-joining (NJ) พบว่า ทั้งบริเวณ *matK* และ *ITS2* สามารถจำแนกพรรณานางแดงจากพืชชนิดอื่นได้ แต่บริเวณ *ITS2* มีประสิทธิภาพและมีความน่าเชื่อถือในการระบุและจำแนกสปีชีส์สำหรับพรรณานางแดงมากที่สุดส่วน NJ tree ที่สร้างจากบริเวณ *rbcl* นั้นไม่สามารถจำแนกพรรณานางแดงออกจากพืชชนิดอื่นที่อยู่ในสกุลเดียวกัน แต่สามารถแยกแยะพืชในสกุล *Bauhinia* ออกจากพืชต่างสกุล (*Tiliacora*) ซึ่งอยู่ในวงศ์อื่นของอนุกรมวิธานพืช

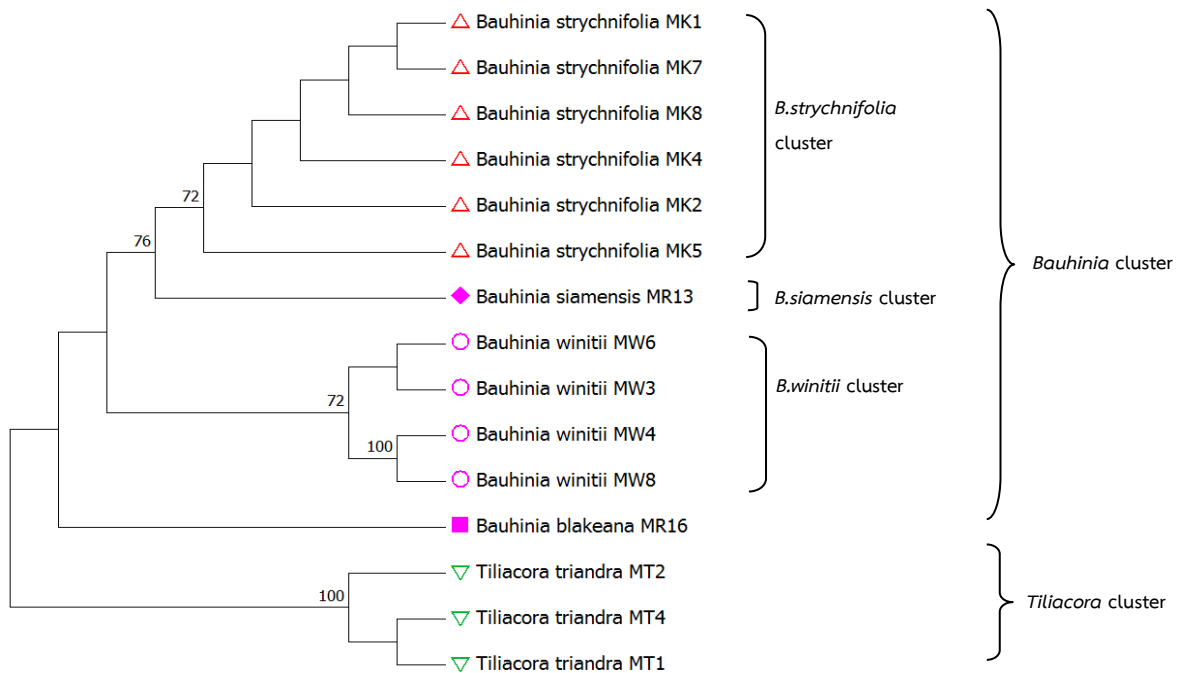
จากงานวิจัยนี้ สรุปได้ว่าบริเวณ *ITS2* มีทั้งประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือที่สุด ที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อระบุพืชสำหรับขันทอง

อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุพืชสมุนไพรนั้นควรจะใช้อย่างน้อย 2 บริเวณขึ้นไป เพื่อความเชื่อมั่นในการวิเคราะห์ เนื่องจาก ณ ปัจจุบันนี้ ยังไม่มีบริเวณใดที่ประสบความสำเร็จในการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับพืชทุกชนิด (5, 6) ดังนั้นสิ่งที่เราสามารถศึกษาเพิ่มเติมคือ การสร้างและ

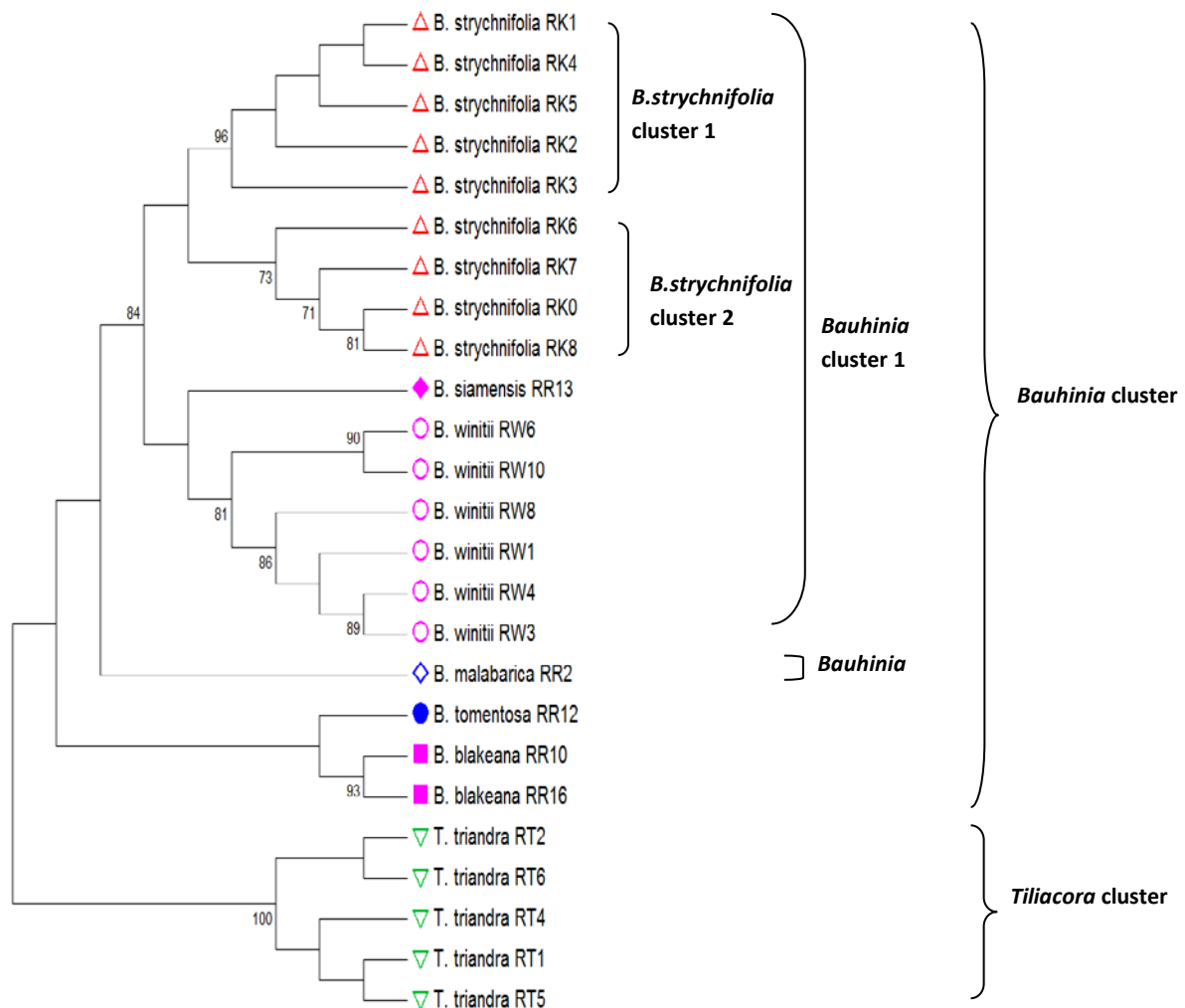
วิเคราะห์ความสามารถของบริเวณ *psbA-trnH* สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของขยันซึ่งบริเวณดังกล่าวนี้เป็นอีกหนึ่งบริเวณที่มีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ว่ามีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดพืชได้ดีเช่นกัน (12) นอกจากนี้ สิ่งที่ต้องทดสอบเพิ่มเติมอีกอย่าง คือ การวิเคราะห์ว่าบริเวณ *ITS2* ที่จะนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้น มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดผลิตภัณฑ์และสมุนไพรที่ผ่านการแปรรูปได้หรือไม่โดยสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายมาตรวจสอบ อาจเป็นเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการระบุจากแหล่งจำหน่ายว่าเป็นพืชเพียงชนิดเดียว (เช่น ใบชาหญ้านางแดง) หรือผลิตภัณฑ์ที่ระบุว่ามีนางแดงเป็นส่วนประกอบ (เช่น แคปซูล)



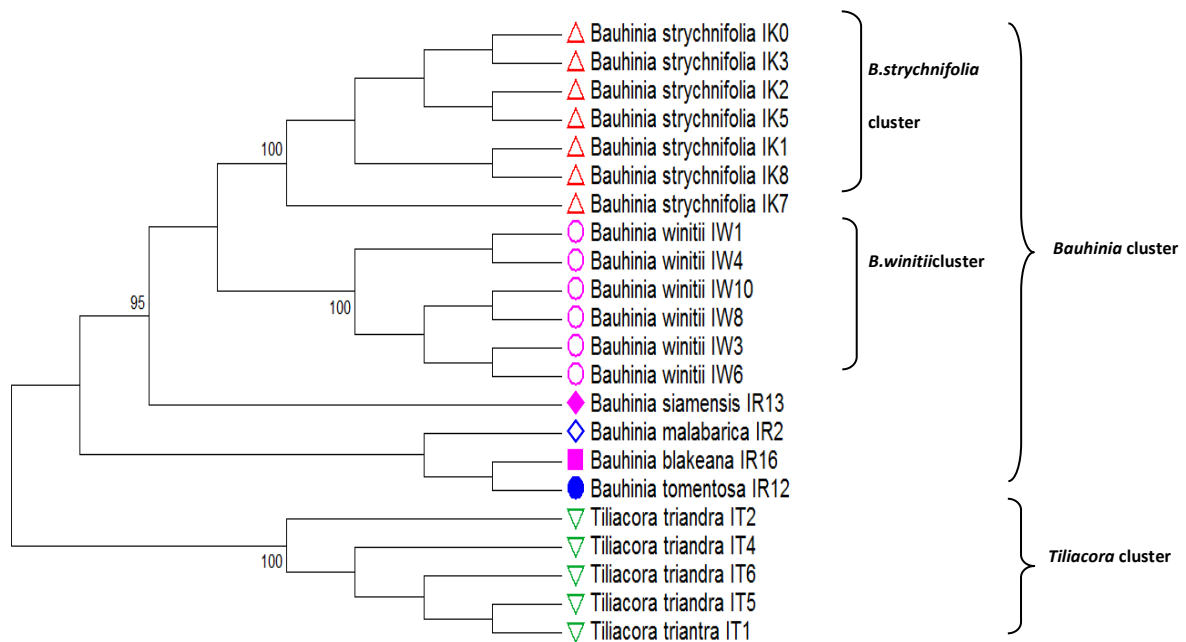
ຮູບທີ່ 12 The *matK* distance tree of four *Bauhinia* sp. and one morphologically confusing species, *T. triandra* based on Neighbour-joining (NJ) analysis with Kimura 2-parameter (K2P) model. Abbreviations followed taxon names are individual codes. The branch scale on bottom measures genetic distance in substitution per nucleotide.



รูปที่ 13 The Neighbour-joining tree of the *matK* sequences from four *Bauhinia* sp. and one morphologically confusing species *T. triandra*. Bootstrap values (>70%) are shown next to the branches.



รูปที่ 14 The Neighbour-joining tree of the *rbcL* sequences from six *Bauhinia* species and one morphologically confusing species *T. triandra*. Abbreviations following taxon names are individual codes. Bootstrap values (>70%) are shown next to the branches.



รูปที่ 15 The Neighbour-joining tree of the ITS2 sequences from six *Bauhinia* (B.) species and one morphologically confusing species *T. triandra*. Bootstrap values (>70%) are shown next to the branches.

บรรณานุกรม

1. Gutteridge A and Burns M. The Application of DNA Molecular Approaches for the Identification of Herbal Medicinal Products. *Journal of the Association of Public Analysts*. 2013; 41: 53-66.
2. Kaewpiboon C, Lirdprapamongkol K, Srisomsap C et al. Studies of the in vitro cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 12: 217.
3. Sayompark S, Itharat A and Hansakul P. Comparative Study of Antioxidant Activities and Total Phenolic Content of *Bauhinia strychnifolia* Leaves Extracts. The 1st Conference on Graduate Student Network of Thailand (GS-NETT 2012). *Sci-Health* 011.
4. <http://web3.dnp.go.th/botany/index.aspx>
5. Hollingsworth PM, Graham SW and Little DP. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE*. 2011; 6(5): e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254.
6. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *PNAS*. 2009; 106(31): 12794-97.
7. Hollingsworth PM. Refining the DNA barcode for land plants. *PNAS*. 2011; 108(49): 19451-2.
8. Han J, Zhu Y and Chen X. The Short ITS2 Sequence Serves as an Efficient Taxonomic Sequence Tag in Comparison with the Full-Length ITS. *Hindawi – BioMed Research International*. 2013; 741476; dx.doi.org/10.1155/2013/741476.
9. Gu W, Song J, Cao Y, Sun Q, Yao H, et al. Application of the ITS2 Region for Barcoding Medicinal Plants of Selaginellaceae in Pteridophyta. *PLoS ONE*. 2013; 8(6): e67818; DOI:10.1371/journal.pone.0067818.
10. Murray MG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*. 8: 4321-4325.
11. Yu J, Xue JH and Zhou SL. New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*. 2011; 49(3): 176–81.
12. Kress WJ, Erickson DL. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. *PLoS one*. 2007; 2: e508.
13. Kress WJ, Erickson DL, Andrew Jones F, et al. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106: 18621-6.
14. de Vere N, Rich TCG, Ford CR, et al. DNA Barcoding the Native Flowering Plants and Conifers of Wales. *PLoS ONE*. 2012; 7(6): e37945. doi:10.1371/journal.pone.0037945.
15. Selvaraj D, Shanmughanandhan D, Sarma RK, et al. DNA Barcode ITS Effectively Distinguishes the Medicinal Plant *Boerhavia diffusa* from Its Adulterants. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 10 (2012) 364–367.

16. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 4673-80.
17. Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology.* 1990; 215: 403–410. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)
18. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007; 24: 1596-9.
19. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731–9.
20. Meyer, C.P. &Paulay, G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology* 3: 2229-38.
21. Robinson EA, Blagoev GA, Hebert PDN, Adamowicz SJ (2009) Prospects for using DNA barcoding to identify spiders in species-rich genera. *ZooKeys*, 46, 27–46.
22. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
23. Wiemers M, Fiedler K (2007) Does the DNA barcoding gap exist? A case study in blue butterflies (Lepidoptera: lycaenidae). *Frontiers in Zoology*: 4, 8.
24. Tamura K, Battistuzzi FU, Billings-Ross P, Murillo O, Filipski A, Kumar S. (2012) Estimating Divergence Times in Large Molecular Phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2012) 109: 19333-8.
25. Barry G. Hall. (2013). Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.* doi: 10.1093/molbev/mst012.
26. Mukund V. KattiPKR, and Vidya S. Gupta. Differential Distribution of Simple Sequence Repeats in Eukaryotic Genome Sequences.
27. N.Tsukasa, M.Koji, A.Hirotaka, F.Hiroyuki. A Protocol for the Construction of Microsatellite Enriched Genomic Library. *Plant molecular biology.* 2006; 24: 305-12.
28. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, et al. (2010) Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE* 5(1): e8613. doi:10.1371/journal.pone.0008613.

ผลการศึกษา: ปุดเดือน *Hedychium longicornutum* Griff. ex Baker

1. การศึกษาวิเคราะห์พันธุกรรมตัวอย่างปุดเดือนโดยใช้ DNA barcode matK และ rbcL

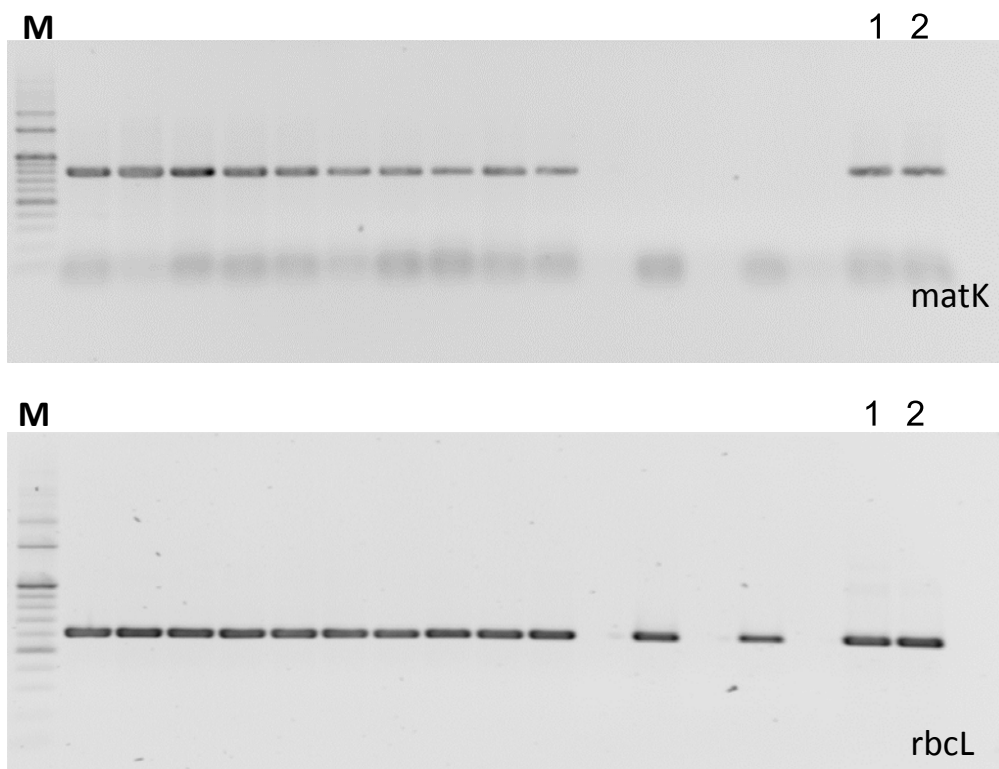
จากการวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอต้นปุดเดือน (*Hedychium longicornutum* Griff. ex Baker) จำนวน 2 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน matK และ rbcL พบว่ายีน matK ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp. ยีนและ rbcL ขนาด 600 bp. (รูปที่ 1) ซึ่งทั้งสองไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจงในตัวอย่างดีเอ็นเอของปุดเดือน นำ PRC product ส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing และเปรียบเทียบกับข้อมูล nucleotide จากฐานข้อมูล (NCBI) พบว่า sequence จากยีน matK ของตัวอย่างปุดเดือน มีค่าความเหมือน (Identity) กับ sequence ของตัวอย่างในสกุลอื่น คือ *Justicia campylostemon* และ *Devernoia adhatodoides* ที่ความเหมือน 97%

ส่วน sequence ของยีน rbcL นั้นเหมือนกับ sequence ใน genus *Hedychium* ของต้นปุดเดือน สูงถึง 100% ได้แก่ *H. coronarium*, *H. gardnerianum*, *H. coccineum*, *H. flavescens*, *H. Spicatum* และ *H. Dekianum* จากการ Phylogenetic tree ของ rbcL ระหว่างตัวอย่างปุดเดือนและพืช-สปีชีส์ในสกุลเดียวกัน (รูปที่ 2) พบว่า DNA barcode rbcL ไม่สามารถแยกตัวอย่างปุดเดือน ออกจากพืช-สปีชีส์ในสกุลเดียวกันได้ เมื่อคำนวณค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างและพืช-สปีชีส์ในสกุลเดียวกันของ sequence rbcL และทดสอบความแตกต่างด้วย Wilcoxon 2-sample tests พบว่าค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด (mean interspecific distance) และค่าความผันแปรเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิด (mean intraspecific distance) นั้นไม่มีความแตกต่างกัน

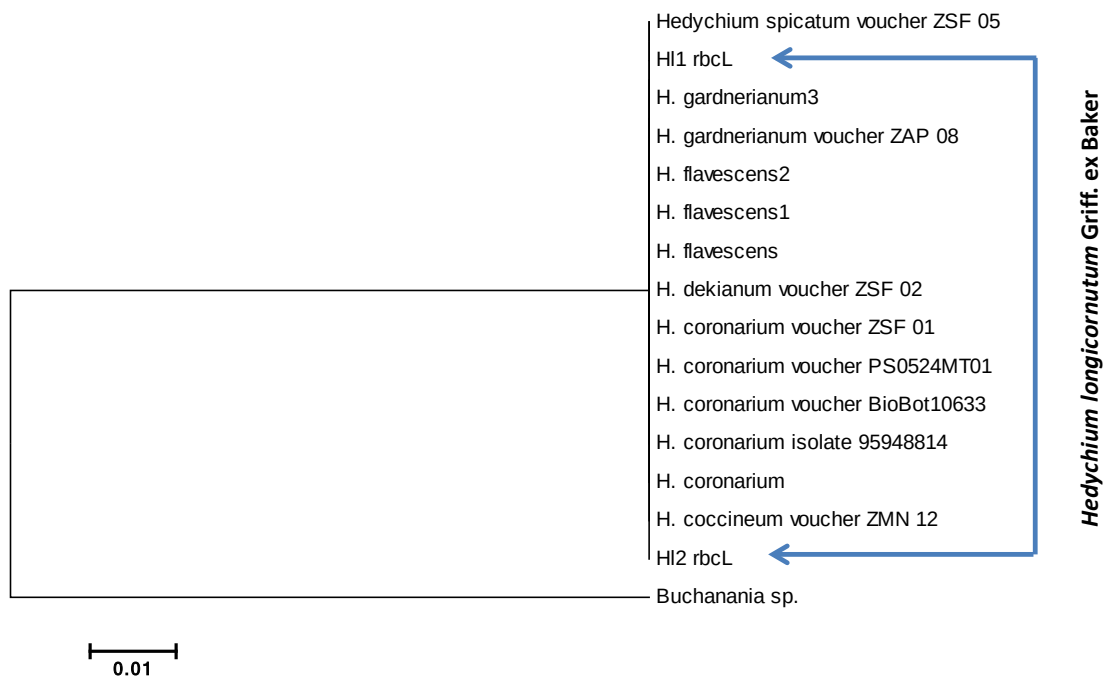
สรุปผลการวิจัย

จากการประเมินประสิทธิภาพของ DNA barcode rbcL ด้วยการวิเคราะห์ Phylogenetic tree และคำนวณค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในตัวอย่างปุดเดือนรวมถึงพืชในสกุลเดียวกัน ในเบื้องต้นพบว่า rbcL นั้นไม่สามารถจำแนกตัวอย่างชนิดใดๆ ออกจากพืช-สปีชีส์ ในสกุลเดียวกันได้

ส่วน DNA barcode matK นั้นยังไม่สามารถสรุปว่า barcode นี้มีประสิทธิภาพในการจำแนกตัวอย่างปุดเดือนออกจากพืช-สปีชีส์ในสกุลเดียวกันได้หรือไม่ เนื่องจากไม่มีข้อมูลการศึกษาตัวอย่างปุดเดือนรวมถึงพืชในสกุลเดียวกัน ในฐานข้อมูล NCBI ดังนั้นควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มในพืช-สปีชีส์ ในสกุลเดียวกัน รวมถึงประเมินประสิทธิภาพของ DNA barcode ตัวอื่นๆ ในตัวอย่างปุดเดือนต่อไป



รูปที่ 1 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของต้นปุดเดือนจากการใช้ไพรเมอร์ยีน matK ขนาด 800 bp. และ rbcL ขนาด 600 bp.

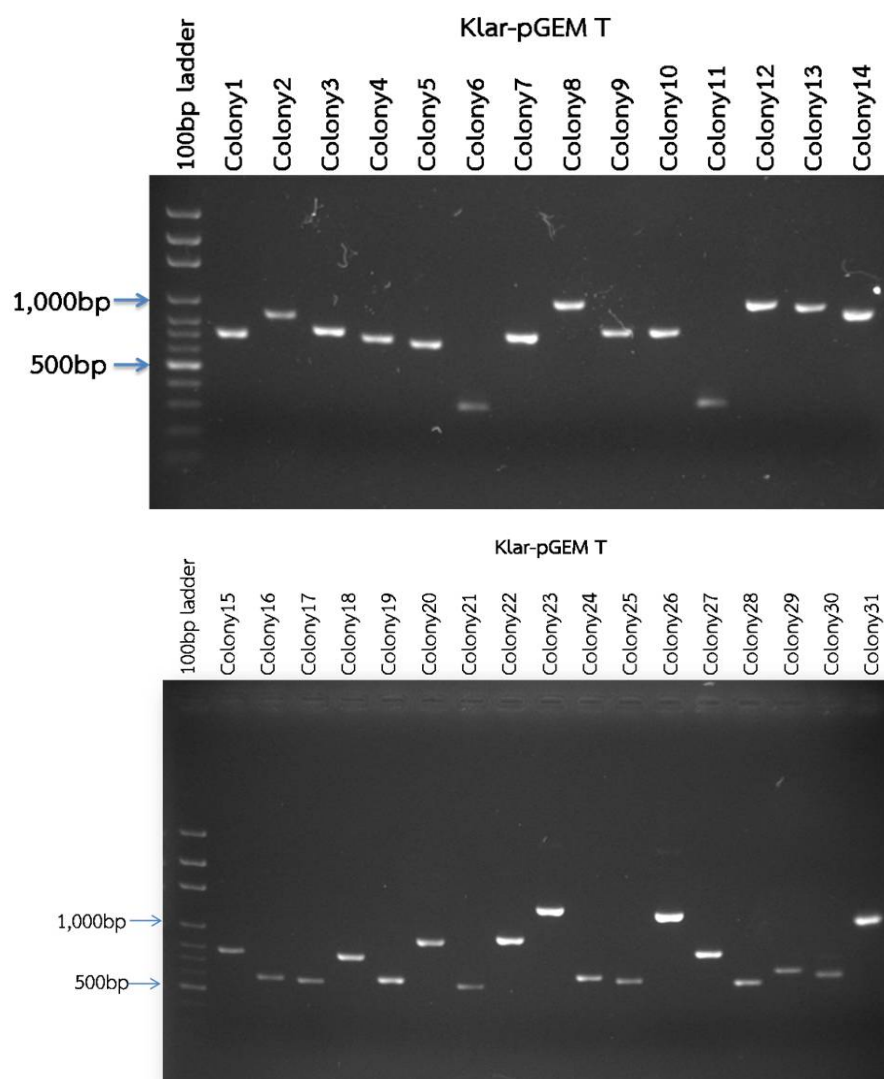


รูปที่ 2 The Neighbour-joining tree จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างปุดเดือนและพืช- สปีชีส์อื่นๆ ในสกุลจากฐานข้อมูล (NCBI) โดยใช้ DNA barcode rbcL มี Buchananian sp. เป็น out group

ผลการศึกษา: เปราะราศี *Kaempferia larsenii* Sirirugsa

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลต์

ทำการคัดเลือก white colony จำนวน 192 colonies มาตรวจสอบขนาดของ insert ที่ได้ โดยวิธี Colony PCR เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่มีขนาดของ insert ขนาดอยู่ระหว่าง 500-1000 bp จากนั้นจึงทำการสกัดพลาสมิด เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป



ภาพที่ 1 colonies ตัวอย่างผลการตรวจสอบขนาดของ insert ที่ได้ โดยวิธี Colony PCR

ทำการส่งตัวอย่างพลาสติกเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จำนวนทั้งสิ้น 96 โคลน จากผลการวิเคราะห์ สามารถนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งสิ้น 85 คู่ (ตารางที่ 1) และเมื่อทำการทดสอบไพรเมอร์ที่ได้ พบว่า ไพรเมอร์ที่สามารถ amplify ตัวอย่างดีเอ็นเอ มีจำนวน 54 คู่ ดังนี้

Klar-pGEMT_#

115	128	12	133	146	148	14	157	159	15
167	186	189	193	198	205	213	216	219	221
38	39	43	47	48	53	87	98	143	144
153	164	177	182	217	49	199-1	199-2	88-1	88-2
138	147	165	172	178	185	189	196	202	3
206	44	51	61						

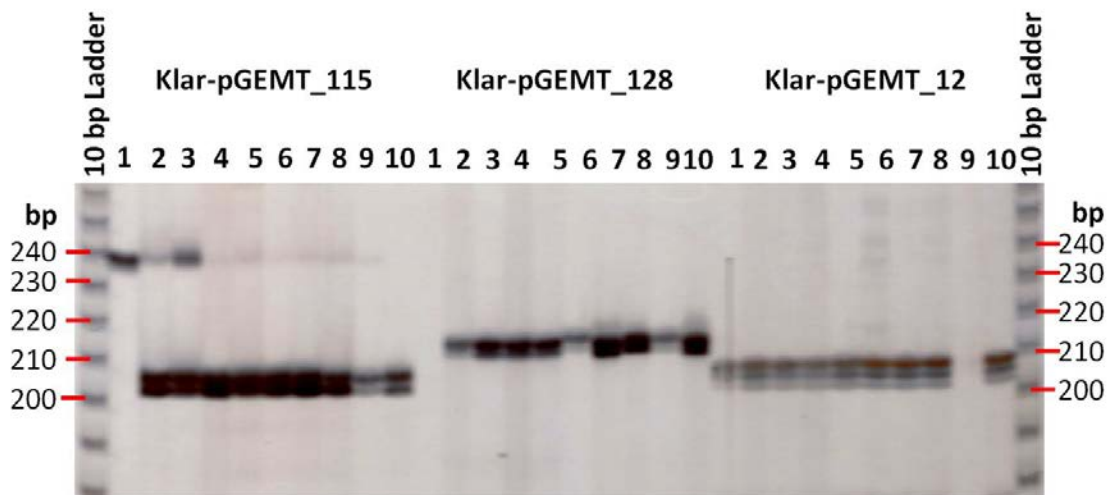
โดยไพรเมอร์ทั้ง 54 คู่ ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์พันธุกรรมของตัวอย่างพืชทั้งหมด โดยผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 2-18) ซึ่งมีไพรเมอร์ที่ให้ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็น Polymorphic pattern จำนวน 24 คู่ ได้แก่

Klar-pGEMT-115	Klar-pGEMT-128	Klar-pGEMT-133
Klar-pGEMT-148	Klar-pGEMT-186	Klar-pGEMT-198
Klar-pGEMT-143	Klar-pGEMT-144	Klar-pGEMT-153
Klar-pGEMT-164	Klar-pGEMT-177	Klar-pGEMT-199-1
Klar-pGEMT-199-2	Klar-pGEMT-43	Klar-pGEMT-47
Klar-pGEMT-138	Klar-pGEMT-147	Klar-pGEMT-185
Klar-pGEMT-202	Klar-pGEMT-44	Klar-pGEMT-61
Klar-pGEMT-88-2	Klar-pGEMT-3	Klar-pGEMT-206

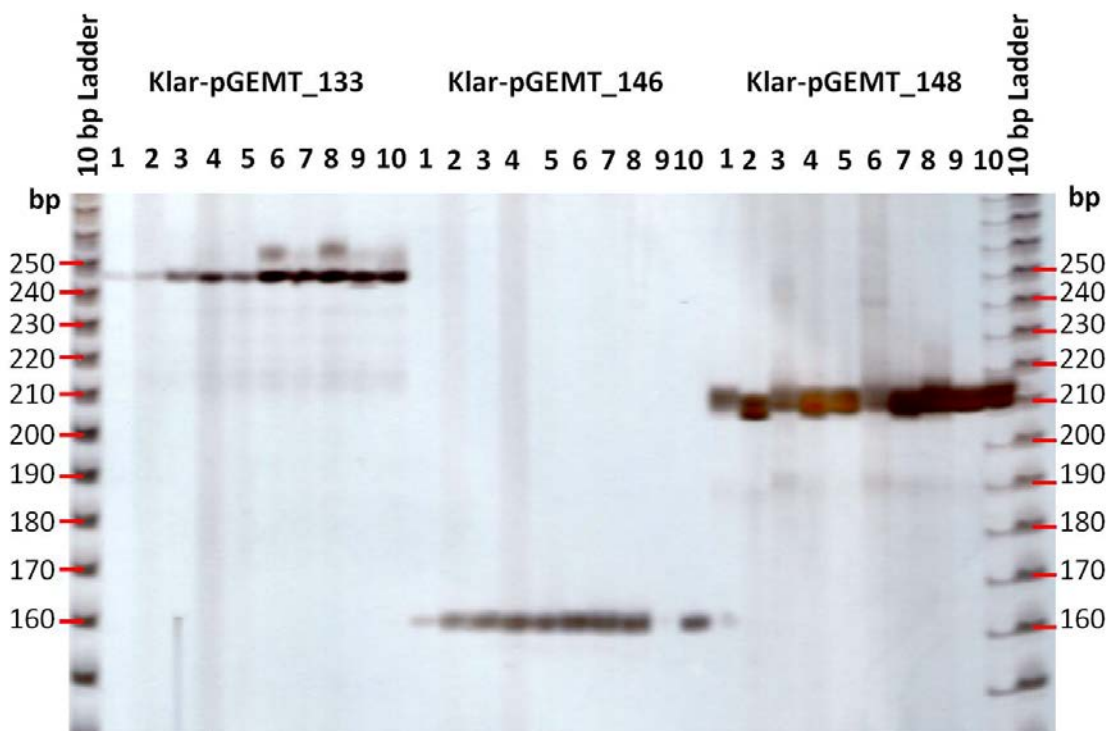
2) ไพรเมอร์ที่ให้ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็น monomorphic pattern จำนวน 25 คู่ ได้แก่

Klar-pGEMT-12	Klar-pGEMT-146	Klar-pGEMT-15
Klar-pGEMT-167	Klar-pGEMT-189	Klar-pGEMT-193
Klar-pGEMT-205	Klar-pGEMT-221	Klar-pGEMT-38
Klar-pGEMT-39	Klar-pGEMT-14	Klar-pGEMT-157
Klar-pGEMT-159	Klar-pGEMT-213	Klar-pGEMT-216
Klar-pGEMT-219	Klar-pGEMT-48	Klar-pGEMT-53
Klar-pGEMT-87	Klar-pGEMT-98	Klar-pGEMT-172
Klar-pGEMT-51	Klar-pGEMT-165	Klar-pGEMT-189
Klar-pGEMT-196		

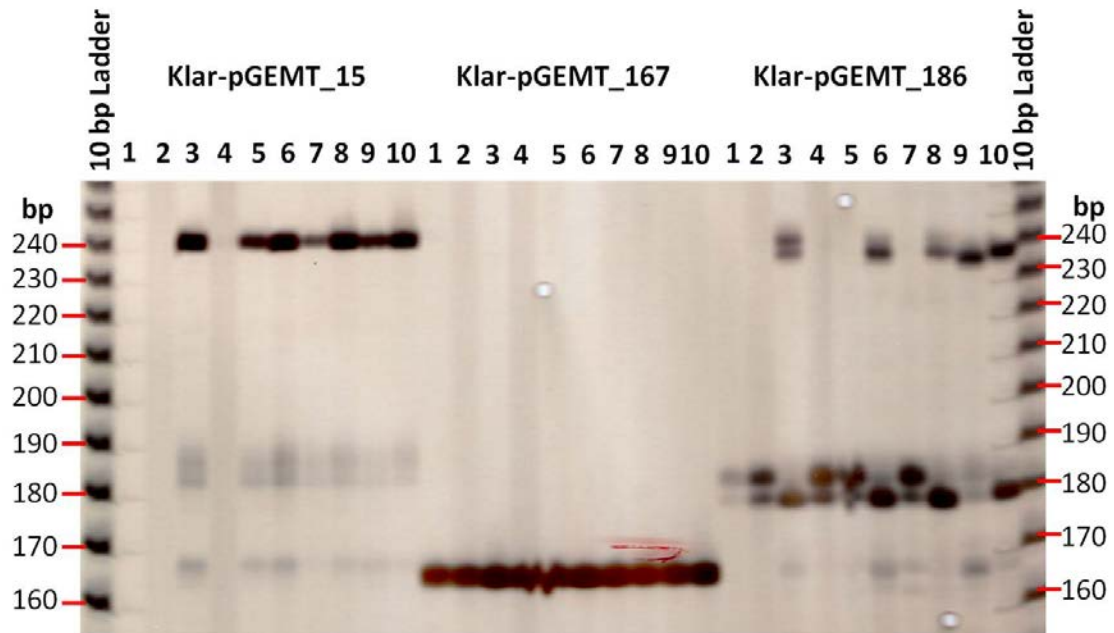
นำข้อมูลรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (pattern/genotype) เปราะราศีที่ได้ มาทำการวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis) ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม simple matching เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ภายในกลุ่มของเปราะราศีที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc version 2.11T (Exeter Software, Setanket, NY)



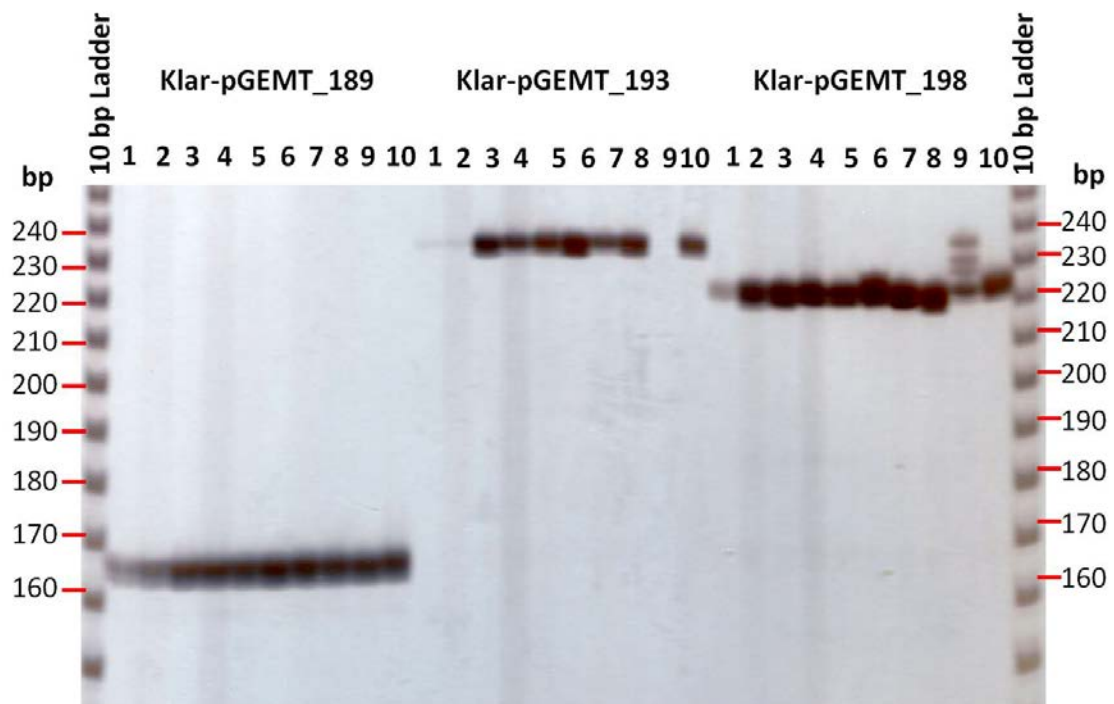
ภาพที่ 2 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราศี ที่ได้จากไพรมอร์ Klar-pGEMT_115 128 และ 12



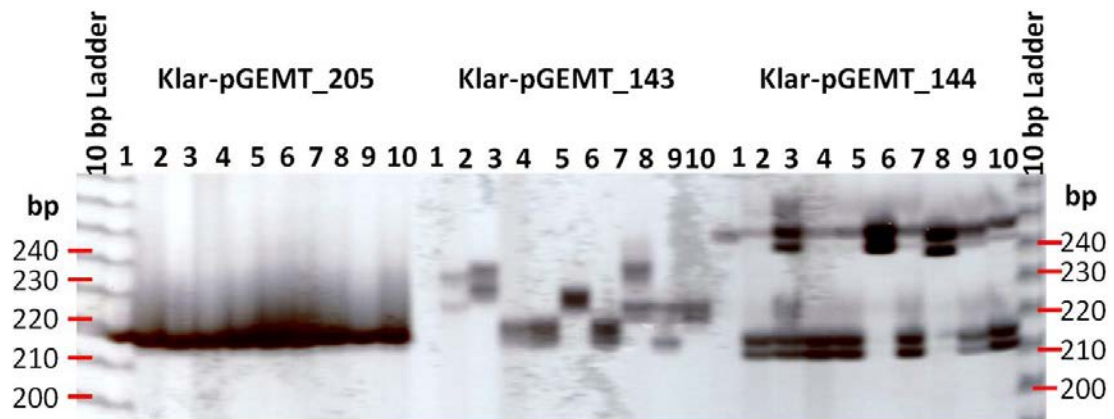
ภาพที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราศี ที่ได้จากไพรมอร์ Klar-pGEMT_133 146 และ 148



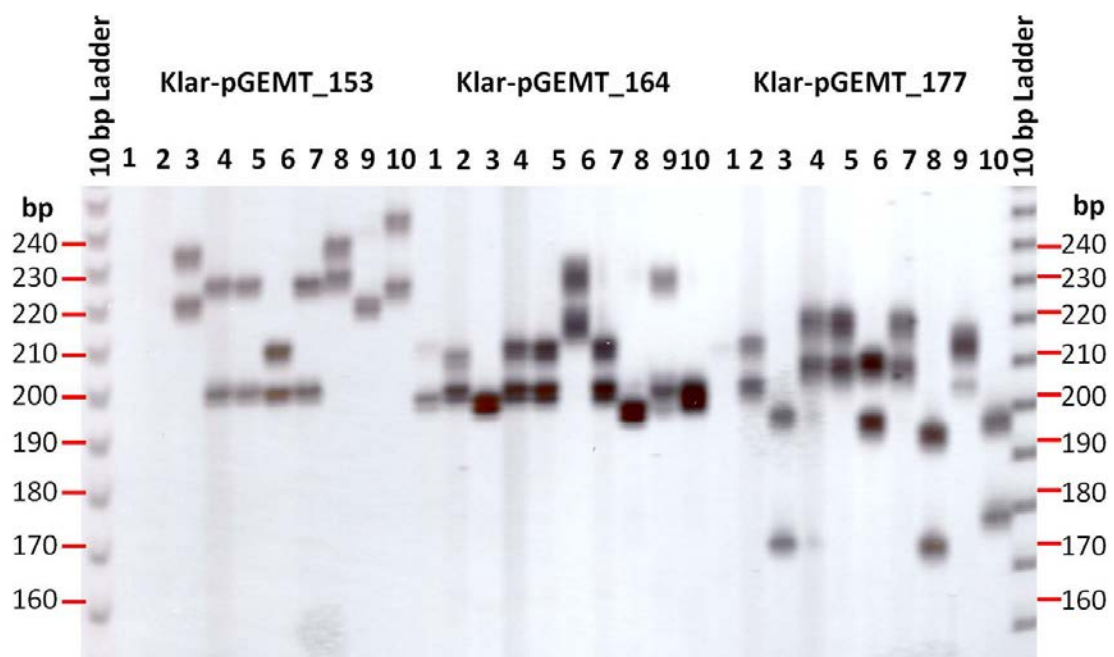
ภาพที่ 4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_15 167 และ 186



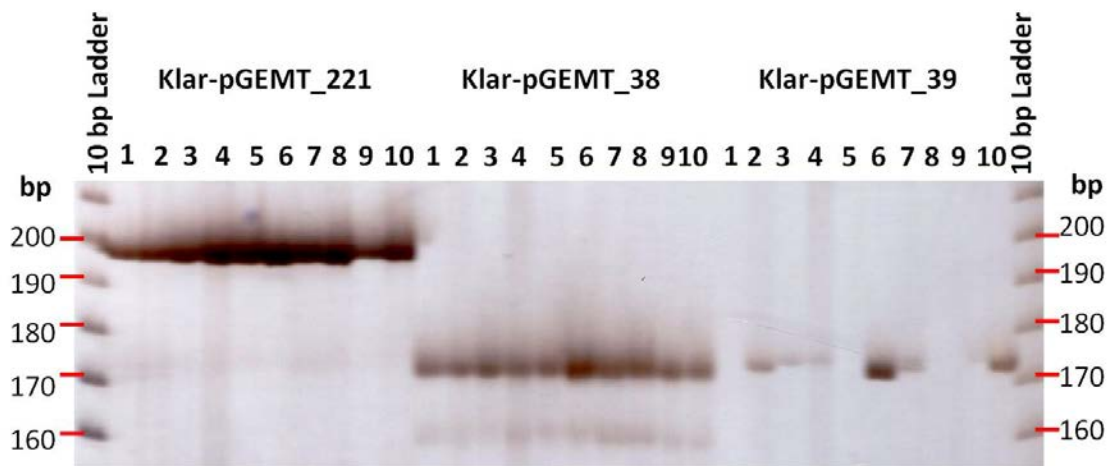
ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_189 193 และ 198



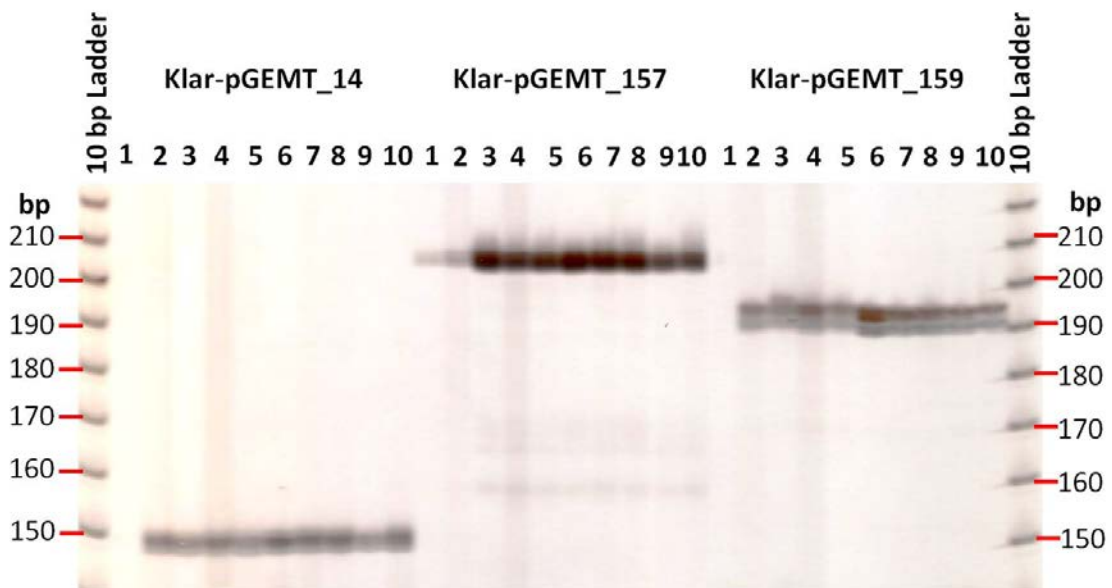
ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_205 143 และ 144



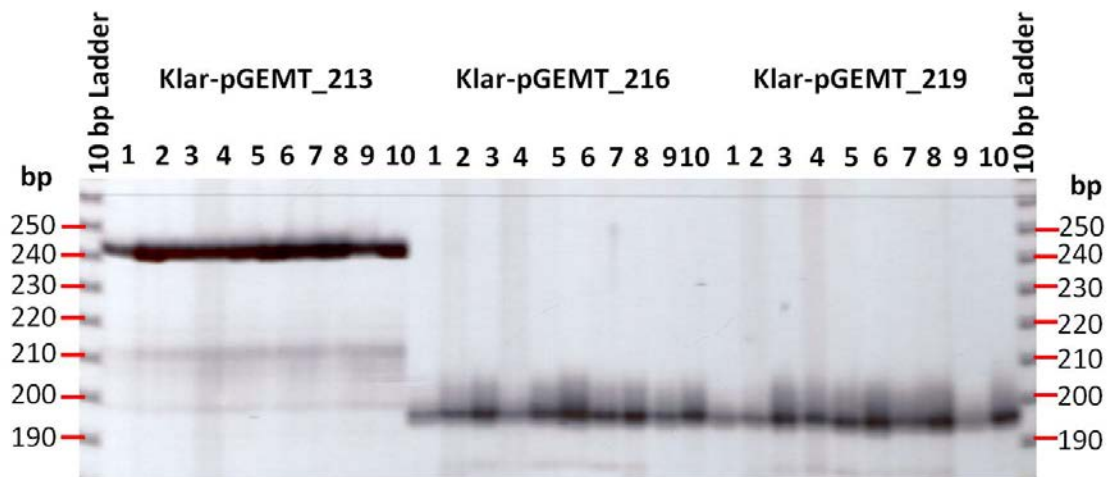
ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_153 164 และ 177



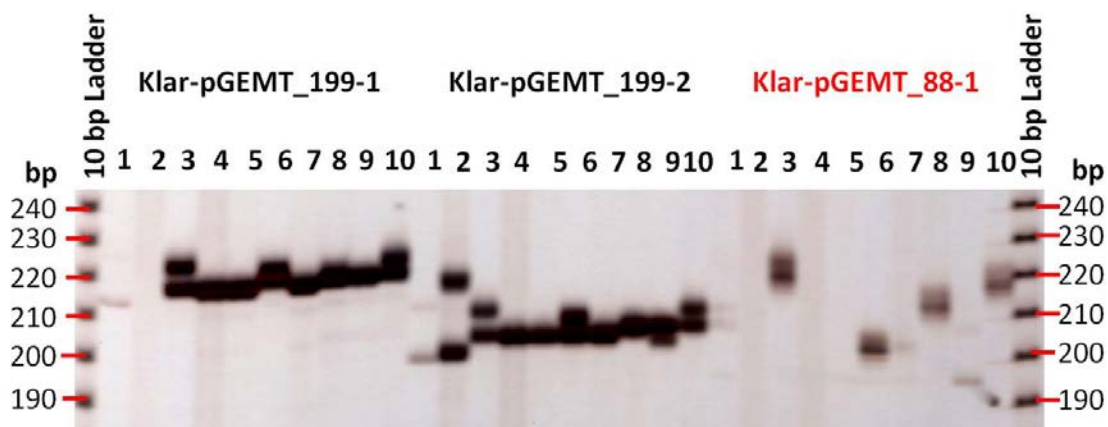
ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_221 38 และ 39



ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_14 157 และ 159



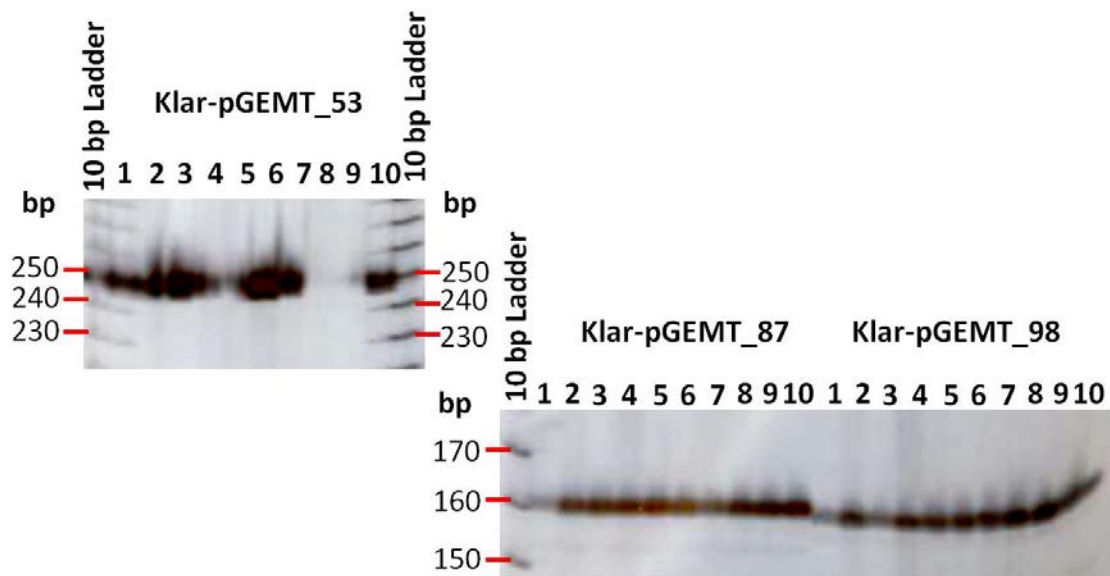
ภาพที่ 10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_213 216 และ 219



ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_199-1 และ 199-2



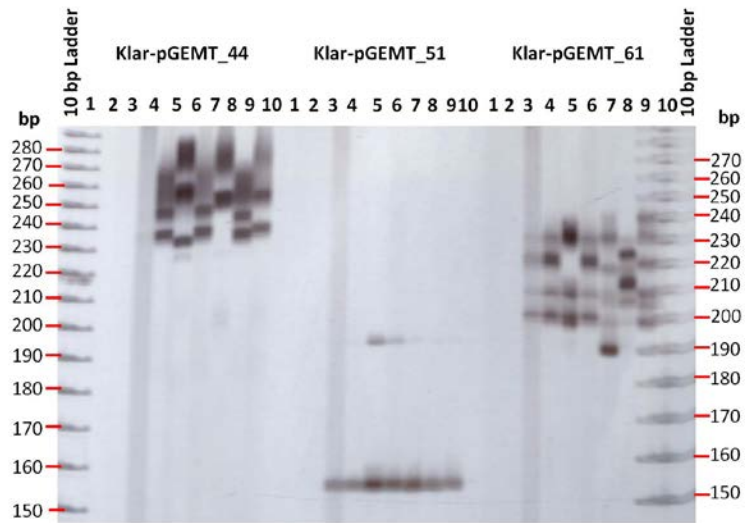
ภาพที่ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_43 47 และ 48



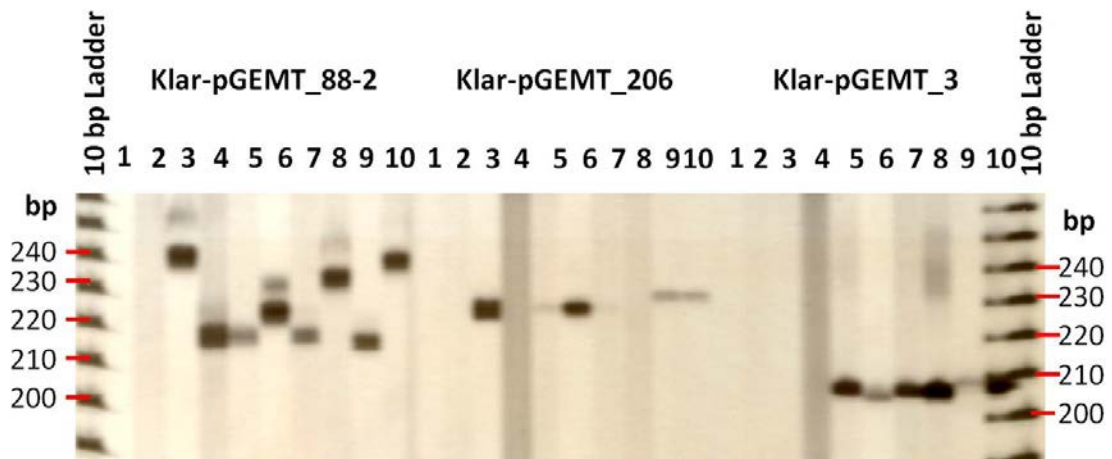
ภาพที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราศี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_53 87 และ 98



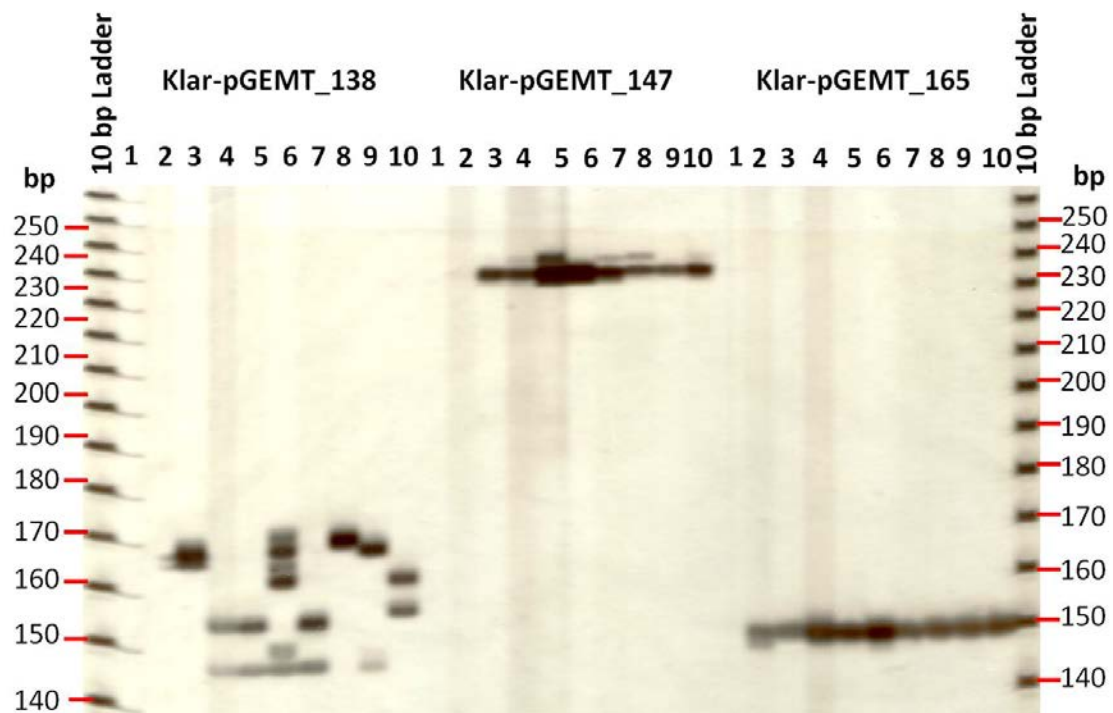
ภาพที่ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราศี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_172 178 และ 185



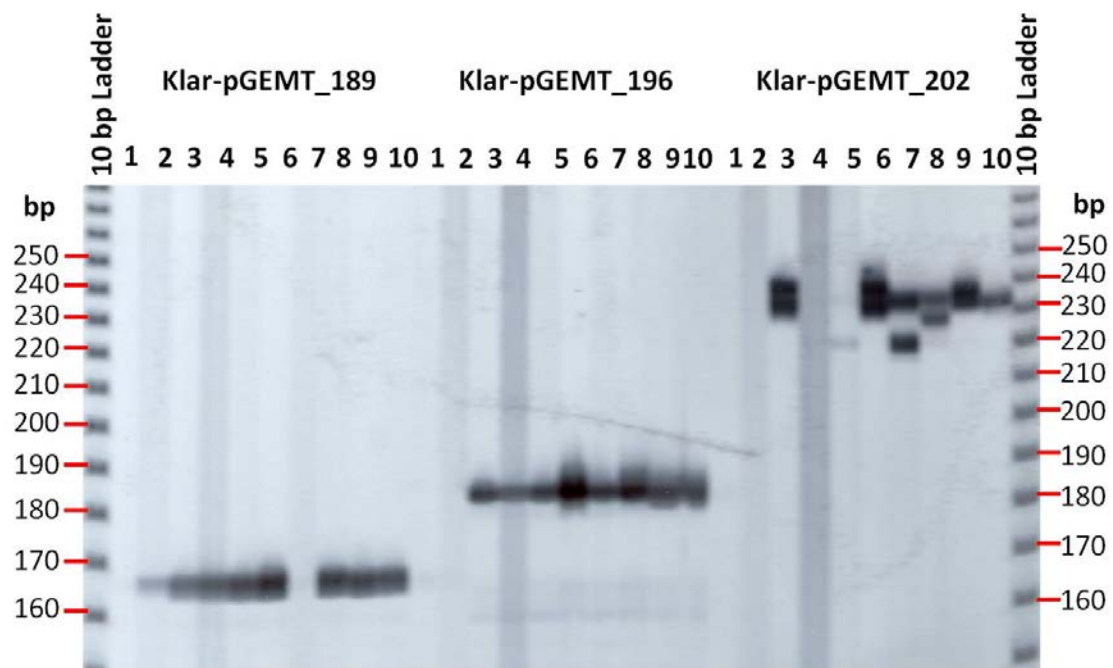
ภาพที่ 15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_44 51 และ 61



ภาพที่ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_88-2 206 และ 3



ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_138 147 และ 165



ภาพที่ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเปราะราสี ที่ได้จากไพรเมอร์ Klar-pGEMT_189 196 และ 202

จากภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ สามารถแบ่งกลุ่มไพรเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่มคือ

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้, จำนวนอัลลิล, ขนาดอัลลิล, จำนวนจีโนไทป์ และค่า polymorphic information content (PIC) ที่ได้ จากการตรวจสอบในเปราะราสี (*Kaempferia larsenii* Sirirugsa) จำนวน 10 ตัวอย่าง

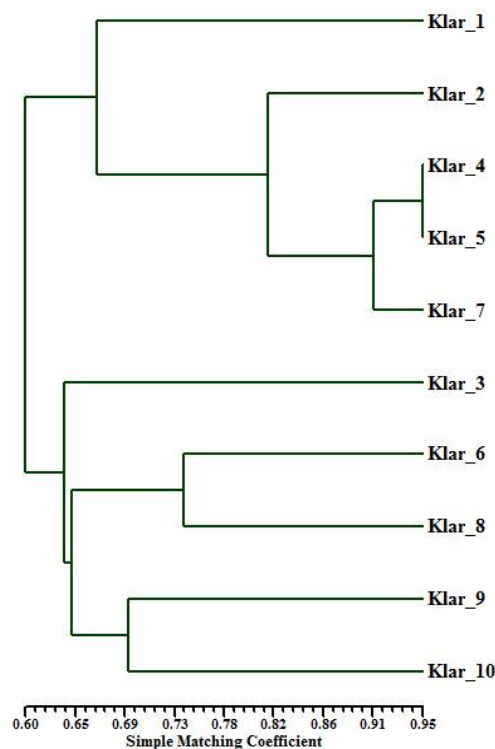
Locus	Sequence 5'→3'	No. of alleles	Allele size range (bp)	No. of genotype	PIC
Klar-pGEMT-115	F: CGACAACCTAAGTGGCTGTGC R: CCTCTGTGGGTACTCTGCAA	2	200-240	3	0.48
Klar-pGEMT-128	F: CAATCAAGCTCACGGTGGTA R: GCAACAGGTGATTACGCTCA	2	210-220	2	0.35
Klar-pGEMT-133	F: GACGTCCTCTTCTTGCCATC R: TTCTCTTCGCACAATTTCCA	2	250-260	2	0.50
Klar-pGEMT-148	F: AACAGTCAACCCACCACTTCT R: CAGGGCACTCAAGTTATCCAA	2	210-220	2	0.42
Klar-pGEMT-186	F: GGCATAAATCTACTCATGGCATC R: CATGATGGGAGCAAGAGGTT	3	180-250	2	0.50
Klar-pGEMT-198	F: CTCTTCGCTGCCCTTACAAC R: TCAACGCCGAGATTACACTG	3	230-240	2	0.18
Klar-pGEMT-143	F: TGTCCAATGAAAGCGATTGA R: GGCACCTCATGAAGGATTGT	6	210-240	6	0.79
Klar-pGEMT-144	F: CCTGGGTGATGTTTCGAGAT R: CGTGCTGGGAGTAAATCCTG	5	210-250	5	0.74
Klar-pGEMT-153	F: AACCAAGGCTCAAGAAAGCA R: TGCGGGATGCAATATGTAGA	6	200-250	6	0.78
Klar-pGEMT-164	F: CAGCGCTGACTCCCAGTTAC R: CACTGCATCACCTTCCTTCA	6	190-230	5	0.72
Klar-pGEMT-177	F: CCAAACCTCGAGTGTCATGGA R: GCTGAAAGGTCTGCTGGTCT	9	170-230	7	0.81
Klar-pGEMT-199-1	F:CCGTATGGAATTATAGGTTTAAGCA R: GAGACATAGAAGATTGCCATGC	5	210-230	5	0.74
Klar-pGEMT-199-2	F: GGTTTAAGCACTACAAGAGATGC R: GAGACATAGAAGATTGCCATGC	5	200-220	7	0.82
Klar-pGEMT-43	F: ATAGCGTTGATCTCCCGAAC R: AGCCTAAATACCCAGCCACA	2	180-190	2	0.42

Locus	Sequence 5'→3'	No. of alleles	Allele size range (bp)	No. of genotype	PIC
Klar-pGEMT-47	F: ATAGCGTTGATCTCCCGAAC R: AGCCTAAATACCCAGCCACA	2	180-190	2	0.42
Klar-pGEMT-138	F: GGCGAAGAAAGGAGTGAGTG R: AGTGGTGCCAAGGAGATTTG	9	140-170	6	0.78
Klar-pGEMT-147	F: CCAACAAAGCGTTAGCCACT R: CAGCTCGTCATTGGTTGAAA	3	238-242	4	0.72
Klar-pGEMT-185	F: ACGGCCAATTCATAAGCAAA R: GGGTTGCTGCTACCGTTTTA	3	160-170	2	0.22
Klar-pGEMT-202	F: CAAATCCGCTTGAAC TTGCT R: AAGTGGAATGAGCGATGG	4	220-240	6	0.82
Klar-pGEMT-44	F: CCCCATCCACACATCTCTCT R: AAGATCCTCCCACGATACCC	9	220-290	4	0.67
Klar-pGEMT-61	F: AGGTTCCAAGGAGGCTTAGG R: CGGAATCAAAATCAGCAACC	10	190-240	5	0.73
Klar-pGEMT-88-2	F: AAGCCCAGCATCCCTTAGTT R: TTTGGCATAATTTCTACCTAGCATC	6	210-250	5	0.69
Klar-pGEMT-3	F: TCCCAAACCAAGTTCCTCAC R: ATCCCCAGTGTCTGATCTCG	3	200-210	3	0.50
Klar-pGEMT-206	F: TGAGACCAATTAAGGGGTGAA R: AGAGGAGGGCGAATGACAGT	2	220-230	2	0.48
Total		109		95	
Average		4.54		3.96	

จากข้อมูลความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลต์ จำนวนทั้งสิ้น 10 เครื่องหมาย พบจำนวนอัลลีลทั้งหมด 109 อัลลีล (เฉลี่ย 4.54 อัลลีลต่อไพรเมอร์) และได้จำนวนรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างทั้งหมด 95 จีโนไทป์ (เฉลี่ย 3.96 จีโนไทป์ต่อไพรเมอร์) (ตารางที่ 1) จากตาราง พบว่าเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างสูงสุดในประชากรกลุ่มนี้ได้แก่ Klar-pGEMT-177 และ Klar-pGEMT-199-2 ที่ให้ความแตกต่างของจีโนไทป์ถึง 7 จีโนไทป์ มีค่า PIC เท่ากับ 0.81 และ 0.82 ตามลำดับ ซึ่งค่า PIC เป็นค่าที่บอกประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของแต่ละไพรเมอร์ นั่นคือไพรเมอร์ที่ให้ค่า PIC สูง จะแยกความแตกต่างของจีโนไทป์ได้มาก ส่วนไพรเมอร์ที่มีค่า PIC ต่ำ จะแยกความแตกต่างของจีโนไทป์ได้น้อย

การจัดกลุ่มจากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลต์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างทุกจีโนไทป์โดยเปรียบเทียบทีละคู่ อยู่ระหว่าง 0.60-0.95 (ภาพที่ 1) โดยมีค่าประสิทธิภาพการจัดกลุ่ม (cophenetic value) เท่ากับ 0.877 จากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ สามารถแบ่งกลุ่มเปราะราศีได้เป็น 2 กลุ่ม ที่ระดับความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.63

การวิเคราะห์ Unweighted pair-group arithmetic average (UPGMA) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้น แสดงให้เห็นว่าเปราะราศี มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรไม่มากนัก (ภาพที่ 19 และ ตารางที่ 2) เนื่องด้วยเป็นพืชที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มพืชถิ่นเดียว พบเฉพาะในพื้นที่แถบจังหวัดอุบลราชธานีและมุกดาหาร (Sirirugsa, 1989)



ภาพที่ 19 แผนภาพแสดงการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอในประชากรเปราะราศีจำนวน 10 ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี simple matching ของแต่ละคู่

	Klar_1	Klar_2	Klar_3	Klar_4	Klar_5	Klar_6	Klar_7	Klar_8	Klar_9	Klar_10
Klar_1	1.000									
Klar_2	0.688	1.000								
Klar_3	0.622	0.617	1.000							
Klar_4	0.676	0.830	0.600	1.000						
Klar_5	0.676	0.830	0.614	0.952	1.000					
Klar_6	0.622	0.574	0.663	0.643	0.621	1.000				
Klar_7	0.622	0.787	0.556	0.905	0.914	0.613	1.000			
Klar_8	0.568	0.660	0.605	0.714	0.677	0.742	0.677	1.000		
Klar_9	0.405	0.489	0.614	0.595	0.579	0.621	0.591	0.634	1.000	
Klar_10	0.514	0.574	0.663	0.650	0.626	0.604	0.640	0.708	0.692	1.000

บรรณานุกรม

สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช.

2557. สารานุกรมพืชในประเทศไทย (The Encyclopedia of Plants in Thailand) แหล่งที่มา
<http://web3.dnp.go.th/botany/detail.aspx?words=....>, 22 สิงหาคม 2557.

Sirirugsa, P. 1989. The genus *Kaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand. **Nordic Journal of Botany** 9:257-259.



ผู้รับผิดชอบและหน่วยงานของโครงการที่ 3

หัวหน้าโครงการ	รศ.ดร. กนกพร ไตรวิทยากร
หน่วยงานหลัก	สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล
	ศาลายา นครปฐม 73170
โทรศัพท์	02-441-9003-7 ต่อ 1368
โทรสาร	02-441-9906
E-mail	kanokporn.tri@mahidol.ac.th
สัดส่วนการทำวิจัย	25%

คณะนักวิจัย

1) ดร. ศุภจิต สระเพชร

หน่วยงานหลัก	สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล
	ศาลายา นครปฐม 73170
โทรศัพท์	02-441-9003-7 ต่อ 1368
โทรสาร	02-441-9906
E-mail	supajit.sra@mahidol.ac.th
สัดส่วนการทำวิจัย	15%

2) ดร. สุขุมาล หวานแก้ว

หน่วยงานหลัก	สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล
	ศาลายา นครปฐม 73170
โทรศัพท์	02-441-9003-7 ต่อ 1368
โทรสาร	02-441-9906
E-mail	sukhuman.wha@mahidol.ac.th
สัดส่วนการทำวิจัย	15%

3) ดร. พนิดา คงสวัสดิ์วรกุล

หน่วยงานหลัก	ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
	ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400
โทรศัพท์	02-201-5232
โทรสาร	02-354-7172
E-mail	panida.kon@mahidol.ac.th
สัดส่วนการทำวิจัย	15%



4) ดร. อัญชีรา วิบูลย์จันทร์

หน่วยงานหลัก ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400
โทรศัพท์ 02-201-5232
โทรสาร 02-354-7172
E-mail unchera.vib@mahidol.ac.th
สัดส่วนการทำวิจัย 15%

5) ดร. ปิยรัชฎ์ ปริญาพงษ์ เจริญทรัพย์

หน่วยงานหลัก โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)
สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต ถ.ราชวิถี เขตดุสิต กทม. 10303
โทรศัพท์ 02-282-1850
โทรสาร 02-282-0665
E-mail piyarat111@yahoo.co.uk
สัดส่วนการทำวิจัย 15%