2. การเตรียมดีเอ็นเอและ การตรวจสอบคุณภาพ

ในการสกัดดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรพบว่ามีเมือกลื่น ๆ อยู่เป็นจำนวนมาก จึงสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่า $OD_{260/280}$ อยู่ระหว่าง 1.7-1.8 และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ขึ้นกับอายุของใบ พบว่าใบอ่อนสามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณมากกว่าใบแก่ และมีคุณภาพดีกว่าใบแก่

3. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3.1 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจคุณภาพแล้วจำนวน 25 ตัวอย่าง มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Eco*RI และ *Mse* I แล้วเชื่อมต่อด้วย adapter 2 ชนิด และทำการคัดเลือกด้วยไพรเมอร์จาก 64 คู่ คัดเลือกไว้ 11 คู่คือ M-CAC / E-AAC, M-CTT / E-AGC, M-CAA / E-AAC, M-CTC / E-ACC M-CAC / E-AGG, M-CTT / E-ACA, M-CAT / E-AAC. M-CTC / E-AAC, M-CAC / E-ACG, M-CTT / E-AGG และ M-CTC / E-AGG พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 11 คู่นี้แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา โดยให้แถบดีเอ็นเอ 58 33 30 29 50 28 43 22 30 29 และ 28 แถบตามลำดับ (ภาพที่ 1-11) รวมทั้งหมด 380 แถบ คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอนเอมากที่สุดมี 1 คู่ไพรเมอร์ คือ M-CAC / E-AAC ให้แถบดีเอ็นจำนวน 58 แถบ คู่ไพรเมอรที่ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดมี 1 คู่ไพรเมอร์คือให้แถบดีเอ็นเอ M-CTC / E-AAC จำนวน 22 แถบ เฉลี่ยแล้วจะให้แถบดีเอ็นเอ 34.54 แถบต่อคู่ไพรเมอร์

ตารางที่ 2 คู่ไพรเมอร์ของเทคนิคเอเอฟแอลพีที่ใช้ในการทดสอบและไพรเมอร์ที่คัดเลือก

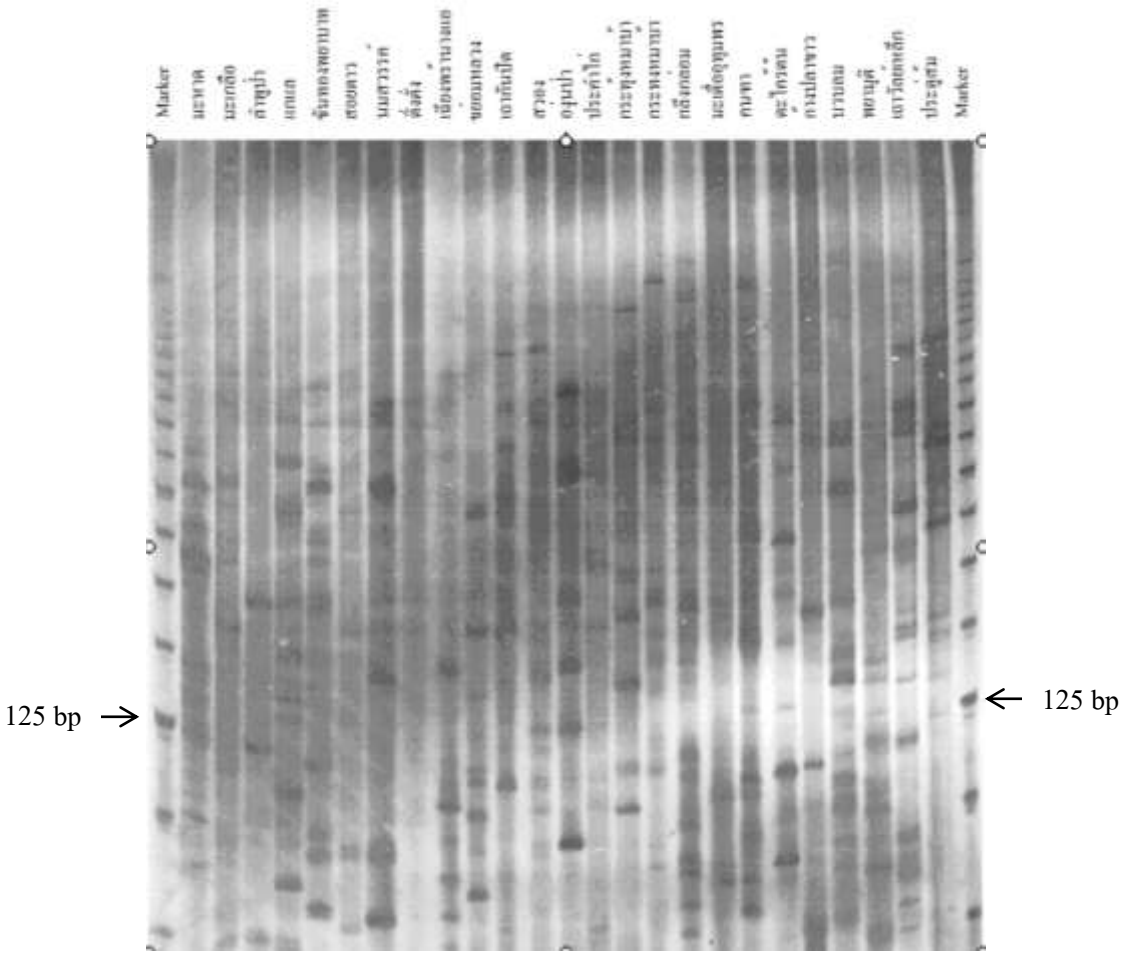
ไพรเมอร์	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	●	●	●	●	●	√	●	●
E-AAG	●	●	●	√	√	√	●	●
E-ACA	●	●	●	√	●	●	●	●
E-ACC	●	●	●	●	√	●	●	●
E-ACG	●	√	√	√	√	●	●	●
E-ACT	●	●	●	●	●	√	●	●
E-AGC	●	●	●	●	●	●	●	●
E-AGG	●	●	●	●	●	●	●	●

หมายเหตุ ● คู่ไพรเมอร์ที่ไม่คัดเลือก

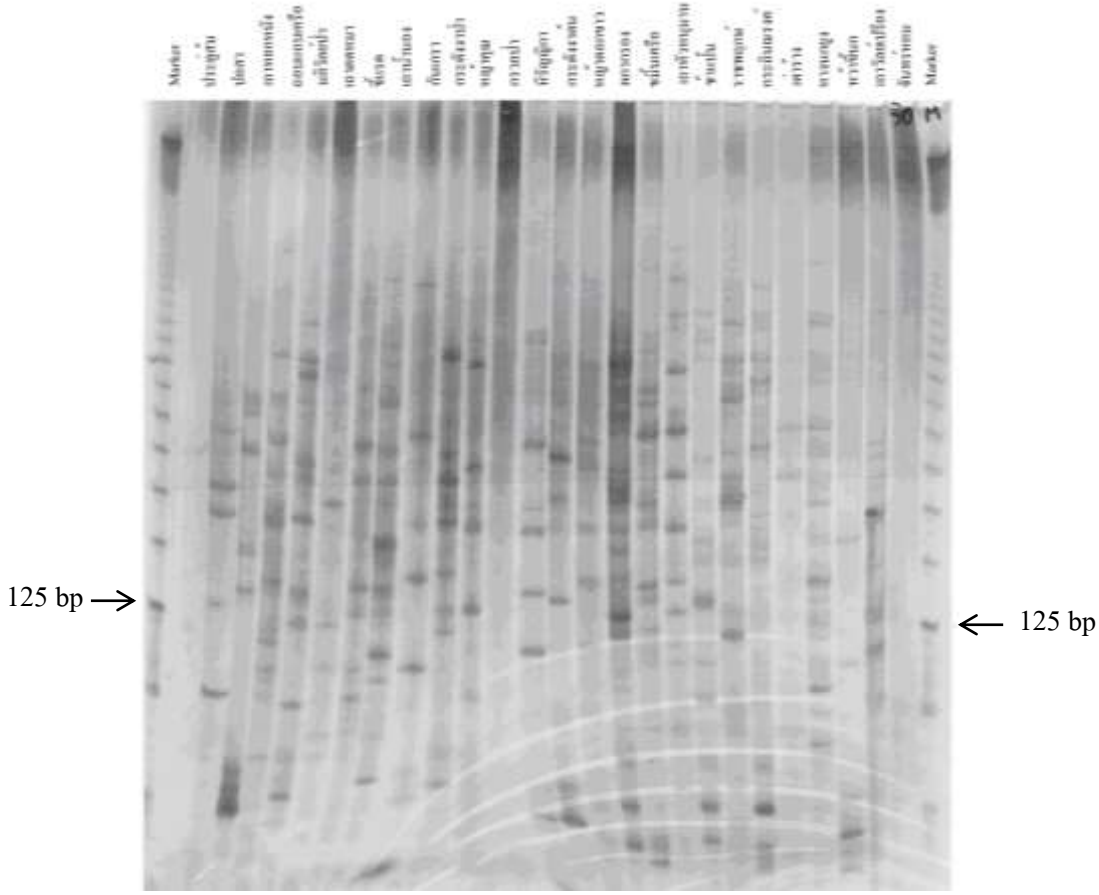
√ คู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือก

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

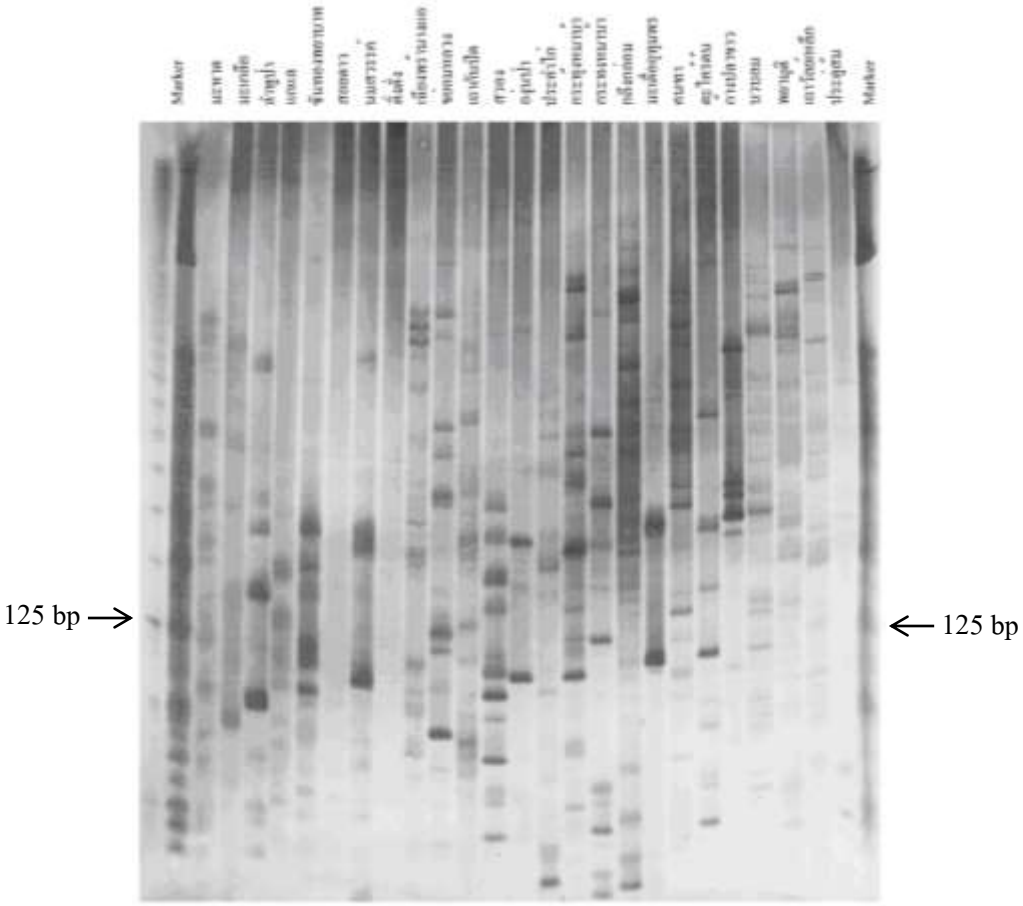
ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ		จำนวนแถบดีเอ็นเอ	โพลีมอร์ฟิซึม
	แตกต่าง	เหมือน	ทั้งหมด	(%)
M-CAC / E-AAC	58	-	58	100
M-CTT / E-AGC	33	-	33	100
M-CAA / E-AAC	30	-	30	100
M-CTC / E-ACC	29	-	29	100
M-CAC / E-AGG	50	-	50	100
M-CTT / E-ACA	28	-	28	100
M-CAT / E-AAC	43	-	43	100
M-CTC / E-AAC	22	-	22	100
M-CAC / E-ACG	30	-	30	100
M-CTT / E-AGG	29	-	29	100
M-CTC / E-AGG	28	-	28	100
ค่าเฉลี่ย			34.54	100



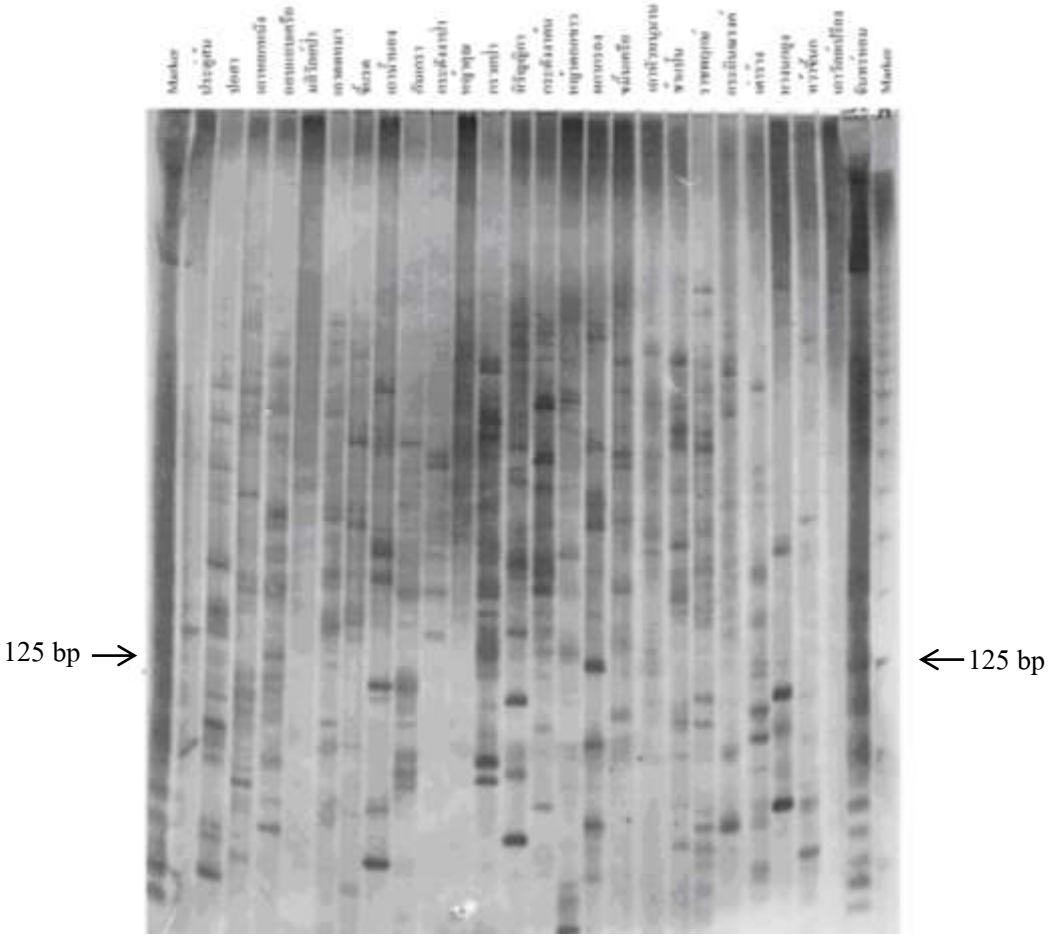
ภาพที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CAC / E-AAC และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



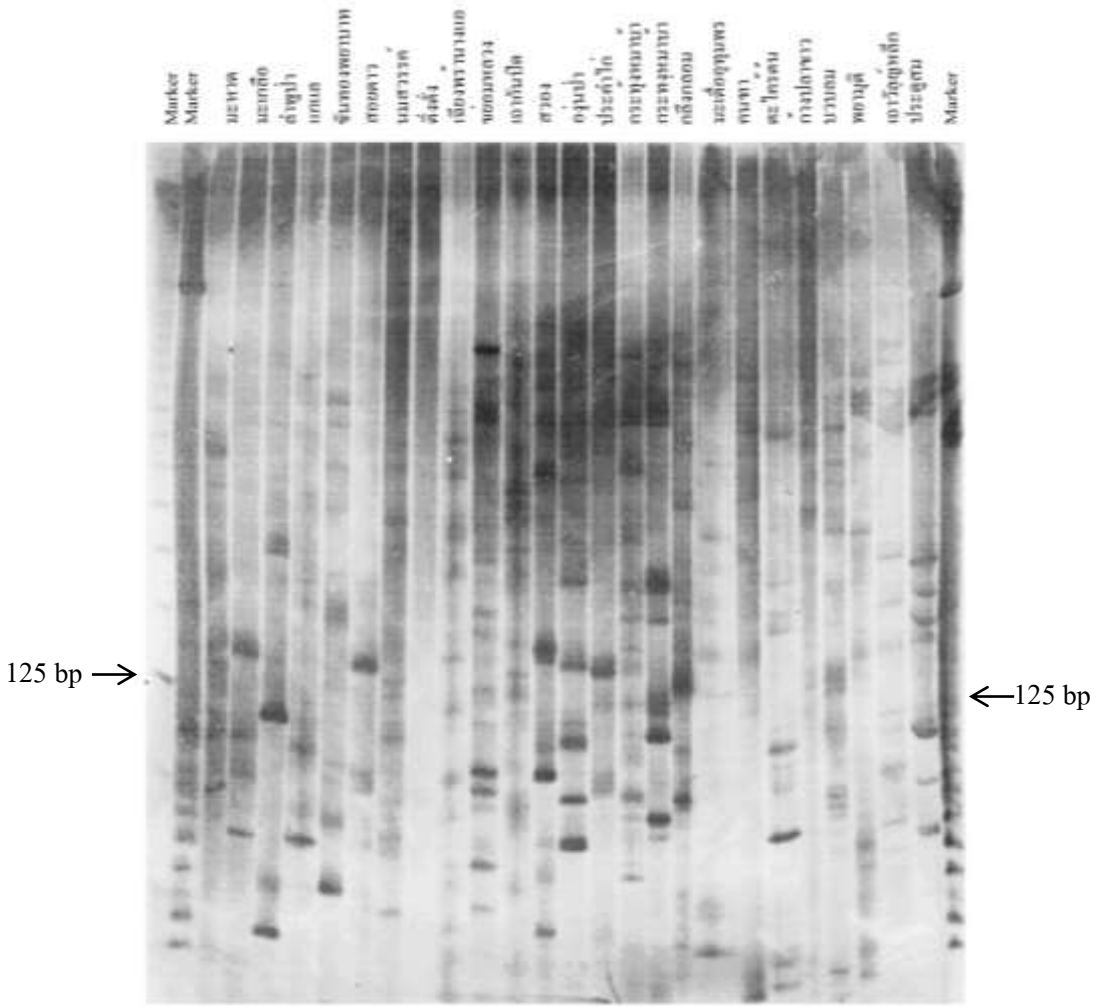
ภาพที่1 (ต่อ) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CAC / E-AA และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



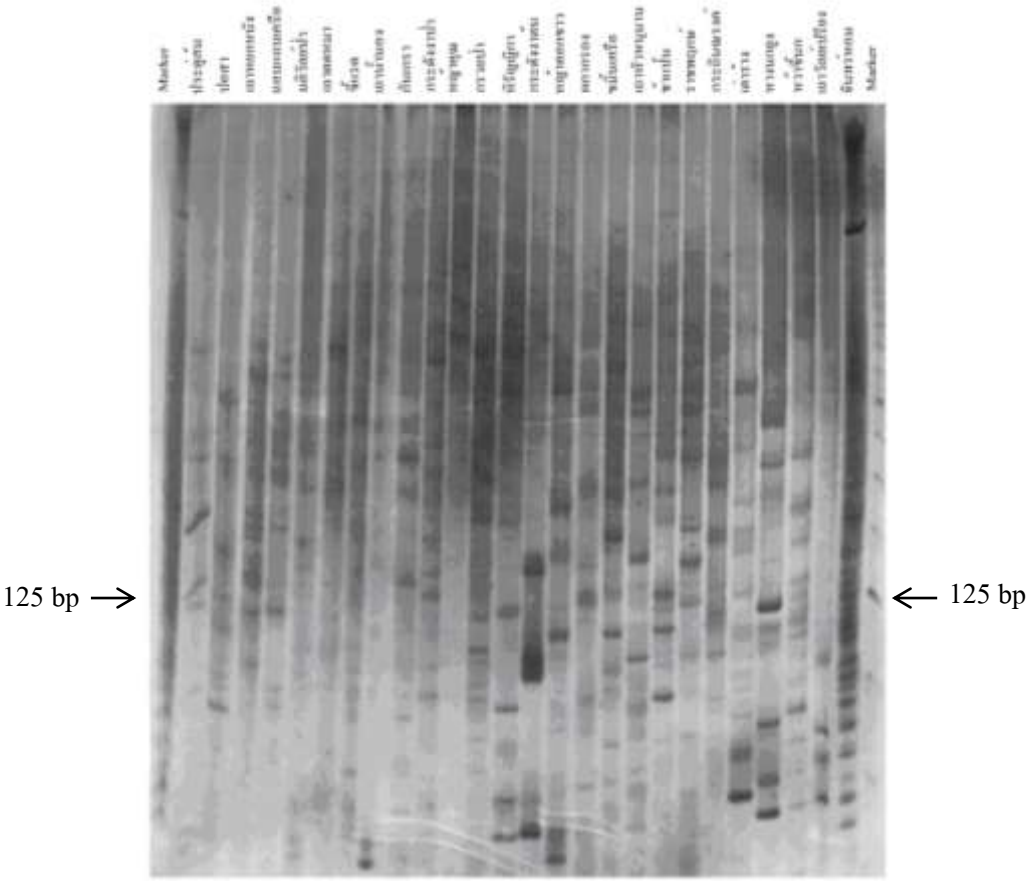
ภาพที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CTT / E-AGC และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



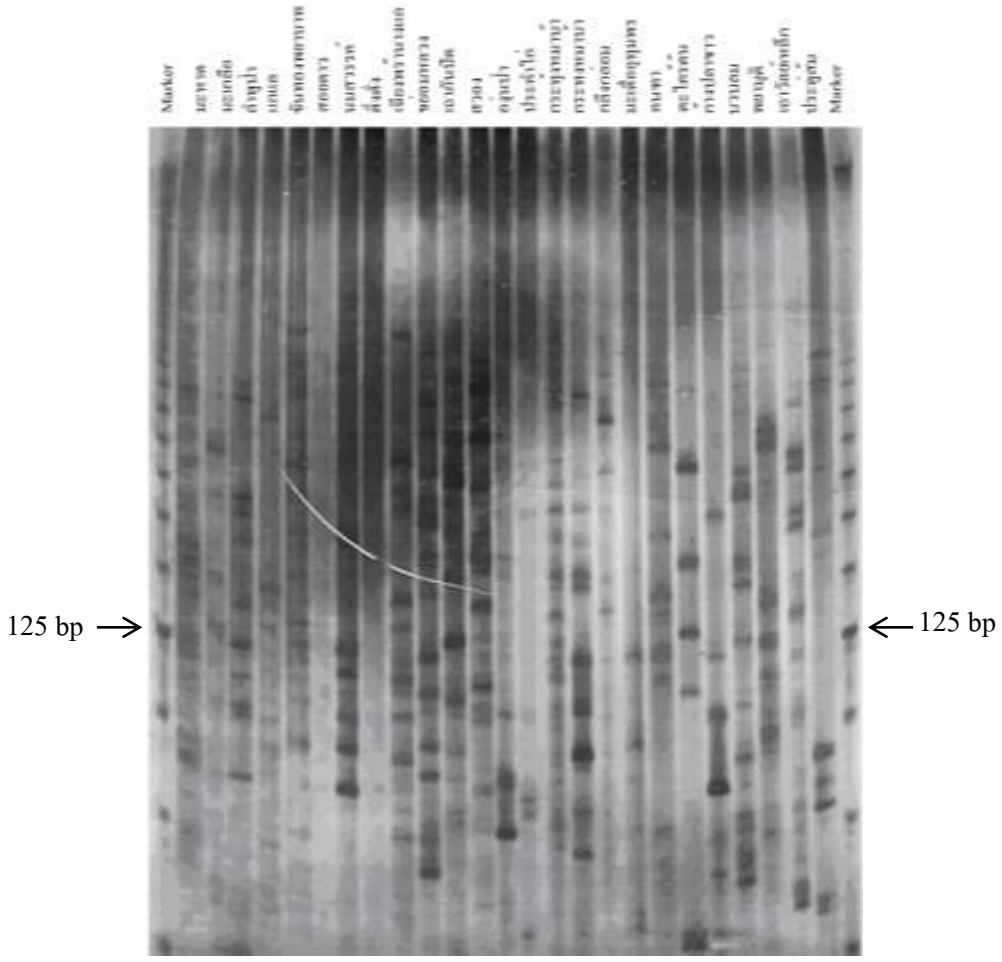
ภาพที่ 2 (ต่อ) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CTT / E- AGC และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



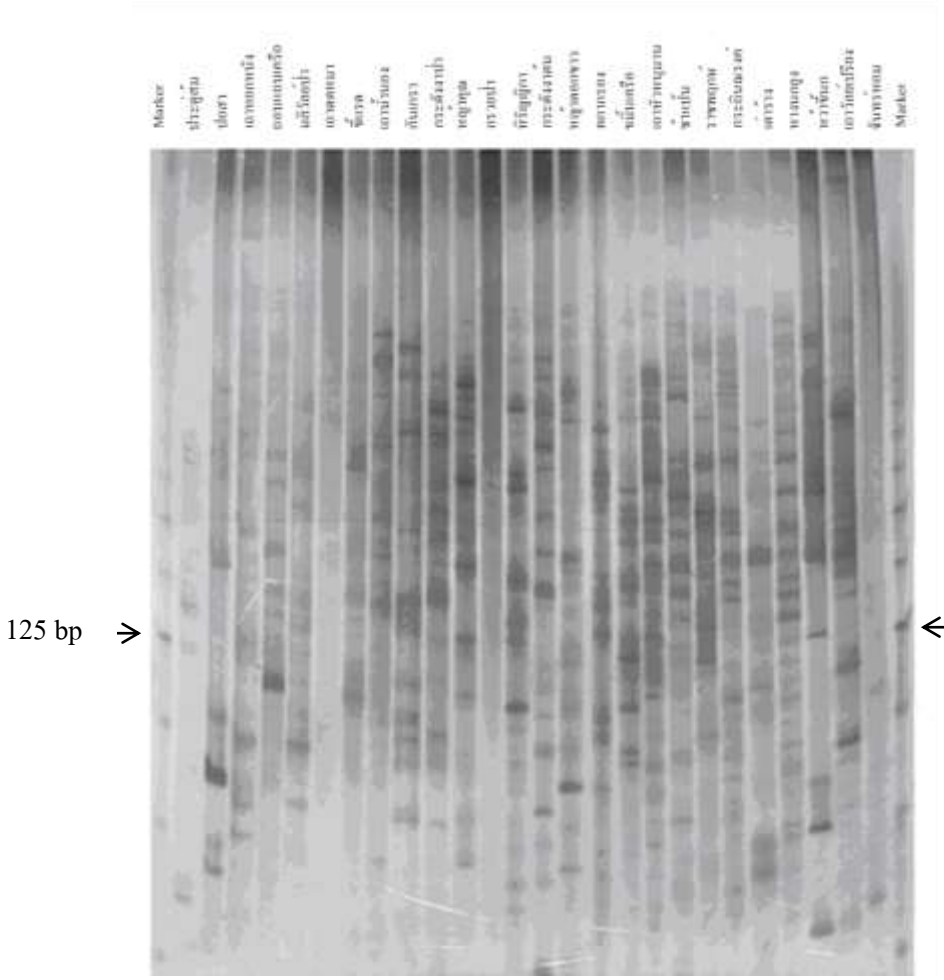
ภาพที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CAA / E-AAC และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



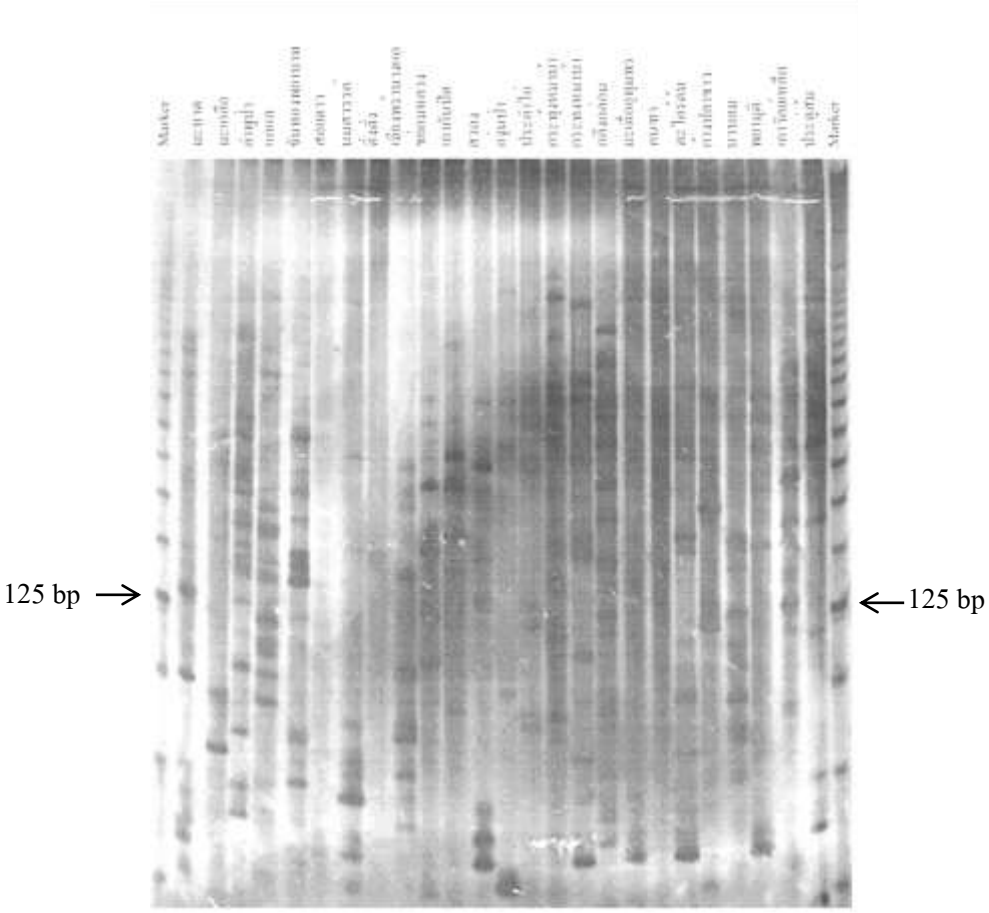
ภาพที่ 3 (ต่อ) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CAA / E- AAC และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



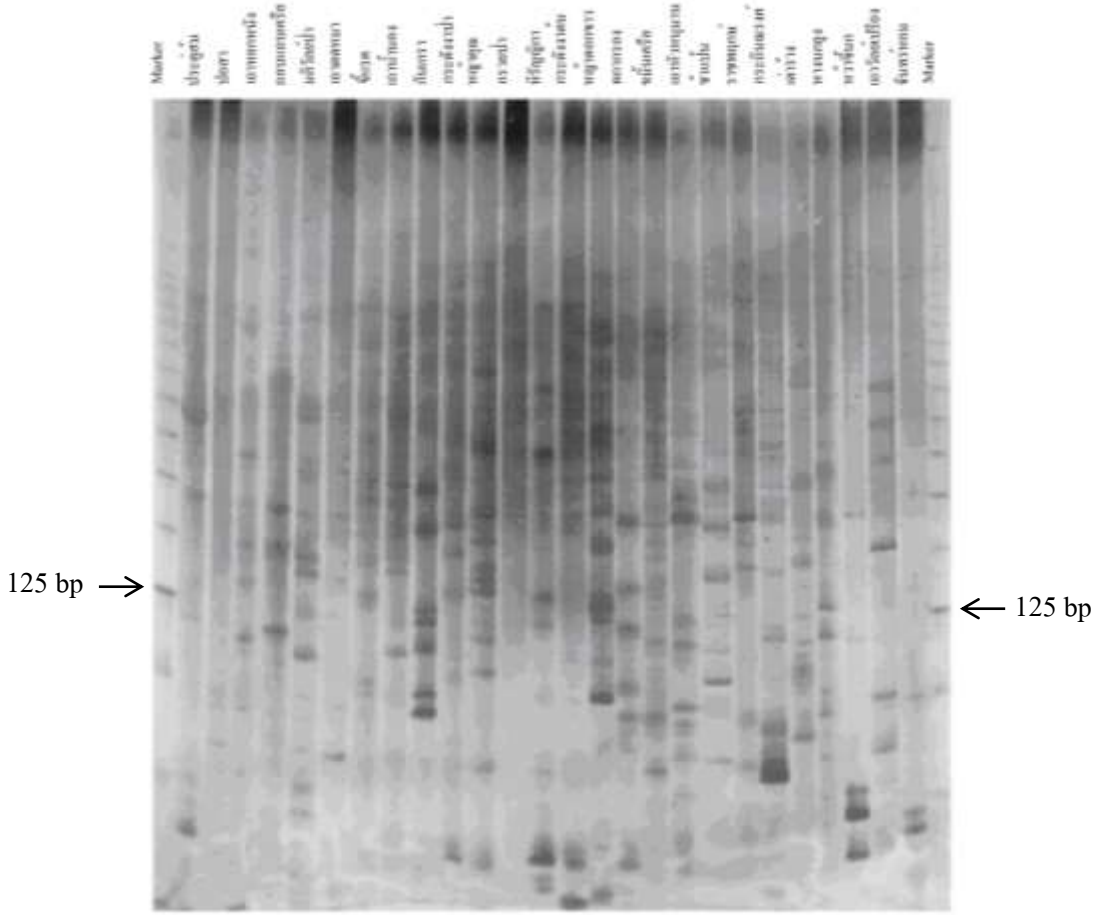
ภาพที่ 4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CTC / E-ACC และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



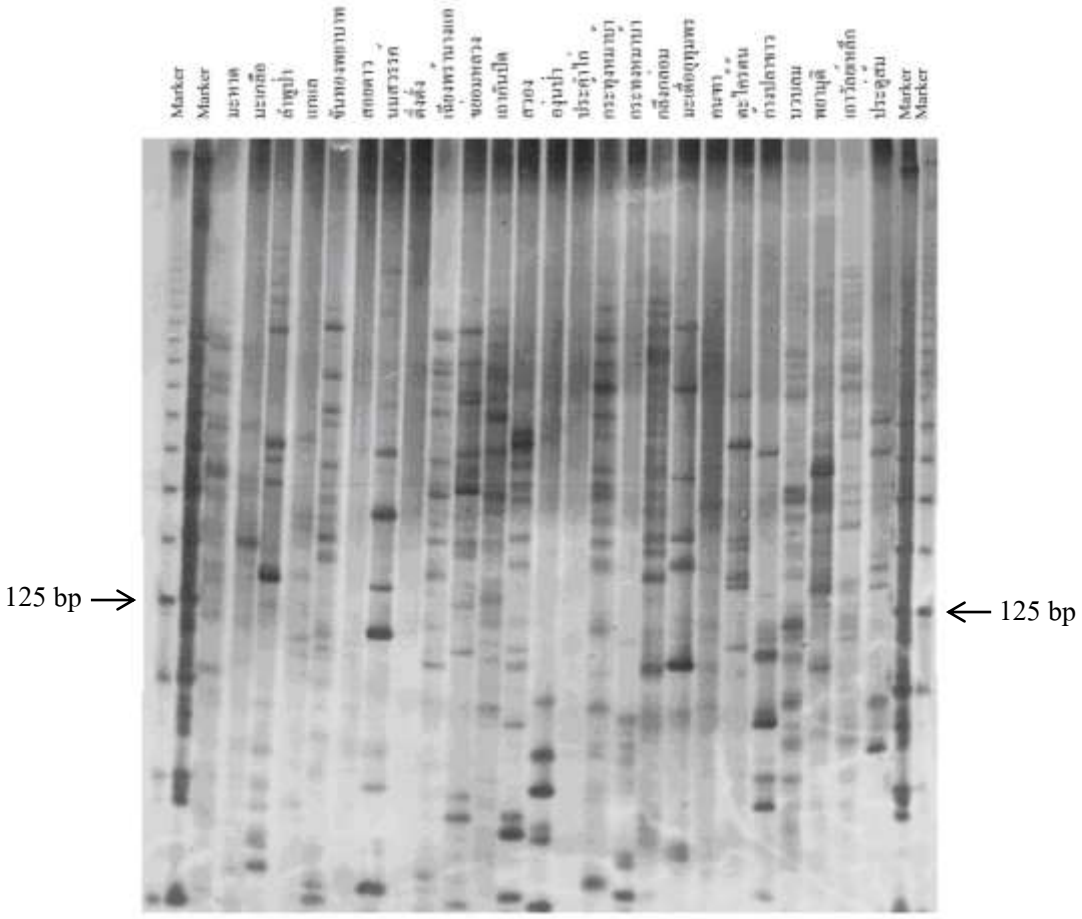
ภาพที่ 4 **(ต่อ)** ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CTC / E-ACC และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



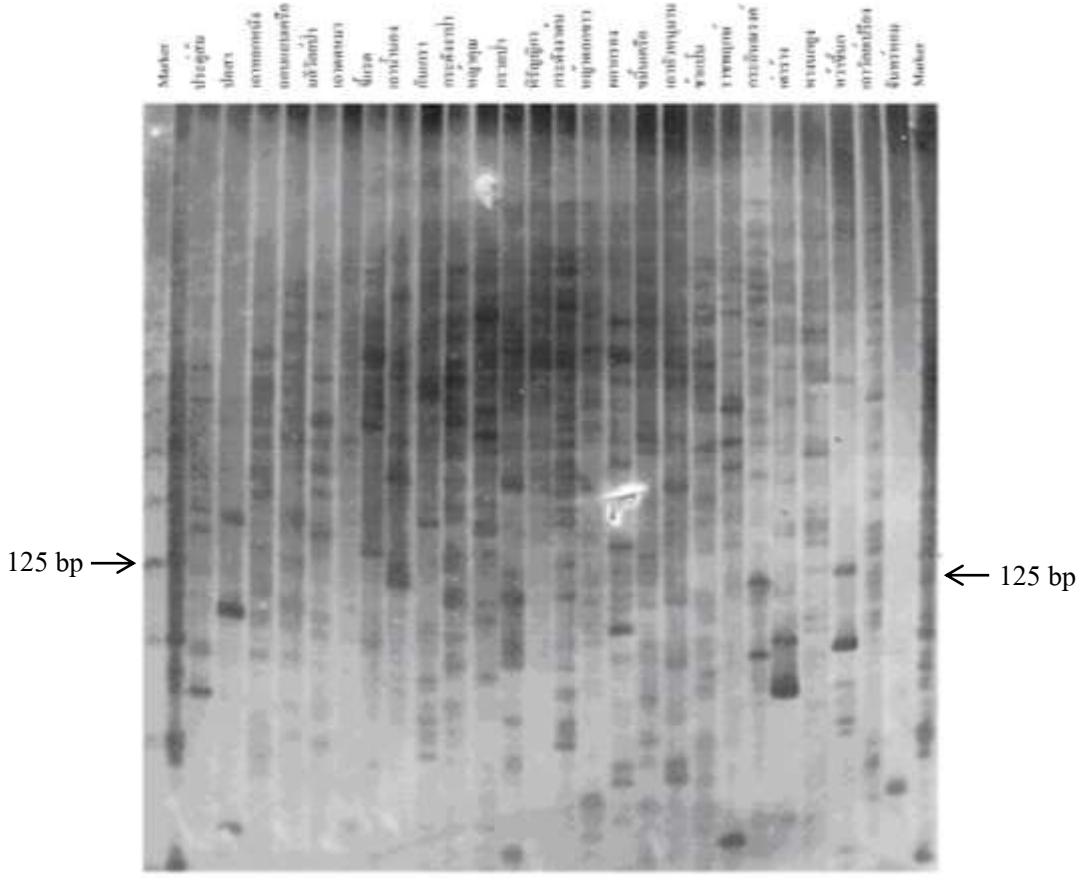
ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CAC / E-AGG และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



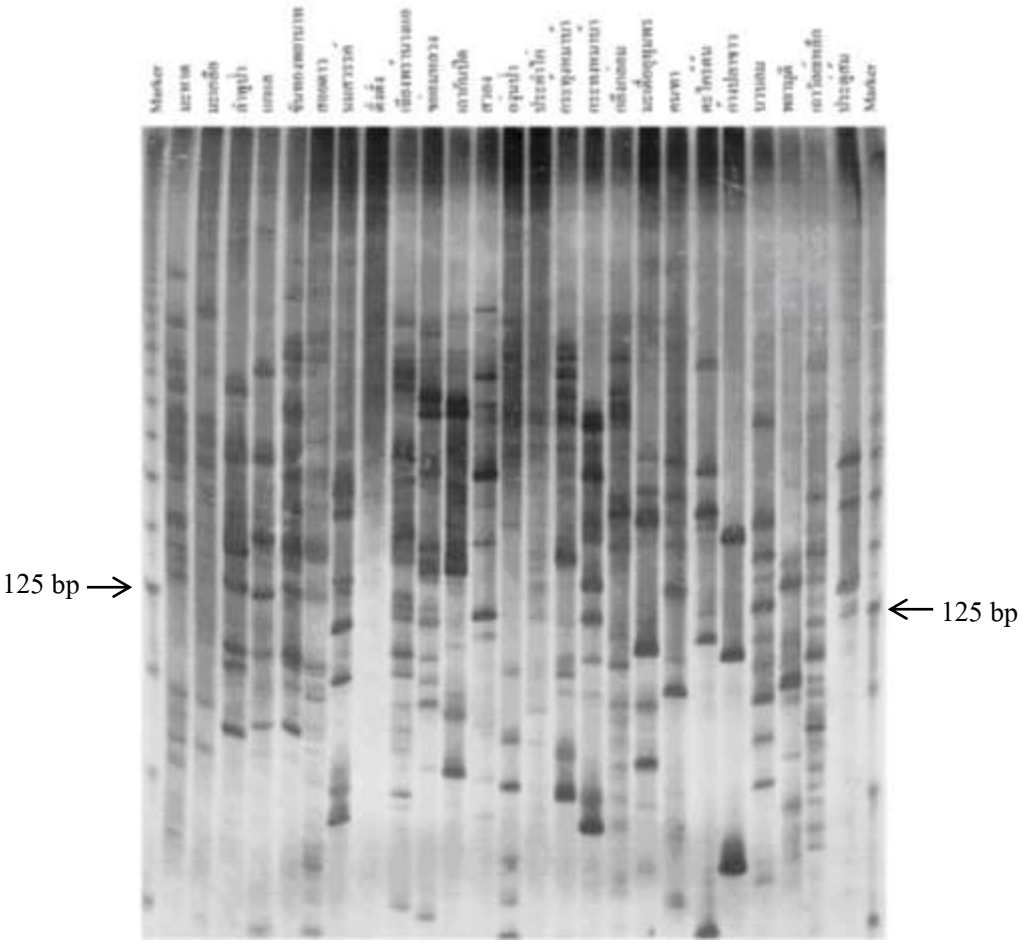
ภาพที่ 5 **(ต่อ)** ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CAC / E- AGG และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



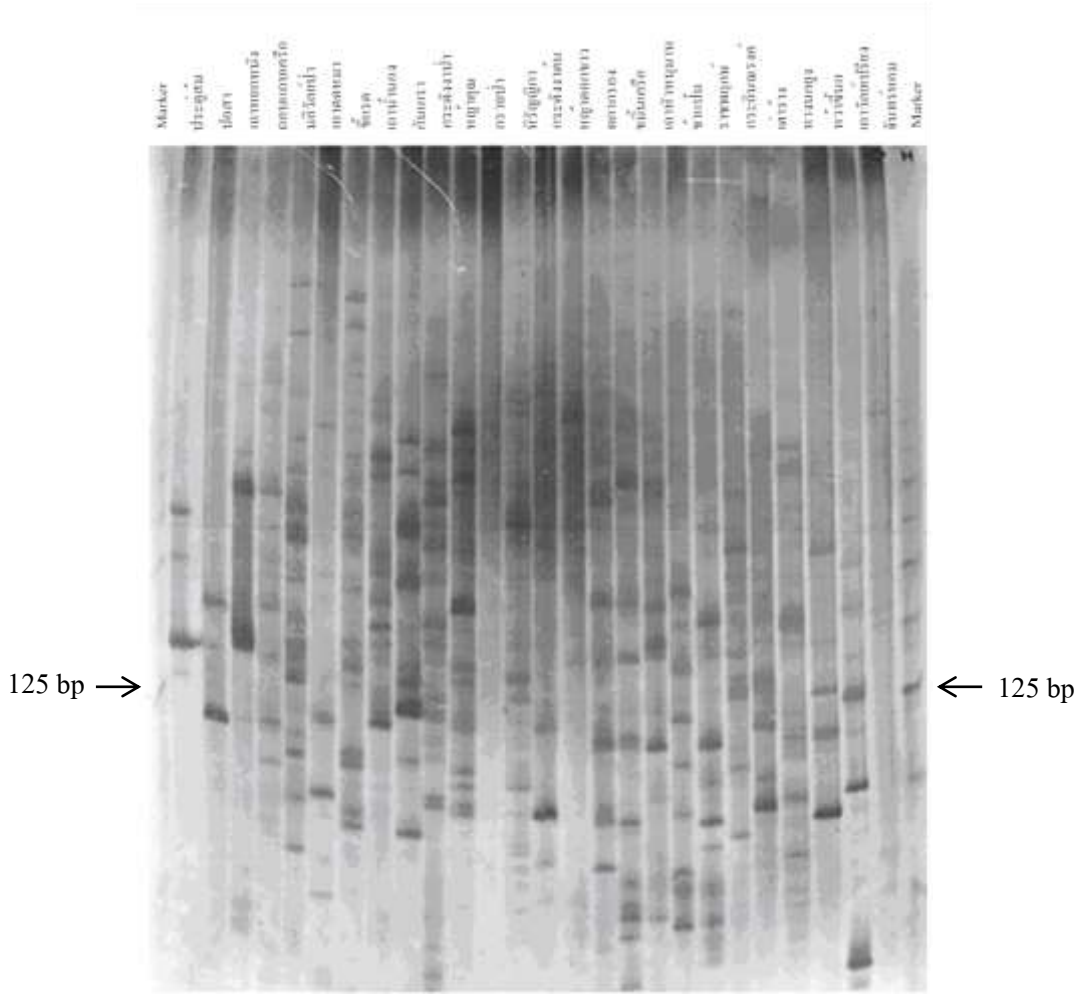
ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CTT / E-ACA และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



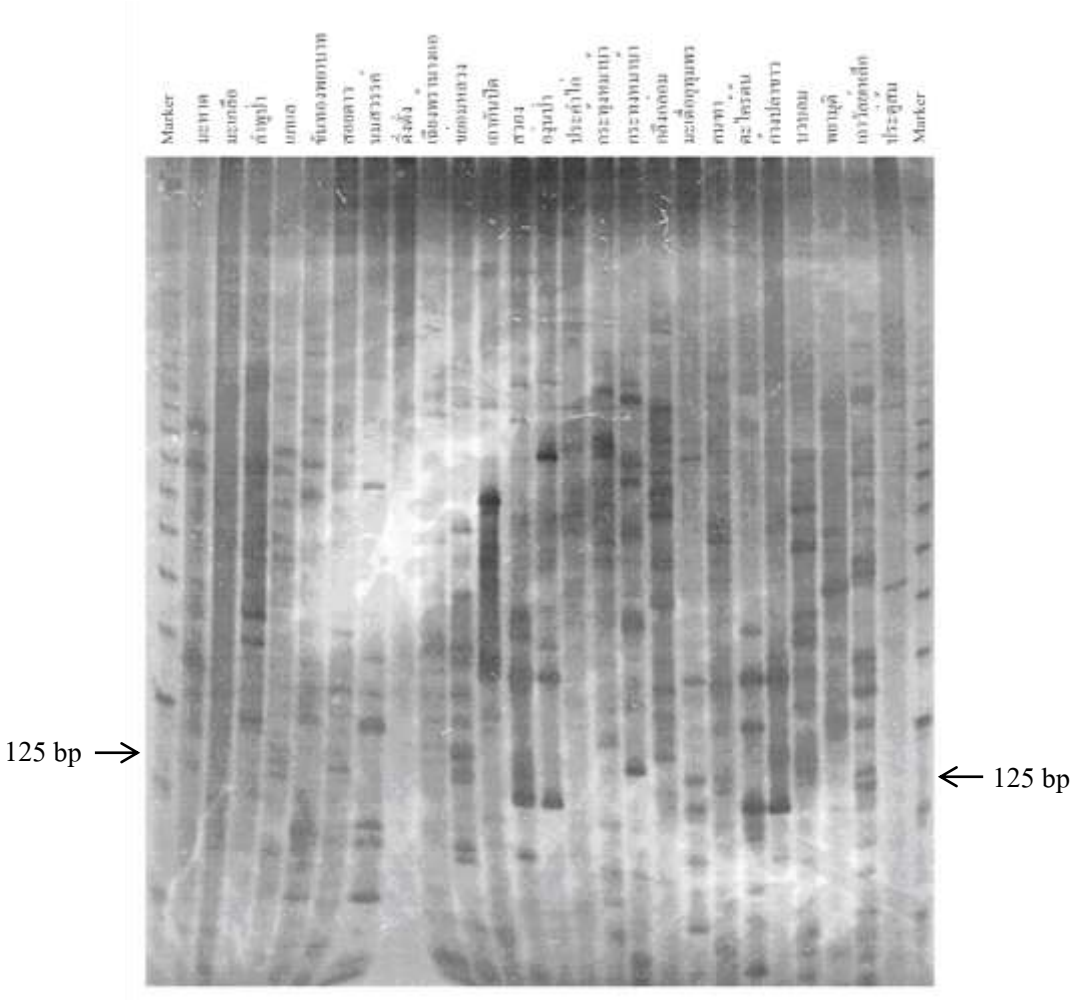
ภาพที่ 6 (ต่อ) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CTT / E-ACA และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



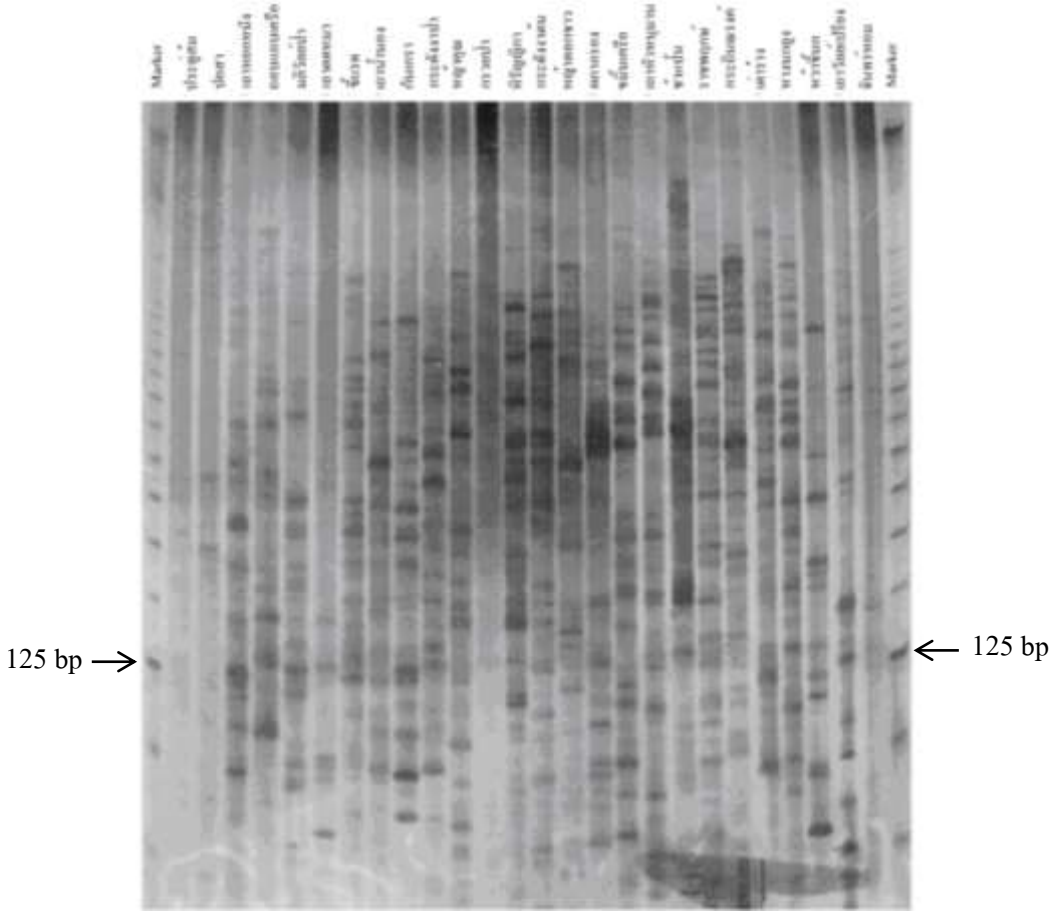
ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CAT / E-AAC และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



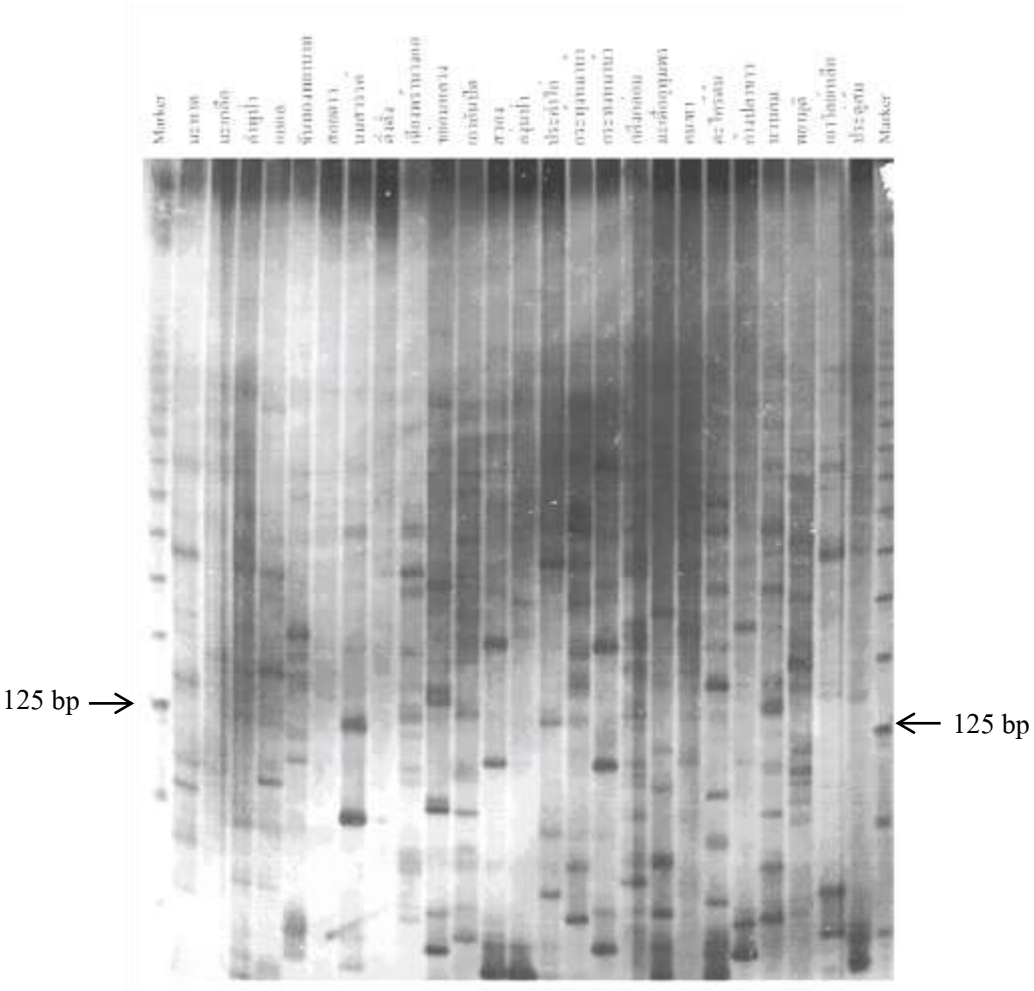
ภาพที่ 7 **(ต่อ)** ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CAT / E-AAC และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



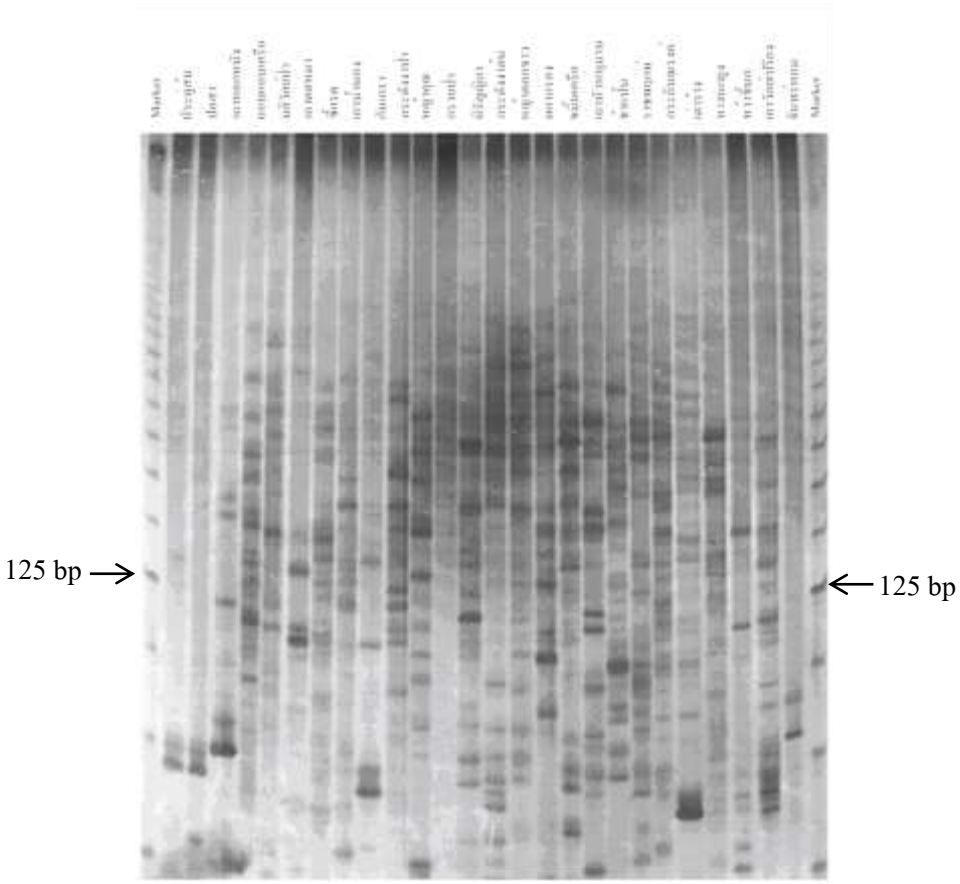
ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CTC / E-AAC และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



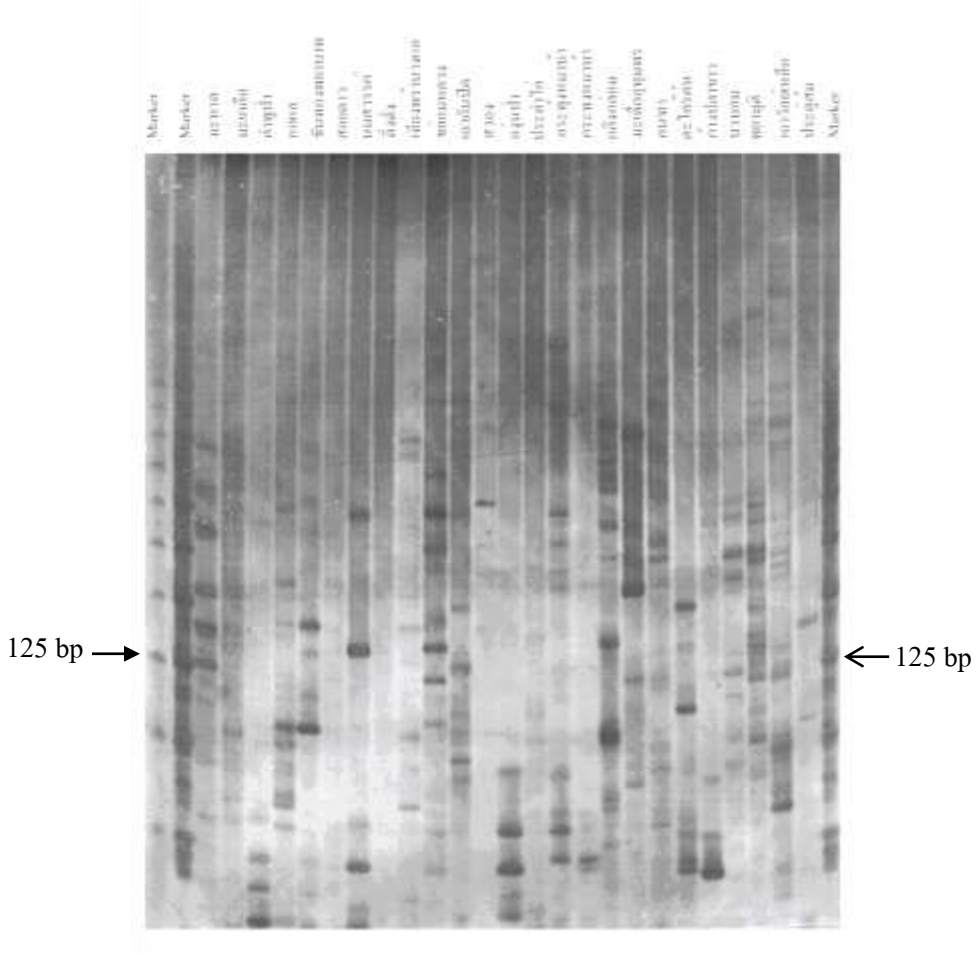
ภาพที่ 8 (ต่อ) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CTC / E-AAC และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



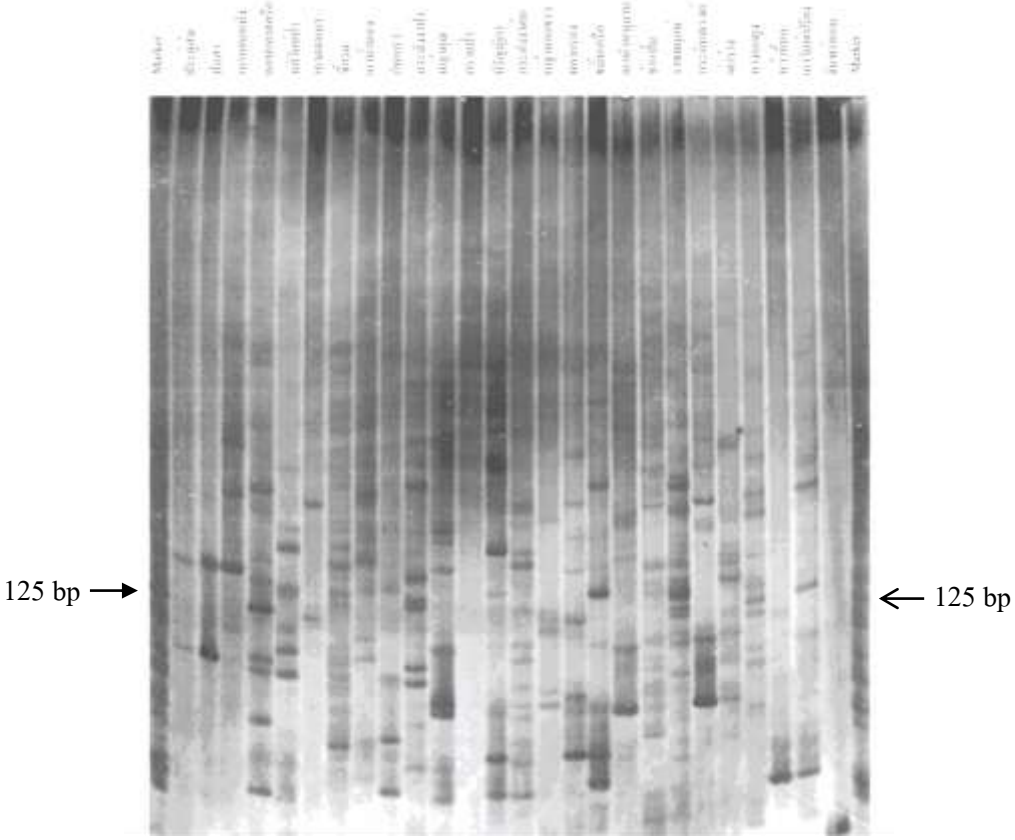
ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CAC / E-ACG และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



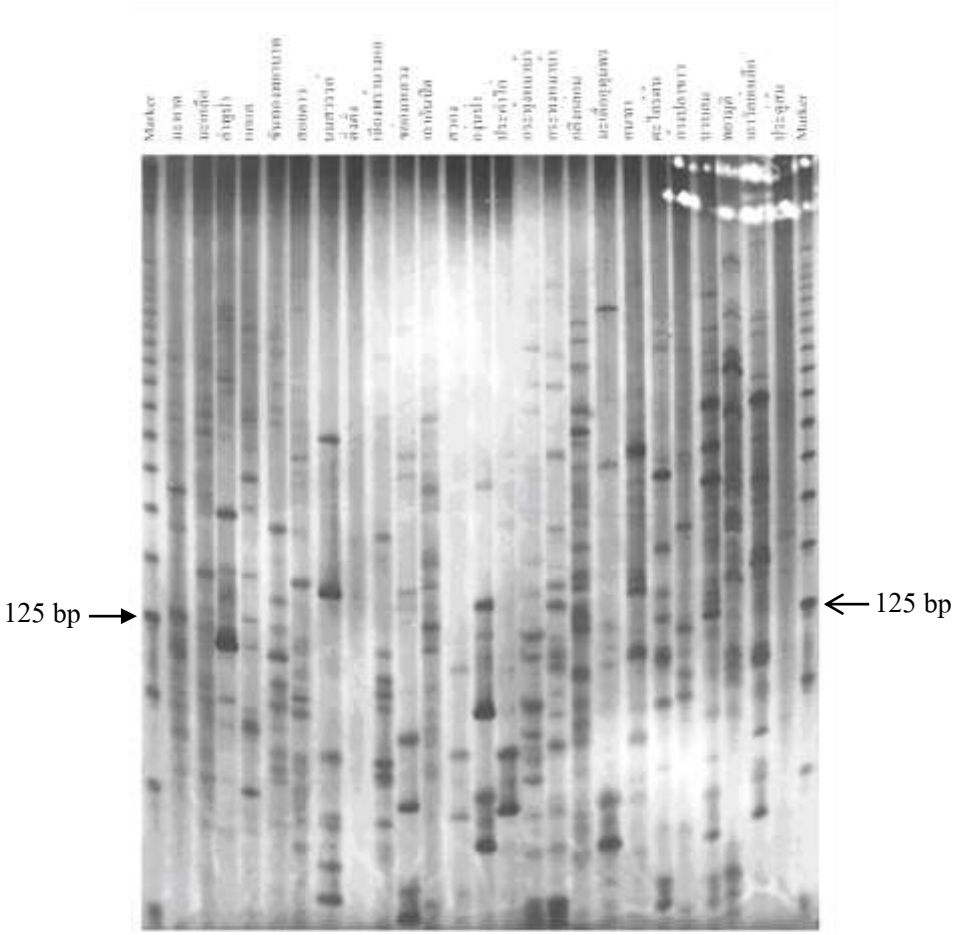
ภาพที่ 9 (ต่อ) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CAC / E-ACG และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



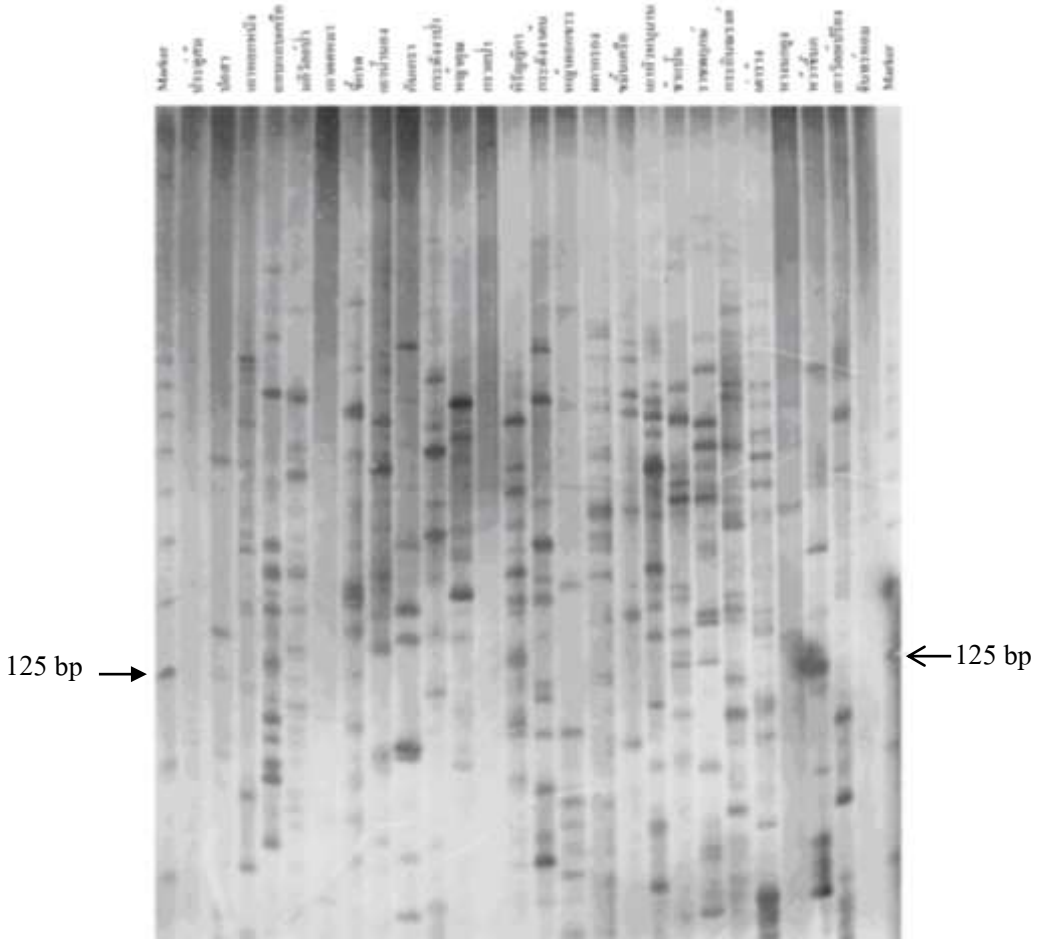
ภาพที่ 10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CTT / E-AGG และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



ภาพที่ 10 **(ต่อ)** ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CTT / E- AGG และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CTC / E-AGG และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส



ภาพที่ 11 (ต่อ) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ไพรเมอร์ M-CTC / E- AGG และ marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 คู่เบส

การศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์พอลีมอร์ฟิซึมของแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพีของพืชสมุนไพรพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์พอลีมอร์ฟิซึมสูงถึง 100 ซึ่งน่าจะเนื่องมาจากพืชสมุนไพรที่นำมาศึกษานั้นต่างชนิดกันค่าเปอร์เซ็นต์พอลีมอร์ฟิซึมของแถบดีเอ็นเอจึงสูงมาก ซึ่งแตกต่างจาก

การศึกษาในพืชชนิดเดียวกันที่มีความเหมือนและความต่างของแถบดีเอ็นเอมากน้อยไม่เท่ากัน ได้แก่ ค่าเปอร์เซ็นต์พอลีมอร์ฟิซึมของแถบดีเอ็นเอของหญ้ารูซี่ 90.41 (กฤษณา, 2546) ปอสา 66.85 (นันทนา, 2547) ยอ 70.165 (นันทนา, 2550) ปรง 23.51 (Makanawakul, 2003) *Cucubita pepo* 37.46 และ *C. ovifera* 37.07 (Ferroil *et al*., 2003)

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอและข้อมูลสัณฐานวิทยา

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวอย่างสมุนไพรในป่าจำปีสิรินธรทั้ง 50 ตัวอย่าง โดยใช้ข้อมูลจำนวนแถบของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี ซึ่งมีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 381 แถบจากไพรเมอร์ 11 คู่ ในการวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สัญลักษณ์ “1” แสดงการพบแถบดีเอ็นเอ และ “0” แสดงการไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น ๆ แล้วนำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม NTSYS pc version 2.0e คำนวณความเหมือนทีละคู่สลับกัน (pairwise homoplassy matrix) สร้างเป็นตารางดัชนีความเหมือน (ตารางที่ 3) จากนั้นนำค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบไปจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี unweighted pair group method of average (UPGMA) (Nei and Lei, 1979) แสดงผลในรูปแบบของ phylogenetic tree จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่าสามารถสร้างแผนภาพ (ภาพที่ 12) และจำแนกยอออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 คือติ่งตั่ง กลุ่มที่ 2 คือพืชสมุนไพร 49 ตัวอย่างที่เหลือทั้งหมด เป็นมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม 0.557-1.000 (ตารางที่ 4) จะเห็นว่ามีความแตกต่างกันมากและบางชนิดรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่มีความเหมือนกันเลย เมื่อพิจารณาในรายละเอียดพบว่าติ่งตั่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัตินอกจากช่วยให้เจริญอาหาร สามารถ ขับพยาธิ ระบายท้อง จุกเสียด แก้บิด ซึ่งมีคุณสมบัติเกี่ยวกับโรคเกี่ยวกับท้อง ลดไข้ และเป็นยาบำรุงแล้ว ยังรักษาอาการ ไข้ป่า ทาแผลเรื้อรัง ส่วนของรากยังสามารถใช้แก้พิษงูได้ด้วย ในขณะที่พืชสมุนไพรกลุ่มที่ 2 จะเป็นกลุ่มที่รักษาอาการลดไข้ โรคเกี่ยวกับท้องและเป็นยาบำรุงเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีผู้ใดศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชต่างชนิดกันเลย และจาก phylogenetic tree ที่ได้จากการศึกษาที่มีการจัดเป็นกลุ่มย่อย ถึงแม้ว่าจะมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มกันมาก แต่ก็ยังสามารถจัดเป็นกลุ่มย่อยได้จึงน่าจะได้มีการสุ่มตัวอย่างสมุนไพรที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันไปศึกษาหาสารสำคัญของสมุนไพรในกลุ่มอาการต่าง ๆ ซึ่งจะทำให้การศึกษาสมุนไพรเป็นไปด้วยความสะดวกและรวดเร็วขึ้น

ภาพที่ 12 phylogenetic tree ของสมุนไพรป่าจำปีสิรินธรที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.0e โดยอาศัยข้อมูลความเหมือน (similarity) ที่คำนวณจากเทคนิคเอเอฟแอลพี ด้วยวิธี UPGMA