

## การจำแนกสายพันธุ์ขมิ้นชันในประเทศไทยโดยใช้ Microsatellite markers

### Classification of *Curcuma longa* L. in Thailand Using Microsatellite Markers

#### คำนำ

ขมิ้นชันเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์มากมาย ใช้เป็นยารักษาโรค ทำเครื่องเทศ แต่งกลิ่นสีอาหาร และทำเครื่องสำอาง ขมิ้นชันมีสรรพคุณในการใช้เป็นยาได้ดีมาก เช่น บรรเทาอาการอาหารไม่ย่อย รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ขับลม ลดการบีบตัวของลำไส้ ฆ่าเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย ด้านการอักเสบ ขับน้ำดี ด้านอนุมูลอิสระ ด้านการก่อกลายพันธุ์ และด้านมะเร็ง นักวิจัยไทยได้ทดลองทางคลินิกและรับรองผลโดยองค์การอนามัยโลกให้ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการบรรเทาอาการอาหารไม่ย่อย และรักษาแผลในกระเพาะอาหาร คณะกรรมการแห่งชาติด้านยาได้คัดเลือกขมิ้นชันเป็นสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ เพื่อรักษาอาการแน่น จุกเสียดจากอาการอาหารไม่ย่อย (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544) ขมิ้นชันมีสารสำคัญสี่เหลืองกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoid) และน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) แต่มักพบปัญหาเรื่องความไม่สม่ำเสมอของปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ในวัตถุดิบขมิ้นชัน เนื่องจากเกิดการปะปนของสายพันธุ์ที่ใช้ปลูก ทำให้เกิดความไม่สม่ำเสมอของสารสำคัญ ปัจจุบันการศึกษา และการจำแนกสายพันธุ์ขมิ้นชันในประเทศไทยยังมีน้อยมาก ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาอนุกรมวิธานของพืชสกุลขมิ้น โดยการจัดกลุ่มจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาร่วมกับเรณูวิทยา และเซลล์วิทยา (อรพินธ์, 2543) การศึกษาร่วมกับไอโซไซม์ (หทัยรัตน์, 2545) ซึ่งลักษณะบางลักษณะมีความใกล้เคียงกันจนไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ขมิ้นชันด้วยสายตาได้ เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมทำให้เกิดความผิดพลาดในการจำแนกสายพันธุ์

การใช้ microsatellite markers เป็นการนำชุดซ้ำสั้น ๆ ของลำดับเบสจำนวน 1-6 เบส ตั้งแต่ 2 ซ้ำขึ้นไป มาเป็นตัวตรวจสอบความแตกต่างขมิ้นชันที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ร่วมกับเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และวิธีการอิเล็กทรอนิกส์ ซึ่งทำให้เกิดภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป NTSYSpc หาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) และสร้าง dendrogram เพื่อวิเคราะห์

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การจำแนกสายพันธุ์ขมื่นชันด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอ เครื่องหมายชนิด microsatellites ทำให้สามารถตรวจสอบความแตกต่างระดับยีน ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ และใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ขมื่นชันได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูง

วัตถุประสงค์ในการศึกษา เพื่อจำแนกสายพันธุ์ขมื่นชันจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย โดยใช้ microsatellite markers และศึกษาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อคัดเลือกขมื่นชันสายพันธุ์ดี มีสารเคอร์คูมินอยด์สูง สามารถนำสายพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ทางการศึกษา และปลูกเชิงการค้าต่อไป

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อจำแนกสายพันธุ์ขมื่นชันในประเทศไทยโดยใช้ microsatellite markers
2. เพื่อจำแนกสายพันธุ์ขมื่นชันโดยใช้ microsatellite markers ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา
3. เพื่อคัดเลือกขมื่นชันสายพันธุ์ดีมีปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์สูง

## การตรวจเอกสาร

ขมิ้นชันอยู่ในลำดับ Zingiberales ประกอบด้วยพืช 53 สกุลและมากกว่า 1,200 ชนิด พืชในลำดับนี้เป็นไม้ล้มลุก อายุหลายปี มีเหง้าใต้ดิน กาบใบเปิด ดอกสวยงาม ขมิ้นชันอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* L. หรือ *Curcuma domestica* Valetton. เรียกทั่ว ๆ ไปว่า turmeric ในประเทศไทยเรียกชื่อตามแหล่งที่พบ เช่น ขมิ้น ขมิ้นแกง ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว ขมิ้น หมิ้น ตายอ สะยอ มีชื่ออื่น เช่น yellow root, indian saffron ขมิ้นชันมีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินเดีย บังกลาเทศ เนปาล นอกจากนี้ยังมีถิ่นกำเนิดแถบมาเลเซีย อินโดนีเซีย และทางตอนใต้ของจีน (Larsen, 1980) พบว่ามีประวัติการใช้ขมิ้นชันมานานกว่า 5,000 ปี ทั่วโลกมีพืชสกุลขมิ้นมากกว่า 80 ชนิด ที่ความสูงระดับน้ำทะเลจนถึง 2,000 เมตร (Sasikumar, 1999) ในประเทศไทยพบพืชสกุลขมิ้นประมาณ 34 ชนิด (Larsen, 1996) พบว่าขมิ้นชันมีการกระจายพันธุ์ในทุกภูมิภาคที่ความสูงระดับน้ำทะเลจนถึง 1,200 เมตร

ขมิ้นชันมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจหลายประการ ได้แก่ ฤทธิ์ขับลม (Rose *et al.*, 1977) ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร และรักษาอาการอาหารไม่ย่อย (Gujral *et al.*, 1953) ฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ (Permpiphat *et al.*, 1990) ฤทธิ์ฆ่าเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Misra and Sahu, 1977) ฤทธิ์ขับน้ำดี สมานแผล ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Sharm, 1976) ฤทธิ์ต้านการกลาย (antimutagenic activity) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Polasa *et al.*, 1991) มีการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ป้องกันยูง (อกวิฑู และคณะ, 2544) และฤทธิ์ในการขับลม ซึ่งแพทย์แผนโบราณใช้รักษาโรคท้องอืดเฟ้อ (นันทวัน, ม.ป.ป.) ในอดีตที่ผ่านมามีรายงานการศึกษาทั่วโลกการออกฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็ง และฤทธิ์ต้านมะเร็งของ curcumin ในระดับโมเลกุลมากมาย (Leu and Maa, 2002) การทดลองทางคลินิกโดยใช้ขมิ้นชันรักษาอาการจุกเสียด ในผู้ป่วยท้องอืดท้องเฟ้อจำนวน 160 คน พบว่าได้ผลดีกว่ายาขับลม และนอกจากนี้ยังทดลองในผู้ป่วยที่ปวดท้องเนื่องจากแผลในกระเพาะอาหาร พบว่าได้ผลดีเช่นกัน (Intanonta *et al.*, 1986) นอกจากนี้ยังใช้ขมิ้นชันเป็นเครื่องเทศในการปรุงอาหารเพื่อแต่งสีและกลิ่นอาหาร เช่น แกงเหลือง แกงไตปลา และใช้เป็นเครื่องสำอาง (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544) ขมิ้นชันที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตยา ควรคัดเลือกจากพันธุ์ที่มีคุณภาพตามมาตรฐานการผลิตยา มาตรฐานตำรับยาสมุนไพรไทย กำหนดให้ผงวัตถุดิบขมิ้นชันที่ใช้ผลิตยาต้องมีปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ไม่ต่ำกว่า 5% และปริมาณน้ำมันหอมระเหยไม่ต่ำกว่า 6% (Thai Herbal Pharmacopoeia, 1995)

ประเทศอินเดียเป็นผู้ผลิตและใช้ขมิ้นชันมากที่สุดถึง 80% ของโลก และเป็นประเทศที่ส่งออกมากที่สุด โดยมีพันธุ์มากกว่า 50 พันธุ์ พันธุ์การค้าที่ใช้ส่งออกมีลักษณะเนื้อในแห้งสีส้มเข้มให้สารเคอร์คูมินสูง เช่น พันธุ์ Roma (PCT-10) และ Suroma (PTS-24) มีปริมาณเคอร์คูมินสูง 9.3 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ดีของประเทศอินเดียที่ได้รับการยอมรับคือ กลุ่มพันธุ์ Alleppey (Niir board, n.d.) นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ Erode Rajapore และพันธุ์ Sangli (India AGRO Industry, 2005)

### ลักษณะพฤกษศาสตร์ของขมิ้นชัน

ขมิ้นชันมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ  $2n = 3x = 63$  (Ramachandran, 1961; Nazeem and Menon, 1994) เป็นพืชล้มลุก อายุหลายปี สูงประมาณ 70 - 90 เซนติเมตร มีเหง้าใต้ดิน (ภาพที่ 1, ก) ลักษณะเป็นแท่งยาว และมีข้อปล้องชัดเจน มีการแตกแขนงไม่เป็นระเบียบ ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า หัวหลัก (mother rhizome) และแง่ง (rhizome) ภายในประกอบด้วยสารสำคัญ 2 ชนิด คือ สารสีเหลืองกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ประกอบด้วยสาร curcumin, methoxycurcumin, demethoxycurcumin และน้ำมันหอมระเหย ประกอบด้วยสารเทอร์เมอโรน (turmerone) และซิงจีเบอรีน (zingiberene) นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มเซสควิเทอร์ปีน (sesquiterpenes) และมินอเตอร์ปีน (monoterpenes) มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว และมีรสมันปนเผ็ดเล็กน้อย มีรากจำนวนมาก ลักษณะอวบน้ำ นอกจากนี้สีกลองไปยังพบรากสะสมอาหารลักษณะเป็นค้อนรูปไข่ (ovate) (ภาพที่ 1, ก) จิรสุดา (2536) จัดกลุ่มสีภายในเหง้าขมิ้นชันเป็น 3 โทนสี คือ ส้ม เหลือง และเหลืองส้ม พบว่าโทนสีเดียวกันมีเปอร์เซ็นต์ curcuminoid ใกล้เคียงกัน

ลำต้นเป็นลำต้นเทียม (pseudostem) อยู่เหนือดิน เกิดจากการอัดตัวของกาบใบซ้อนกันเป็นชั้น ใบเป็นใบเดี่ยวสีเขียว รูปรีแกมขอบขนาน แผ่นใบมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 1, ก) ฐานใบป้านถึงแหลม ปลายใบแหลม เส้นใบเป็นแบบขนาน (pennately parallel vein) ลิ้นใบ (ligule) มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อบาง ๆ อยู่ระหว่างฐานของแผ่นใบกับส่วนปลายของกาบใบ

ช่อดอก (inflorescence) เกิดกึ่งกลางลำต้นเทียม รูปทรงกระบอก ประกอบด้วยใบประดับ (bract) จำนวนมาก มีขนาดและสีแตกต่างกัน ใบประดับเรียงอยู่รอบแกนของช่อดอก โดยเรียงเป็นวงซ้อนกัน (ภาพที่ 1, ข) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือ ใบประดับส่วนบน มีสีขาวปลายเขียว รูปรางไข่ถึงรี ปลายมน มีติ่งเล็กน้อย มีขนบริเวณใบประดับ ใบประดับส่วนล่างเรียกว่า coma bract

เรียงซ้อนกันหรือเชื่อมกับฐาน ทำให้น้ำสามารถขังได้ดีและคงความชุ่มชื้น ใบประดับแต่ละกลีบเชื่อมติดกัน 1/4-1/2 จากฐานใบ (หทัยรัตน์, 2545)

กลีบดอก (flower) เกิดในซอกของใบประดับ มีลักษณะรูปกรวย ปลายมน และโค้งลง ดอกเป็นหลอดยาวรูปกรวย กลีบเลี้ยง (calyx) มี 3 กลีบ แต่ละกลีบมีขนาดไม่เท่ากันและเชื่อมกันเป็นหลอดสี่เหลี่ยม ปลายแยกเป็น 3 กลีบ ปลายกลีบที่อยู่ตรงกลางมีดิ่งแหลม มีขน กลีบปากสี่เหลี่ยม มีแถบสีเหลืองตรงกลาง ปลายกลมมนหัก 2 หัก เกสรเพศผู้มีสามกลีบ



ตุ่มรากสะสมอาหาร

ก



ข



ค

**ภาพที่ 1** ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของขมิ้นชัน ก ลักษณะของลำต้นและเหง้าใต้ดินของขมิ้นชัน อายุ 139 วันหลังปลูก ข ช่อดอกของขมิ้นชันอายุ 150 วันหลังปลูก ค ลักษณะของเหง้าใต้ดินของขมิ้นชันหลังตัดราก อายุ 139 วันหลังปลูก

โดยสองกลีบเป็นหมัน (staminode) อยู่ด้านข้างอับเรณู และหนึ่งกลีบอยู่ตรงข้ามอับเรณู ก้านชูเกสรเพศผู้ (filament) สั้นและกว้าง ก้านชูอับเรณูเชื่อมติดกับอับเรณู (anther) ที่ตำแหน่งเหนือฐานของอับเรณู อับเรณูรูปขอบขนาน เกสรเพศเมีย (pistil) มีรังไข่ใต้วงกลีบดอก (inferior ovary) ประกอบด้วย 3 carpel ก้านชูเกสรเพศเมีย (stigma) เป็นเส้นขนาดเล็ก 1 เส้น ยาวประมาณ 4 เซนติเมตร รังไข่มีขน

### การคัดเลือกและการจำแนกพันธุ์ขมื่นชัน

ขมื่นชันเป็นสมุนไพรที่ใช้ประโยชน์จากส่วนที่อยู่ใต้ดิน ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า หัวหลัก และแง การนำไปใช้ประโยชน์ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการใช้ เช่น ใช้เป็นวัตถุค้ำในการผลิตยาจะคัดเลือกพันธุ์ที่มีคุณภาพ มีสารเคอร์คูมินอยด์สูง และเมื่อนำไปใช้ทำเครื่องสำอางจะคัดเลือกพันธุ์ที่มีสีส้มอ่อน ในประเทศไทยมีการศึกษาและวิจัยด้านการรวบรวม และการคัดเลือกพันธุ์ขมื่นชันน้อยมาก งานวิจัยและการศึกษาที่ดำเนินการในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นการศึกษาและจำแนกพืชสกุลขมื่น โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา หรือจำแนกความแตกต่างระดับโปรตีนโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ งานวิจัยเกี่ยวกับขมื่นชันส่วนใหญ่ที่พบเป็นการศึกษาเรื่องการเขตกรรม และการจัดการ ปัจจุบันยังไม่พบขมื่นชันพันธุ์ดีที่ใช้เป็นพันธุ์ปลูก ท่อนพันธุ์ที่ใช้ส่วนใหญ่ นำมาจากท้องถิ่น หรือแหล่งขายวัตถุค้ำ ซึ่งมักเกิดปัญหาเรื่องความไม่สม่ำเสมอของสายพันธุ์ เนื่องจากเกิดการปะปนของท่อนพันธุ์ก่อนการปลูก ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งทำให้ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ที่ได้ไม่คงที่ ในประเทศอินเดียมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพันธุ์ของขมื่นชันมากมาย ทำให้อินเดียมีพันธุ์ปลูกมากกว่า 50 พันธุ์ และปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์เพิ่มขึ้น โดยการคัดเลือกพันธุ์จากขมื่นชันที่มีลักษณะดี คัดเลือกจากการกลาย (mutation breeding) หรือการผสมเปิด (open pollination) นอกจากนี้ยังเริ่มมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การใช้ไอโซไซม์ในการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม และยังมีแนวคิดที่จะใช้วิธีทางชีวเคมี และกายวิภาคศาสตร์ (anatomy) ในการศึกษาพืชสกุลขมื่นชันเช่นกัน (Sasikumar, 1999) มีการใช้ไอโซไซม์เพื่อจำแนกพืชสกุลขมื่นชัน แทนการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (เพิ่มพงษ์ และคณะ, 2532) ในประเทศไทยเริ่มมีการใช้ข้อมูลทางโมเลกุลเพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (phylogeny) มากขึ้น เช่น การใช้ลำดับเบสของกรดแอมิโนในโมเลกุลของโปรตีน เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และศึกษาวิวัฒนาการในอดีตของสิ่งมีชีวิต (Li and Graur, 1991) มีการใช้เทคนิคไอโซไซม์ และอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการศึกษาวิวัฒนาการของพืช เช่น พืชสกุลขมื่นชัน (Apavajirut *et al.*, 1999; Paisooksantivatana and Thepsen, 2001)

### การศึกษาและวิยการจัดหมวดหมู่หรือจำแนกพืชสกุลขมิ้นและขมิ้นชัน

เต็ม (2523) รายงานชื่อพืชสกุลขมิ้นไว้ 50 ชนิดทั่วโลก พบในประเทศไทยประมาณ 34 ชนิด เช่น ว่านมหาเมฆ (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) ขมิ้น โลก (*C. alismatifolia* Gagnep.) ขมิ้นขม (*C. amrissima* Roscoe.) ว่านนางคำ (*C. aromatica* Salisb.) ขมิ้นชัน (*C. longa* Linn.) กระเจียวขาว (*C. parviflora* Wall.) ขมิ้นแดง (*C. roscoeana* Wall.) อาวแดง (*C. sessilis* Gage.) กระเจียวบัว (*C. sparaganifolia* Gagnep.) ขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria* Roscoe.) แห้วดำ (*C. zerumbet* Roxb.) และว่านชักมดลูก (*C.sp.* Waan chakmotluuk.)

หทัยรัตน์ (2545) แบ่งพืชสกุลขมิ้นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ไม่มีจอยบนอับเรณู แต่มี anther crest เหนืออับเรณู โดยใช้ลักษณะการเชื่อมติดกันของใบประดับและสีของใบประดับเป็นเกณฑ์ กลุ่มที่ 2 อับเรณูมีจอยยื่นออกมา โดยใช้ลักษณะการเกิดช่อดอก ลำต้นใต้ดิน และสีเนื้อของลำต้นใต้ดินเป็นเกณฑ์ เมื่อวิเคราะห์และจัดกลุ่มโดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) สามารถแบ่งพืชสกุลขมิ้นได้ 2 กลุ่มหลัก โดยไม่สามารถแยกพืชสกุล *Smithatris* ออกจากพืชสกุลขมิ้นได้อย่างชัดเจน โดยกลุ่มที่ 1 อยู่ในสกุลย่อย *Paracurcuma* กลุ่มที่ 2 อยู่ในสกุลย่อย *Eucurcuma* (Valeton, 1918) เมื่อศึกษาความผันแปรของรูปแบบไอโซไซม์ สามารถแบ่งพืชสกุลขมิ้นเป็น 3 กลุ่มหลัก ซึ่งจำแนกพืชสกุล *Smithatris* ออกจากพืชสกุลขมิ้นได้ แต่ไม่สามารถจำแนกพืชสกุลขมิ้นเป็น 2 สกุลย่อยได้

อรพินท์ (2543) แบ่งพืชสกุลขมิ้นโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่มีลำต้นใต้ดินเจริญยืดยาว แตกแขนงมากไม่เป็นระเบียบ โดยจำแนกจากการเจริญของเหง้า สีของลำต้นใต้ดิน กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีลำต้นใต้ดิน แตกแขนงน้อย เหง้าสั้นเป็นระเบียบ โดยจำแนกจากลักษณะการเกิดช่อดอก การมีขนบนแผ่นใบ และสีของใบประดับ พบว่าขมิ้นชันจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 เมื่อศึกษาเซลล์วิทยาจากการนับจำนวนโครโมโซมโพลยพลอย สามารถแบ่งพืชสกุลขมิ้นเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 63$  ส่วนกลุ่มที่ 2 มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 10 - 20$  เมื่อนำข้อมูลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเซลล์วิทยา มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของพืชสกุลขมิ้น ด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งพืชสกุลขมิ้นได้ 3 กลุ่ม พบว่าขมิ้นชันจัดอยู่ใน subgenus *Eucurcuma*

กรมวิชาการเกษตร (2544) รวบรวม และคัดเลือกขมิ้นชันพันธุ์ปลูกจากท้องถิ่นต่าง ๆ และจากแหล่งขายวัตถุดิบ จำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ชุมพร 10018801 ให้ผลผลิต 4.5 ตัน/ไร่ สายพันธุ์ชุมพร 27058701 มีสารเคอร์คูมิน 9.74% แต่ให้ผลผลิตประมาณ 3 ตัน/ไร่ ขมิ้นชันจากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 44 ตัวอย่างที่ไม่ระบุสายพันธุ์และอายุการเก็บเกี่ยว พบว่าขมิ้นชันที่รวบรวมแต่ละภูมิภาคมีปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ และน้ำมันหอมระเหยแตกต่างกัน คือ 4.72% - 22.57% และ 6% - 16% ตามลำดับ และพบตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดเดียวกัน มีความแปรผันสูงมาก (สมภพ และคณะ, 2543)

วรรณภา และอดิสร (2540) รวบรวมพืชสกุลกระเจียวจำนวน 10 ชนิด โดยรวบรวมจากจังหวัดนครราชสีมา 2 ชนิด ได้แก่ กระเจียวอ่างทอง (*Curcuma sessilis* Gang) และกระเจียวสูงเนิน (*Curcuma* sp.) จากจังหวัดชัยภูมิ 4 ชนิด ได้แก่ กระเจียวบัวชัยภูมิ (*C. alismatifolia* Gannep.) ขมิ้นชัน (*C. domestica* Valetton.) บัวชัน (*Curcuma* sp.) และเทพรำลึก (*C. parviflora* Wall.) จากจังหวัดแม่ฮ่องสอน 3 ชนิด ได้แก่ กระเจียวส้ม (*C. roscoeana* Wall.) กระเจียวแดง (*Curcuma* sp.) และขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria* Roscoe.) และจากตลาดนัดสวนจตุจักร 1 ชนิด คือ บัวโกเมน (*Curcuma* sp.) พบว่าพืชสกุลกระเจียวทั้ง 10 ชนิด มีความแตกต่างของขนาด ลักษณะดอก และลำต้น จากการนับจำนวนโครโมโซม พบว่ามีจำนวนโครโมโซมระหว่าง 24 - 63 แท่ง นอกจากนี้ได้ใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อศึกษาความผันแปรของไอโซไซม์ esterase และ peroxidase พบว่า ไอโซไซม์ esterase มีความผันแปร ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างของพืชสกุลกระเจียวได้ทั้งหมด 10 ชนิด

พิชญ์ (2538) จำแนกสายพันธุ์ขมิ้นจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของขมิ้นจำนวน 4 แหล่งพันธุ์ คือ 15118701, 10018801, 13038801 และ 01038801 โดยพิจารณาจากความยาวของกาบใบ ความยาวของก้านใบ ความยาวและความกว้างของแผ่นใบ ความยาวจากฐานใบถึงส่วนที่กว้างที่สุดของใบ ความยาวและเส้นผ่านศูนย์กลางปล้องที่ 5 ของแ่งที่ 1 จำนวนแ่งต่อกอ ความยาวและเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวหลัก จำนวนหัวหลักต่อกอ สีภายในเหง้า ลักษณะทิศทางการชี้ของแ่งที่ 1 ผลการศึกษาพบว่าสามารถจำแนกกลุ่มขมิ้นได้ 3 กลุ่ม คือ แหล่งพันธุ์ 13038801 จัดเป็นขมิ้นชนิด *Curcuma longa* L. ส่วนแหล่งพันธุ์ 15118701 จัดอยู่ในกลุ่ม *Curcuma* sp.1 แหล่งพันธุ์ 10018801 และ 01038801 จัดอยู่ในกลุ่ม *Curcuma* sp.2

Apavatjirut *et al.* (1999) จำแนกพืชสกุลขมิ้นในระยะก่อนออกดอกจำนวน 7 ชนิด เพื่อยืนยันผลการศึกษานุกรมวิธาน โดยใช้เครื่องหมายโปรตีนชนิด isozyme จำนวน 21 ชนิด พบว่าทำให้เกิด polymorphism จำนวน 8 ชนิด

Paisooksantivatana *et al.* (2001) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระเจียว (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) พันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่าของประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายโปรตีนชนิด allozyme จำนวน 7 loci พบว่ากระเจียวพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง เกิด polymorphism ระหว่าง 3.14 - 3.5 และ 2.86 - 4 ตามลำดับ และเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรระหว่าง 0.586 - 0.611 และ 0.621 - 0.653 ตามลำดับ ทั้ง 2 พันธุ์มีความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.833 พบว่ากระเจียวที่ปลูกในพื้นที่สูงให้ผลผลิตดีกว่ากระเจียวที่ปลูกในพื้นที่ต่ำ

Schumann (1904) แบ่งพืชสกุลขมิ้นเป็น 2 สกุลย่อย (subgenus) คือ สกุลย่อย Hitcheniopsis เป็นสกุลย่อยที่มีช่อดอกเกิดกลางลำต้นเทียม ขอบใบประดับส่วนล่างเชื่อมติดกับด้านหลังของใบประดับที่อยู่ถัดขึ้นไป ปลายแยกเป็นอิสระ ฐานใบอับเรณูไม่มีจอย สกุลย่อย Eucurcuma เป็นสกุลย่อยที่มีขอบใบประดับเชื่อมติดกันบริเวณฐานใบ มีจอยที่ฐานใบอับเรณู

Baker (1894) แบ่งพืชสกุลขมิ้นในแถบเอเชียออกเป็น 3 กลุ่ม คือ Exantha เป็นกลุ่มที่มีช่อดอกเกิดจากเหง้าใกล้ลำต้นเทียม กลุ่มที่ 2 คือ Mesantha เป็นกลุ่มที่มีช่อดอกเกิดกลางลำต้นเทียม มีใบประดับเชื่อมกับบริเวณที่ใกล้กับฐานใบของช่อดอก ส่วนปลายแยกเป็นอิสระ กลุ่มที่ 3 คือ Hitcheniopsis เป็นกลุ่มที่มีช่อดอกเกิดตรงกลางลำต้นเทียม แต่ใบประดับส่วนล่างเชื่อมติดกับความยาวของใบประดับ ส่วนปลายแยกเป็นอิสระ

Valeton (1918) ใช้ลักษณะเกสรเพศผู้และลักษณะของช่อดอก ร่วมกับสีของส่วนต่าง ๆ เพื่ออธิบายพืชสกุลขมิ้น สามารถแบ่งพืชสกุลขมิ้นเป็น 2 สกุลย่อย (subgenus) คือ Eucurcuma เป็นกลุ่มย่อยที่มีฐานใบเรียวแหลม (acuminate) อับเรณูมีจอยเชื่อมอยู่ทางด้านหลัง เกสรเพศผู้สีเหลือง เหง้ามีการแตกแขนงชัดเจน และสกุลย่อย Paracurcuma เป็นกลุ่มย่อยที่มีช่อดอกเป็นทรงกระบอก มีใบประดับจำนวนมาก ใบประดับส่วนล่างสั้นกว่าส่วนบน อับเรณูไม่มีจอย มีเกสรเพศผู้เป็นหมัน สีม่วงแดง เหง้ามีขนาดสั้น และพบส่วนปลายรากมีตุ่มรากสะสมอาหาร (tuberous root)

Chandra *et al.* (1998) ศึกษาลักษณะ 10 ลักษณะของขมิ้นชันจำนวน 25 สายพันธุ์ ที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศอินเดีย โดยศึกษาในตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ พบว่า ความสูง น้ำหนักสด และความยาวของ primary rhizome มีความสัมพันธ์ทางบวกกับผลผลิต ขณะที่ น้ำหนักแห้งมีความสัมพันธ์ทางลบกับผลผลิต สายพันธุ์ PCT-13 และพันธุ์ Lakadong ให้ผลผลิตปานกลาง สายพันธุ์พื้นเมืองของตะวันออกเฉียงเหนือ (พันธุ์ Sonajuli local -1 และ Sonajuli local -2) ให้ผลผลิตต่ำถึงปานกลาง ส่วนพันธุ์ทางตอนใต้ของประเทศให้ผลผลิตค่อนข้างสูง

Pinheiro *et al.* (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของขมิ้นชันจำนวน 20 ตัวอย่าง จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศบราซิล โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าทำให้เกิด polymorphism ทั้งหมด 45 แอลลีล เมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมด้วย Jaccard และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มขมิ้นชันเป็น 2 กลุ่ม และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วย Amova พบว่าเกิดความแตกต่างระหว่างกลุ่มเท่ากับ 44.49 เปอร์เซ็นต์

### เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular markers)

ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคต่าง ๆ เพื่อศึกษาความแตกต่างและศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต หรือใช้หาความแตกต่างระดับดีเอ็นเอหรือยีน ได้แก่ เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เทคนิคนี้ทำให้เกิดความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ สามารถใช้บ่งชี้และจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ ดีเอ็นเอหรือเครื่องหมายของลักษณะใดลักษณะหนึ่งที่น่าสนใจ เรียกว่า molecular markers หรือ genetic markers ซึ่งหมายถึง การใช้ดีเอ็นเอหรือยีนเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบ polymorphism ของสิ่งมีชีวิต

Molecular markers หรือ genetic markers คือ เครื่องหมายทางโมเลกุลที่ใช้ตรวจสอบหรือจำแนกความแตกต่างระหว่างจีโนม (Crooijmans *et al.*, 1996) เพื่อบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง ชนิดหนึ่งหรือต่างชนิด เป็นดีเอ็นเออยู่ที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซมหรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้ เนื่องจากเกิดความแปรปรวนหรือเกิด polymorphism ของลำดับเบสใน โมเลกุลดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545) ซึ่งสาเหตุการเกิด polymorphism มีหลายประการ ได้แก่

1. การเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ
2. การเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าสู่ในปฏิกิริยา PCR
3. การเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าสู่ในปฏิกิริยา PCR
4. การเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
5. จำนวนชุดซ้ำที่แตกต่างกันระหว่างจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
6. จำนวนชุดซ้ำที่แตกต่างกันระหว่างตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าสู่ในปฏิกิริยา PCR
7. ความผันแปรของลำดับเบสที่ไม่ใช่ตำแหน่งของจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าสู่ในปฏิกิริยา

วิธีการตรวจสอบ polymorphism ของดีเอ็นเอ ทำได้โดยการหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ซึ่งเครื่องหมายที่ใช้จำแนกความแตกต่างสามารถแบ่งกว้าง ๆ ได้ 3 ชนิด (Lui, 1998) คือ

1. Phenotypic markers หรือ morphological markers คือ เครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบสิ่งมีชีวิต สามารถใช้เครื่องหมายตรวจสอบได้โดยตรงจากลักษณะที่สังเกตได้ เช่น สีใบ สีดอก เป็นต้น เครื่องหมายชนิดนี้มักได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อม จึงทำให้เกิดความผิดพลาดจากการตรวจสอบได้ง่าย

2. Protein markers หรือ biochemical markers คือ เครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบสิ่งมีชีวิต โดยใช้ความแตกต่างของกระบวนการทางชีวเคมี เนื่องจากโปรตีนที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน ดังนั้นการตรวจสอบความแตกต่างของโปรตีน สามารถตรวจสอบความแตกต่างจากแอลลีลของยีน เครื่องหมายโปรตีนที่นิยมใช้ ได้แก่ ไอโซไซม์ (isozyme) และแอลโลไซม์ (allozyme) (Hunter and markert, 1957) ข้อจำกัดของการตรวจสอบโปรตีนหรือไอโซไซม์ คือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั่วจีโนม และต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษา ผลที่ได้ยังขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้โปรตีนยังเสถียรภาพได้ง่าย

3. DNA markers หรือดีเอ็นเอเครื่องหมาย คือ เครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอหรือยีน เป็นโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีความเสถียร สามารถเก็บไว้ได้นาน เนื่องจากดีเอ็นเอเป็น

องค์ประกอบที่อยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ ตรวจสอบได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต ไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีน หรือเป็นลักษณะที่แสดงออกหรือไม่แสดงออกก็ได้ สามารถตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด ครอบคลุมทั้งจีโนม ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้มีให้เลือกมากมาย สามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้อย่างดี เนื่องจากการตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอที่สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลาน มีการใช้กันอย่างกว้างขวาง สามารถประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้ไม่จำกัด ทั้งนี้ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการนำมาใช้ เนื่องจากดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละชนิดมีข้อดี และข้อจำกัดที่แตกต่างกัน

### ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint)

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นวิธีการที่ทำให้เกิดแบบแผนหรือลายพิมพ์ของดีเอ็นเอที่จำเพาะ สามารถตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อม ๆ กัน เกิดลายพิมพ์ที่จำเพาะกับแต่ละบุคคล (Jeffreys *et al.*, 1985) มีความหมายเช่นเดียวกับคำว่า DNA profiling หรือ DNA typing (สุรินทร์, 2545) ในอดีตการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ทำโดยศึกษาด้วยการจัดจำแนก (identification) และอนุกรมวิธาน (taxonomy) ซึ่งเป็นการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ (anatomy) สรีรวิทยา (physiology) และสัณฐานวิทยา (morphology) ปัจจุบันวิธีนี้ยังนิยมใช้กันอยู่เนื่องจากง่าย และสะดวก แต่บางครั้งก็อาจเกิดความผิดพลาดได้ในกรณีที่มีลักษณะบางลักษณะที่ต้องการศึกษามีความใกล้เคียง หรือมีความคล้ายคลึงกันมาก เนื่องจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ทำให้เสียเวลาในการจำแนกความแตกต่าง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการตรวจสอบสายพันธุ์ การจัดเก็บ และการรวบรวมพันธุ์พืช ทำให้เกิดความถูกต้องแม่นยำเป็นที่ยอมรับในระดับสากล สามารถนำมาใช้ในการจำแนกหรือตรวจสอบสิ่งมีชีวิต หรือนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาวิวัฒนาการ ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือดและพิสูจน์บุคคล ต่อมาได้มีการนำวิธีการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาใช้ในการตรวจสอบ polymorphism ในระดับโมเลกุลของโปรตีนและระดับดีเอ็นเอ

ในปี 1995 Weising และคณะ แบ่งการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็น 2 ชนิดคือ การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization -based DNA fingerprinting) และการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR (PCR-based DNA fingerprinting)

## 1. การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีไฮบริโดเซชัน

คือ การนำดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ย้ายดีเอ็นเอลงแผ่นฟิลเตอร์เมมเบรน แล้วไฮบริโดซ์กับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี จะปรากฏแอลลีลที่มีลักษณะจำเพาะ โดยโพรบที่ใช้เป็นชิ้นดีเอ็นเอสั้น ๆ

### 1.1 เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980)

เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้ศึกษาความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ของแบคทีเรีย และตัดที่ตำแหน่งตัดจำเพาะบริเวณตำแหน่งจดจำ และแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นฟิลเตอร์เมมเบรน แล้วไฮบริโดซ์กับชิ้นดีเอ็นเอสั้น ๆ เรียกว่าโพรบ ซึ่งทราบลำดับเบสหรือไม่ทราบก็ได้ เพื่อตรวจสอบส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกับโพรบ ความแตกต่างที่เกิดขึ้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส โดยมีสาเหตุจากการเพิ่มขึ้น หรือการขาดหายไปของดีเอ็นเอบางส่วนในบริเวณระหว่างตำแหน่งจดจำของเอนไซม์จำนวน 2 ตำแหน่ง มีผลให้การตัดชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างไป หรือเกิดจากการหายไปของส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้ตำแหน่งจดจำหายไป หรือเกิดการกลายเฉพาะจุด (point mutation) ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส มีผลให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเพิ่มขึ้น หรือเกิดการเรียงตัวใหม่ของเบสบนสายดีเอ็นเอ (DNA rearrangement) ซึ่งสาเหตุดังกล่าวนี้มีผลทำให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเปลี่ยนแปลงไป ทำให้เกิดความแตกต่าง และสามารถนำความแตกต่างที่ได้มาใช้เพื่อศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมหรือความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต

Paull *et al.* (1998) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวสาลีจากศูนย์รวบรวมพันธุ์ข้าวสาลีของประเทศออสเตรเลียจำนวน 124 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RFLP เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ระหว่าง 0.004 - 0.409 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.18 เมื่อจัดกลุ่มสามารถจัดได้ 4 กลุ่ม ซึ่งสัมพันธ์กับข้อมูลทางพันธุประวัติ

## 2. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้วิธี PCR (PCR-based DNA fingerprinting)

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายให้มีปริมาณมากขึ้นในระยะเวลาสั้น เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอเป้าหมาย จากหลายตำแหน่งพร้อม ๆ กัน (multi loci PCR) PCR หรือ Polymerase Chain Reaction เทคนิคนี้ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1985 โดย Kary Mullis และคณะ มีหลักการ คือ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นต้นแบบ (DNA template) ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายเป็น 2 เท่า ในทุกรอบของปฏิกิริยา มีจำนวนดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเท่ากับ  $2^n$  (n = จำนวนรอบ) ในกระบวนการ PCR ต้องใช้ส่วนประกอบที่สำคัญคือ ดีเอ็นเอต้นแบบ นิวคลีโอไทป์ 4 ชนิด (deoxynucleotide triphosphate; dNTPs ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP, dTTP), เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase, ไพรมเมอร์ oligonucleotide 2 สาย เพื่อใช้เริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ไพรมเมอร์จะมีความจำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการ โดยเข้าไปจับดีเอ็นเอคนละสาย และมีการสังเคราะห์ในทิศทางสวนทางกัน นอกจากนี้ยังใช้ส่วนประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็น เช่น บัฟเฟอร์  $MgCl_2$  และ KCl ซึ่งในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอจะดำเนินการเป็นรอบของปฏิกิริยา ในแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ

- Denaturation เป็นการใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 90 - 95 องศาเซลเซียส เพื่อสลายพันธะไฮโดรเจนที่ใช้ในการจับคู่ของสายดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบเสียสภาพจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว

- Annealing เป็นการใช้อุณหภูมิต่ำประมาณ 40 - 60 องศาเซลเซียส ทำให้ไพรมเมอร์จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยไพรมเมอร์จะเข้าจับกับลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ

- Extension เป็นการใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอโดยการเติมนิวคลีโอไทป์ทั้ง 4 ชนิด (dNTPs) หลังจากไพรมเมอร์เกาะกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase สังเคราะห์ดีเอ็นเอจนได้ดีเอ็นเอสายคู่เส้นใหม่ที่สมบูรณ์ การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต จะใช้วิธีเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ที่เป็นแบบจำเพาะครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single locus PCR) ในหลายตำแหน่งโดยใช้ไพรมเมอร์หลายคู่ และนำมาผลมาวิเคราะห์ร่วมกัน ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้

วิธี PCR มีหลายเทคนิคแตกต่างกัน ได้แก่

2.1 เทคนิค Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990)

เป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสไม่จำเพาะขนาดประมาณ 10 นิวคลีโอไทป์ ในการทำปฏิกิริยา ไพรเมอร์จะเข้าจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบโดยสุ่ม และเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเกิดจากไพรเมอร์เกาะในตำแหน่งที่แตกต่างกัน ทำให้จำนวน และขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป พบลำดับเบสหลายตำแหน่งที่ใกล้เคียงกัน ไม่เกิดผลผลิตของ PCR แต่ลำดับเบสที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้กันจะเกิดผลผลิตของ PCR เทคนิคนี้มีข้อดีคือสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบส และใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ข้อจำกัดคือเมื่อทดลองซ้ำบางครั้งได้ผลที่แตกต่างจากเดิม เนื่องจากเทคนิคนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการทดลอง การทำต้องควบคุมการทดลองให้คงที่ เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการทำแผนที่ยีน ศึกษาวิวัฒนาการ ศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต และใช้ในการจำแนกสายพันธุ์

สุจิตรา และ Szmidt (2544) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้สักในป่าของประเทศไทยจำนวน 15 แห่ง โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าประชากรที่ศึกษามีความแตกต่างกัน 23 เปอร์เซ็นต์ เกิด polymorphism ระหว่าง 27.4 - 92.2 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาพบว่า ไม้สักในป่าของประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ควรมีการศึกษาเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของไม้สัก

สุธีร์ (2543) ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสจำนวน 38 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 10 ชนิด เพื่อศึกษาความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมและเปรียบเทียบลักษณะภายนอก พบว่าไพรเมอร์ 6 ชนิด ทำให้เกิด polymorphism ทั้งหมด 51 แถบ เกิดความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันของค่าในการปรากฏของแอลลีล และลักษณะสีของใบอ่อน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น และจำนวนยอดที่เพิ่มหลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จิรพันธ์ (2546) ศึกษาลักษณะความคงตัว และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไข่พันธุ์กล้วย ก.บ.1, ก.บ.2, ก.บ. 3, ก.บ.4 และ ก.บ.5 โดยใช้เทคนิค RAPD และเทคนิค SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) โดยการนำหน่อของกล้วยไข่มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และปลูกทดสอบความคงตัวในสภาพแปลงปลูก พบว่าแต่ละพันธุ์กล้วยให้ลักษณะผลผลิต และลักษณะทางสรีรวิทยาแตกต่างกัน และเมื่อนำมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD และ SRAP พบว่าเทคนิค RAPD ขนาด 10 นิวคลีโอไทป์ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไข่พันธุ์กล้วยแต่ละพันธุ์ได้ แต่เทคนิค SRAP สามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไข่แต่ละพันธุ์ได้อย่างชัดเจนด้วยไพรเมอร์ A7-B5

จำลองลักษณ์ (2546) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะกอกโอลีฟที่นำมาปลูกในประเทศไทยจำนวน 14 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์จำนวน 190 ชนิด ขนาด 10 - 12 นิวคลีโอไทป์ พบว่าไพรเมอร์จำนวน 50 ชนิด ทำให้เกิด polymorphism จำนวน 658 แอลลิล มีค่า PIC (Polymorphism Information Content) เฉลี่ยเท่ากับ 0.28 มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่าง 0.65 - 0.78 เมื่อวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc รุ่น 2.1e สามารถแบ่งมะกอกโอลีฟเป็น 5 กลุ่ม

Rout *et al.* (1998) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อศึกษาความคงตัวทางพันธุกรรมของขิงที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 15 สายพันธุ์ พบว่าเกิดแอลลิล 1 แอลลิล (monomorphic) ซึ่งไม่ทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในขิงที่ปลูกทั่วไป

## 2.2 เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Vos *et al.*, 1995)

เป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการรวมวิธี RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน ซึ่งรูปแบบ polymorphism ที่เกิดขึ้นกับความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหมือนกับเทคนิค RFLP และสามารถตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เหมือนกับเทคนิค RAPD ทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอชิ้นสั้น ๆ เรียกว่า adapter เข้าที่ปลายทั้ง 2 ด้านของชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อให้ไพรเมอร์เข้ามาเกาะ ทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อดีเอ็นเอที่ใช้เป็นไพรเมอร์มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ adapter ที่บริเวณด้านปลาย 3' ของไพรเมอร์ และมีลำดับเบสที่เป็นส่วนของตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพิ่มเบสอีก 2-3 นิวคลีโอไทป์ เพื่อให้เกิดการเลือกจับของเบสที่เป็นคู่สมกัน ซึ่งเป็นการลด

จำนวนของซันติเอ็นเอ โดยซันติเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้เป็นซันติเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่ติดกับบริเวณจดจำของเอนไซม์ที่สามารถเข้าคู่ได้กับไพรเมอร์ที่เลือกเท่านั้น การเกิด polymorphism เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ทำให้ตำแหน่งตัดจำเพาะเปลี่ยนไป เกิดการหายไปหรือเพิ่มขึ้นของตำแหน่งตัดจำเพาะ หรือเกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอ ทำให้ขนาดของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป ข้อดีของเทคนิค AFLP คือ ไม่ต้องทราบข้อมูลของลำดับเบส สามารถทำได้รวดเร็ว เกิด polymorphism จำนวนมาก ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย และใช้ได้กับสิ่งมีชีวิตชนิดใดก็ได้ ที่มีส่วนของลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ adapter ข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือ ค่าใช้จ่ายสูง ต้องการดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง แอลลิลส่วนใหญ่เป็นแบบข่ม ทำให้วิเคราะห์ผลยาก (Li and Quiros, 2001)

จินตนา (2543) จำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma spp.* ที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 40 ไอโซเลต (isolate) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ ในการศึกษาสายพือดีเอ็นเอ พบว่าทำให้เกิด polymorphism ทั้งหมด 271 แอลลิล เฉลี่ยเท่ากับ 42.8 เปอร์เซ็นต์ สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างชัดเจน โดยแต่ละกลุ่มไม่สัมพันธ์กับแหล่งที่มา และมีความสามารถในการควบคุมโรค ทำให้เทคนิค AFLP มีประโยชน์ในการจำแนกชนิดของเชื้อราที่มีความซับซ้อน

### 2.3 เทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ Microsatellite marker (Tautz, 1989)

เป็นการสร้างสายพือดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นชุดซ้ำสั้น ๆ ขนาด 2 - 6 เบส เช่น  $(AG)_n$ ,  $(GCC)_n$  และ  $(ATGT)_n$  เมื่อ n คือ จำนวนชุดซ้ำ มีจำนวนตั้งแต่ 2 ซ้ำขึ้นไป และไม่เกิน 100 ซ้ำ จำนวนชุดซ้ำของเบสนี้จะกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมของยูแคริโอต พบประมาณ  $10^4 - 10^5$  ตำแหน่ง โดยมีขนาดที่ต่างกันและความหลากหลายสูงมาก เช่น ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบส ATATATAT เป็น dinucleotide (AT) มี 4 ซ้ำ เทคนิคมีชื่อเรียกแตกต่างกันคือ Microsatellite, Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ Short Tandem Repeat (STR), Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) และ Sequence-tagged Microsatellite Site (STMS) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด codominant สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ เทคนิคนี้ จึงเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ดีในการวิเคราะห์จีโนม การศึกษาดีเอ็นเอชนิด microsatellites ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตสามารถตรวจสอบสายพือดีเอ็นเอ ได้ 2 วิธี คือ วิธีไฮบริดเซชัน และวิธี PCR

2.3.1 RFLP based เป็นการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการไฮบริดเชซันกับ oligo simple sequence repeats เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และขั้นตอน southern blot ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ มีจำนวนแอลลีลเกิดขึ้นมาก โดยไม่ทราบว่าแอลลีลใดบ้างที่เป็นคู่กัน และใช้เวลานานในการทำแต่ละครั้ง

2.3.2 PCR based เป็นการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการออกแบบไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกับตำแหน่งหัว และท้ายของบริเวณลำดับเบสที่เป็นชุดซ้ำสั้น ๆ และใช้ตำแหน่งนี้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ซึ่งสามารถแสดงแอลลีลที่เกิดขึ้นในตำแหน่งที่จำเพาะโดยใช้เวลาในการทำแต่ละครั้งน้อย จำนวนซ้ำที่ได้แต่ละชนิดแตกต่างกัน เทคนิค PCR ถูกค้นพบโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ.1983 (วัชร และมนตรี, 2536) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก

การศึกษาดีเอ็นเอชนิด microsatellites ในจีโนมของสิ่งมีชีวิต มีข้อดีคือ

1. Highly informative โดยเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างสูง (highly polymorphism) (Crooijmans, 1996) และแสดงให้เห็นสภาพพหุร่วมกัน (codominant)
2. Technically simple คือสามารถทำได้ง่ายโดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งต้องการดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย
3. Highly abundant คือ พบกระจายอยู่ทั่วจีโนม ทั้งภายในยีนและระหว่างยีน
4. Readily transferable คือ ไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละตำแหน่งของ microsatellite markers สามารถใช้ได้ทั่วไปเพียงแค่มียาลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์
5. Flexible เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง ได้แก่ gene evolution, phylogenetic relationship, genetic mapping, DNA fingerprinting, physical mapping และ gene cloning เป็นต้น

ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ ต้องมีการโคลนและหาลำดับเบส เพื่อพัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะตำแหน่งก่อน ซึ่งทำได้ยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายในการพัฒนาไพรเมอร์สูง โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่ไม่

เคยมีข้อมูลลำดับเบสใน Genbank การวิเคราะห์ผลยาก ถ้าต้องการรู้ขนาดแอลลีลที่แน่นอน เนื่องจากเกิด stutter band ลักษณะเป็นแถบตีเอ็นเอหลายแถบติดกัน เกิดจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำของดีเอ็นเอชนิด microsatellites เป็นผลจากการกลายของลำดับเบส ทำให้ไม่สามารถแยกขนาดของแอลลีลได้

Microsatellites ที่พบในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะยูแคริโอต (eukaryotes) พบตำแหน่งเดียวกับเฮเทอโรโครมาทิน อยู่ใกล้กับบริเวณเซนโทรเมียร์ และเทโลเมียร์ มีขนาดและลำดับเบสที่แตกต่างกัน โดยมีชื่อเรียกต่างกันตามจำนวนเบสของ core sequences โดย 1 เบส เรียกว่า mononucleotide repeats 2 เบส เรียกว่า dinucleotides repeats 3 เบส เรียกว่า trinucleotide repeats 4 เบส เรียกว่า tetranucleotide repeats เป็นต้น และสามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภท คือ perfect repeats imperfect repeats และ compound repeats โดย perfect repeats เป็นชุดซ้ำของลำดับเบสที่มีชุดซ้ำ 1 แบบ เช่น  $(AG)_{20}$  และ  $(GAT)_{50}$  imperfect repeats เป็นชุดซ้ำของลำดับเบส ที่มีลำดับเบสอื่นอยู่ภายในด้วย เช่น  $CT(AG)_{25}$  และ compound repeats เป็นชุดซ้ำของลำดับเบส ที่มีชุดซ้ำมากกว่า 1 แบบ เช่น  $(AG)_{20}(TG)_{20}$  และ  $(CAG)_{20}(AG)_{20}$  สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ใช้ในการจำแนกพันธุ์และสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต

พัชรินทร์ และคณะ (2544) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์ไทย จำนวน 13 สายพันธุ์ และพันธุ์เกาหลีจำนวน 18 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ตัวตรวจสอบจำนวน 20 คู่ไพรเมอร์ ตัดผลด้วยดีฟลูออเรสเซนซ์ และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI 377 พร้อมด้วยข้อมูลฟีโนไทป์ (phenotype) 8 ลักษณะ คือ เปอร์เซ็นต์ความงอก สีลำต้น สีดอก สีขน รูปร่างใบ ความหนาแน่นของขนบนลำต้น ความสูง และจำนวนข้อเฉลี่ย พบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.54 - 0.82 และเกิดแอลลีลที่เป็น polymorphic ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ เฉลี่ยเท่ากับ 7.40 มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.022 - 0.857 เมื่อนำมาสร้าง dendrogram โดยโปรแกรม UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มพันธุ์ถั่วเหลืองได้ 4 กลุ่ม

วาริน (2545) ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางกราด ยางพลวง และยางลูกผสม ด้วยเทคนิค SRAP เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่มอย่างชัดเจน คือ กลุ่มยางกราด กลุ่มยางพลวง และกลุ่มยางที่คาดว่าเป็นลูกผสม พบว่ายางกราด และยางพลวงมีความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.349

ยางกราดและยางที่คาดว่าเป็นลูกผสมมีความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.274 ส่วนยางพลวง และยางที่คาดว่าเป็นลูกผสมมีความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.261 และไม่ปรากฏว่า ตัวอย่างของยางที่คาดว่าเป็นลูกผสมอยู่ในกลุ่มของยางพลวงหรือยางกราด จึงคาดว่ายางทั้ง 3 กลุ่ม เป็นคนละชนิดกัน

Junjian Ni *et al.* (2002) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว indica และ japonica จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ของสหรัฐอเมริกาจำนวน 38 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ป่าจำนวน 2 ชนิด (*O. rufipogon* Griffith and และ *O. nivara* Sharma et Shastry) โดยใช้ microsatellite markers จำนวน 111 คู่ไพรเมอร์ ที่กระจายตัวอยู่ทั่วจีโนม พบว่าทำให้เกิด polymorphism จำนวน 753 แอลลีล และแอลลีลเฉลี่ยต่อไพรเมอร์เท่ากับ 6.8 เมื่อพิจารณาค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าแอลลีลบนโครโมโซมที่ 6 และ 7 มีความหลากหลายสูง แต่บนโครโมโซมที่ 2 มีความหลากหลายต่ำ

Giovanni *et al.* (2003) ใช้ microsatellite markers จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอ้อยจำนวน 66 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ที่มีการศึกษาไว้ เช่น RFLPs, RAPDs และ 5s rRNA พบว่าการใช้ microsatellite markers สามารถแบ่งกลุ่มทางพันธุกรรมของอ้อยได้ถูกต้องแม่นยำมากกว่าวิธีอื่น ๆ

Cheng *et al.* (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างแถว และระหว่างสายพันธุ์ของถั่วพุ่มที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ของสถาบันเกษตรเขตร้อนแห่งชาติ (IITA) จำนวน 90 สายพันธุ์ โดยใช้ microsatellite markers จำนวน 46 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีจำนวน 27 คู่ไพรเมอร์ สามารถจำแนกความแตกต่างของถั่วพุ่มได้จำนวน 88 สายพันธุ์

Selvi *et al.* (2003) ใช้ microsatellite markers ที่พัฒนาจากข้าวโพดเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอ้อย พบว่าไพรเมอร์จำนวน 14 คู่ไพรเมอร์ ทำให้เกิด polymorphism มีค่าระหว่าง 32.4 - 83.3 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มจำนวนแอลลีลของอ้อยสกุล *Saccharum* อ้อยลูกผสม และสกุล *Erianthus* ได้ 41.17 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ามีค่า polymorphism ระหว่าง 7 - 14 เฉลี่ยเท่ากับ 10 ต่อคู่ไพรเมอร์ และพบว่าไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ สามารถทำให้เกิด polymorphism งานทดลองนี้สามารถจำแนกความแตกต่างภายในชนิด ของสกุล *Saccharum* และ *Erianthus* ได้และพบว่าทั้ง 2 สกุลมีความสัมพันธ์กัน และยังพบไพรเมอร์ที่เหลือจำนวน 5 คู่ไพรเมอร์ สามารถจำแนกความแตกต่างของสกุล และชนิดของสกุล *Erianthus*, *S. spontaneum*,

*S. officinarum* และ *S. barberi*

การใช้ประโยชน์จากดีเอ็นเอเครื่องหมาย จะใช้ร่วมกับเทคนิค PCR และวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกออกจากกัน โดยใช้กระแสไฟฟ้า ซึ่งอาศัยความแตกต่างของชนิด และปริมาณประจุไฟฟ้า ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลสาร สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ในทิศทางตรงข้าม นอกจากนี้อัตราการเคลื่อนที่ที่ยังขึ้นอยู่กับตัวกลางที่ใช้ด้วย

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความสำคัญในการศึกษาพืชสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรค เนื่องจากการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์เป็นการนำส่วนต่าง ๆ ของพืชมาใช้ ในลักษณะสดหรือแห้ง หากเกิดความผิดพลาดในการจำแนกจะทำให้เกิดการปะปนของส่วนต่าง ๆ อาจเกิดอันตราย หรือเกิดความเสียหายต่อผู้บริโภค นอกจากนี้สมุนไพรชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์หรือสายพันธุ์จะมีปริมาณสารสำคัญแตกต่างกัน การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสมุนไพรจึงมีความจำเป็นอย่างมาก ทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกันได้ เป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกพันธุ์หรือสายพันธุ์สมุนไพรให้เกิดความตรงตามพันธุ์ ไม่เกิดการปะปนกัน ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญทำให้เกิดความสม่ำเสมอของปริมาณสารสำคัญในวัตถุดิบสมุนไพรที่นำมาใช้บริโภค การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ microsatellite marker สามารถใช้ศึกษาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำให้มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากสามารถระบุความแตกต่างของพืชรวมถึงสายพันธุ์ (varieties) และพันธุ์ปลูก (cultivars) ได้ (Doi *et al.*, 1993) ในระดับยีนหรือระดับดีเอ็นเอ

### ข้อดีของการใช้ Microsatellite markers

1. เป็นดีเอ็นเอที่มีอยู่จำนวนมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง
2. มีความแตกต่างของดีเอ็นเอชนิด microsatellite มากในจีโนม ทำให้สามารถใช้ microsatellite markers จำแนกความแตกต่างหรือศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ดี
3. สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิค PCR และ southern blot
4. สามารถแลกเปลี่ยนข้อมูลระหว่างห้องปฏิบัติการได้ง่าย โดยส่งเฉพาะไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่าง
5. เป็น codominant marker ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของเซลล์ที่เป็น heterozygous ออกจาก homozygous ได้

### ข้อจำกัดของการใช้ Microsatellite markers

1. การพัฒนาไพรเมอร์ microsatellite markers ค่อนข้างยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง เพื่อให้ได้ไพรเมอร์ที่ดีมีความจำเพาะกับลำดับเบส และมีจำนวนไพรเมอร์มากเพียงพอ
2. ลำดับเบสของดีเอ็นเอชนิด microsatellites ที่นำมาพัฒนาไพรเมอร์ ไม่เกี่ยวข้องกับยีน ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ศึกษา ยีน ได้โดยตรง

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. ตัวอย่างพืช

ขมิ้นชันที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยจำนวน 34 จังหวัด และแนวเขตชายแดนไทย - ลาว จ. อุบลราชธานี รวมทั้งหมดจำนวน 129 ตัวอย่าง โดยเก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกของเกษตรกร แหล่งขายท้องถิ่นและวัดอุทิศ นำมาปลูกไว้ ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา คัดเลือก 1 ต้นต่อแหล่งเก็บ โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน เช่น ลักษณะหัวหลัก ลักษณะแงง รูปร่างใบ สีใบ ลักษณะสีของใบประดับ เป็นต้น โดยแต่ละตัวอย่างมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เนื่องจากช่วงเวลาการเก็บรวบรวมในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน เช่น รวบรวมแงงจากแหล่งขาย รวบรวมทั้งต้นหลังปลูกจากแปลงเกษตรกร โดยกำหนดชื่อตัวอย่างที่รวบรวมเป็นชื่อจังหวัดและหมายเลขลำดับการเก็บ ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ตัวอย่างของขมิ้นชันที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยจำนวน 129 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	แหล่งที่รวบรวม	ตัวอย่าง	แหล่งที่รวบรวม
1	จ. อุบลราชธานี1	26	จ. ชัยนาท3
2	จ. ศรีสะเกษ1	27	จ. สุราษฎร์ธานี1
3	จ. กาญจนบุรี1	28	จ. สุราษฎร์ธานี2
4	จ. กาญจนบุรี2	29	จ. สุราษฎร์ธานี3
5	จ. กาญจนบุรี3	30	จ. สุราษฎร์ธานี4
6	จ. พังงา1	31	จ. สุราษฎร์ธานี5
7	จ. พังงา2	32	จ. พังงา6
8	จ. พังงา3	33	จ. พังงา7
9	จ. พังงา4	34	จ. พังงา8
10	จ. พังงา5	35	จ. เชียงใหม่3
11	จ. ศรีสะเกษ2	36	จ. เชียงใหม่4
12	จ. เชียงใหม่1	37	จ. เชียงใหม่5
13	จ. อุบลราชธานี2	38	จ. ศรีสะเกษ3
14	จ. เชียงใหม่2	39	จ. นครศรีธรรมราช1
15	จ. ชุมพร1	40	จ. ศรีสะเกษ4
16	จ. ชุมพร2	41	จ. พังงา9
17	จ. ตาก1	42	จ. ขอนแก่น1
18	จ. ตาก2	43	จ. ขอนแก่น2
19	จ. ราชบุรี1	44	จ. สระแก้ว1
20	จ. กาญจนบุรี4	45	จ. สระแก้ว2
21	จ. ชัยนาท1	46	จ. สระแก้ว3
22	จ. ชัยนาท2	47	จ. สระแก้ว4
23	จ. ราชบุรี2	48	จ. สระแก้ว5
24	จ. ราชบุรี3	49	จ. สระแก้ว6
25	จ. กาญจนบุรี5	50	จ. สระแก้ว7

**ตารางที่ 1 (ต่อ)**

ตัวอย่าง	แหล่งที่รวบรวม	ตัวอย่าง	แหล่งที่รวบรวม
51	จ. สระแก้ว8	76	จ. ปราจีนบุรี1
52	จ. สระแก้ว9	77	จ. ปราจีนบุรี2
53	จ. สระแก้ว10	78	จ. ฉะเชิงเทรา4
54	จ. สระแก้ว11	79	จ. ปราจีนบุรี3
55	จ. สระแก้ว12	80	จ. ปราจีนบุรี4
56	จ. สระแก้ว13	81	จ. ปราจีนบุรี5
57	จ. สระแก้ว14	82	จ. ปราจีนบุรี6
58	จ. สระแก้ว15	83	จ. ปราจีนบุรี7
59	จ. สระแก้ว16	84	จ. ปราจีนบุรี8
60	จ. สระแก้ว17	85	จ. ฉะเชิงเทรา5
61	จ. ประจวบคีรีขันธ์1	86	จ. ตราด1
62	จ. ประจวบคีรีขันธ์2	87	จ. ระยอง
63	จ. ประจวบคีรีขันธ์3	88	จ. ตราด2
64	จ. ประจวบคีรีขันธ์4	89	จ. จันทบุรี
65	จ. ประจวบคีรีขันธ์5	90	จ. ตราด3
66	จ. เพชรบุรี	91	จ. บุรีรัมย์1
67	จ. ประจวบคีรีขันธ์6	92	จ. บุรีรัมย์2
68	จ. ประจวบคีรีขันธ์7	93	จ. บุรีรัมย์3
69	ชายแดน1	94	จ. บุรีรัมย์4
70	ชายแดน2	95	จ. บุรีรัมย์5
71	ชายแดน3	96	จ. บุรีรัมย์6
72	ชายแดน4	97	จ. บุรีรัมย์7
73	จ. ฉะเชิงเทรา1	98	จ. สุรินทร์1
74	จ. ฉะเชิงเทรา2	99	จ. สุรินทร์2
75	จ. ฉะเชิงเทรา3	100	จ. สุรินทร์3

### ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	แหล่งที่รวบรวม	ตัวอย่าง	แหล่งที่รวบรวม
101	จ. สุรินทร์ <sup>4</sup>	116	จ. พัทลุง <sup>1</sup>
102	จ. สุรินทร์ <sup>5</sup>	117	จ. พัทลุง <sup>2</sup>
103	จ. อุบลราชธานี <sup>3</sup>	118	จ. สตูล
104	จ. ร้อยเอ็ด	119	จ. ตรัง
105	จ. มหาสารคาม	120	จ. นครศรีธรรมราช <sup>4</sup>
106	จ. ศรีสะเกษ <sup>5</sup>	121	จ. นครศรีธรรมราช <sup>5</sup>
107	จ. สงขลา	122	จ. ขอนแก่น <sup>3</sup>
108	จ. กระบี่ <sup>1</sup>	123	จ. เลย
109	จ. กระบี่ <sup>2</sup>	124	จ. หนองคาย
110	จ. กระบี่ <sup>3</sup>	125	จ. เชียงใหม่ <sup>6</sup>
111	จ. นครศรีธรรมราช <sup>2</sup>	126	จ. เชียงใหม่ <sup>7</sup>
112	จ. นครศรีธรรมราช <sup>3</sup>	127	จ. อุดรดิตถ์
113	จ. กระบี่ <sup>4</sup>	128	จ. ลำปาง
114	จ. กระบี่ <sup>5</sup>	129	จ. แพร่
115	จ. ชุมพร <sup>3</sup>		

## 2. อุปกรณ์และสารเคมี

### 2.1 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ดีเอ็นเอ

- ตู้ incubator shaker
- เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น GeneAmp<sup>R</sup> PCR System 9700
- ชุด electrophoresis
- เครื่อง gel document ภายใต้แสง UV (Ultra Violet) รุ่น T2A
- โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป NTSYSpc รุ่น 2.02e

### 2.2 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์

- ชุดสกัดสาร (soxhlet extraction) รุ่น EME6 0500

- เครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) ประกอบด้วย R-200 rotavaper with V-800 vaccuum controller, V-501 vaccuum system, CTL-911 refrigerated circulators, control cable, Vacuum- hose 16/6 MM.
- HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ของ Hewlett Packard รุ่น LC 1100
- อุปกรณ์วัดและเก็บลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ไม้บรรทัด สายวัด เวอร์เนีย เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของ AND รุ่น GF-3000 แผ่นเทียบสีมาตรฐาน (colour chart) และ อุปกรณ์ถ่ายภาพ

### 2.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการสกัดดีเอ็นเอ

- Liquid nitrogen
- Tris-HCl pH 8.0
- NaCl
- EDTA pH 8.0
- 2% CTAB
- Polyvinylpyrrolidone (PVP)
- 0.3%  $\beta$ - mercaptoethanol
- Phenol
- Isoamyl
- Chloroform
- 95% Ethanol
- 70% Ethanol

### 2.4 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการทำ PCR

- $MgCl_2$
- dNTPs
- Taq DNA polymerase
- Loading buffer (ประกอบด้วย EDTA pH 8.0, formamide, bromophenol bule & xylenecyanol)

## 2.5 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ electrophoresis

- 4.5% Polyacrylamide
- 10% APS
- TEMED
- 1X TBE buffer
- Bromophenol blue
- Xylene cyanol
- Loading buffer (ประกอบด้วย 37% formamide, EDTA pH 8.0, 0.1%

bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol

- Silver nitrate (ประกอบด้วย silver nitrate, formamide, water)
- 10% Acetic acid
- Developer (ประกอบด้วย sodium carbonate, water, sodium triosulfate,

formamide)

## 2.6 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์

- Hexane analytical reagent (hexane A.R.)
- Methanol analytical reagent (methanol A.R.)
- Methanol HPLC grade
- Tetrahydrofuran
- Acetonitrile
- 1% Acetic acid

## วิธีการ

### 1. การเก็บตัวอย่างใบขมิ้นชันเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างใบบนสุดของต้น เนื่องจากเป็นใบอ่อนทำให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณมากและคุณภาพสูง สามารถบดด้วยไนโตรเจนเหลวได้ง่าย โดยตัดจากบริเวณปลายใบเข้ามาประมาณ 10 - 15 เซนติเมตร ให้นำใส่ในถุงพลาสติกมัดปากถุงให้แน่น แช่ในน้ำแข็งทันที แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอ หากยังไม่สกัดให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพของดีเอ็นเอ

### 2. เตรียมดีเอ็นเอ

#### 2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

โดยประยุกต์การสกัดดีเอ็นเอของ Syamkumar *et al.* (2003)

2.1.1 บดตัวอย่างใบขมิ้นชันประมาณ 200 กรัม ในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด ใส่ในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer (1 โมลาร์ Tris-HCl pH 8.0, 5 โมลาร์ NaCl, 0.5 โมลาร์ EDTA pH 8.0, 2% CTAB, 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร PVP และน้ำตาลละลายทั้งหมดไปอุ่นให้มีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และเติม 0.3%  $\beta$ -mercaptoethanol ก่อนใช้

2.1.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง incubator shaker เป็นเวลา 60 - 120 นาที

2.1.3 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที แล้วเติม ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25: 24: 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในหลอด

2.1.4 ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นาน 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

- 2.1.5 คูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมกลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- 2.1.6 คูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 2.1.7 เติมโซเดียมคลอไรด์ (ความเข้มข้น 5 โมลาร์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 2.1.8 ตกตะกอนด้วยเอธานอล 95% ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบา ๆ
- 2.1.9 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
- 2.1.10 คูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เพื่อเก็บดีเอ็นเอไว้ ระวังอย่าให้ตะกอนหลุดออกมา
- 2.1.11 ล้างตะกอนด้วยเอธานอลบริสุทธิ์ 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
- 2.1.12 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- 2.1.13 นำหลอดเซนตริฟิวจ์เทเอธานอลด้านบนทิ้ง และระวังอย่าให้ตะกอนหลุดออกมา คั่วหลอดไว้จนกว่าตะกอนจะแห้ง
- 2.1.14 ละลายตะกอนของดีเอ็นเอด้วย  $dH_2O$  ปริมาตร 100 - 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 ชั่วโมง หรือจนกว่าดีเอ็นเอจะละลายหมด เก็บดีเอ็นเอไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 2.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0% ตรวจสอบผลโดยการย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และดูภายใต้แสง UV เพื่อตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ

ขั้นตอนต่าง ๆ มีดังนี้

2.2.1 นำกรดเจลขนาด 100 มิลลิลิตร วางบนฐานวางกรดเจล แล้วเสียบหัวที่ด้านบนของแผ่นเจล หมุนเกลียวเพื่อล็อกกรดเจล

2.2.2 เตรียมอะกาโรสเจล 1.0% โดยชั่งผงอะกาโรส 1 กรัม ใส่ลงใน 0.5X TBE buffer (0.04 โมลาร์ tris-acetate, 0.001 โมลาร์ EDTA pH 8.0) 100 มิลลิลิตร และหลอมอะกาโรสโดยใช้เครื่องไมโครเวฟ นาน 4 - 5 นาที

2.2.3 รอให้สารละลายอะกาโรสเย็นที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงในถาดให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ด้วยความระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

2.2.4 ปล่อยให้เจลเย็นจนแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ใช้เวลาประมาณ 30 - 60 นาที จากนั้นจึงหิวออก

2.2.5 วางแผ่นเจลให้ด้านที่มีช่องหิวอยู่ด้านบน โหลดดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard marker) ความเข้มข้น 100 300 และ 500 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ลงบนแผ่นเจลในช่องเริ่มต้นที่ 1 ถึง 3

2.2.6 ผสมสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ 8X loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 45% glycerol) 8 ไมโครลิตร แล้วค่อย ๆ โหลดลงบนแผ่นเจล

2.2.7 นำถาดเจลใส่ใน chamber อิเล็กโทรโฟริซิส ที่มี 0.5X TBE buffer โดยวางให้ด้านที่มีช่องหัวอยู่ด้านบน (ใกล้ขั้วลบ) และให้บัฟเฟอร์สูงจากแผ่นเจลประมาณ 1 เซนติเมตร

2.2.8 เปิดกระแสไฟฟ้าความแรงไฟฟ้าเท่ากับ 80 โวลต์ นาน 1 - 2 ชั่วโมง หรือให้แถบดีเอ็นเอเคลื่อนที่บนแผ่นเจลเป็นระยะ 2 ส่วน 3 ของแผ่นเจล

2.2.9 นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ประมาณ 10 นาที ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำสะอาดประมาณ 5 นาที จากนั้นจึงเทสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เก็บไว้ในขวดทึบแสง

2.2.10 นำแผ่นเจลไปวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง gel document ภายใต้แสง UV บันทึกผลด้วยการถ่ายภาพ

### 3. การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้ Microsatellite markers

#### 3.1 การคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR

คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของขม้นชั้น เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของแอลลีล โดยคัดเลือกตัวอย่างขม้นชั้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน นำมาสกัดดีเอ็นเอและทดสอบไพรเมอร์ที่ทำให้เกิด polymorphism โดยเจือจางดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ต้องการคัดเลือกเพื่อตรวจสอบคู่ไพรเมอร์ ที่สามารถทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ชัดเจน ประกอบด้วยไพรเมอร์ที่พัฒนาจากขม้นชั้นจำนวน 70 คู่ไพรเมอร์ และพัฒนาจากโพลีจำนวน 70 คู่ไพรเมอร์ พัฒนาขึ้นโดยห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี ศ. กำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม ภายใต้ทุนอุดหนุนวิจัยงบประมาณบูรณาการนำร่องปี พ.ศ. 2547 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

### 3.2 ปฏิกริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

เพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นปริมาณ 10 นาโนกรัม ไพรเมอร์ forward และ reverse (5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.25 ไมโครโมลาร์ 2.0 มิลลิโมลาร์ MgCl<sub>2</sub> 200 ไมโครโมลาร์ dNTPs เอนไซม์ Taq DNA polymerase 0.3 unit ในปริมาตรทั้งหมด 5 ไมโครลิตร

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ GeneAmp<sup>R</sup> PCR System 9700

ก่อนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำ Pre-PCR ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนหลักในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่

1. Denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
2. Annealing ที่อุณหภูมิ “X” องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
3. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

โดย “X” องศาเซลเซียส คือ Annealing temperature (องศาเซลเซียส) ซึ่งแต่ละไพรเมอร์ ใช้อุณหภูมิต่างกัน (ตารางที่ 2)

โดยสารละลายจะผ่านกระบวนการ PCR จำนวน 35 - 40 รอบ

ขั้นตอน Post-PCR เป็นการหยุดปฏิกริยาของ PCR โดยใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หลังเสร็จสิ้นปฏิกริยา หยุดปฏิกริยาด้วย 3 ไมโครลิตร loading buffer (10 ไมโครโมลาร์ EDTA pH 8.0 98% formamide bromophenol blue & xylene cyanol) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการทำ PCR ผลผลิตที่ได้หลังจากการทำปฏิกริยา PCR เรียกว่า “PCR product”

**ตารางที่ 2** อุณหภูมิและจำนวนรอบในปฏิกิริยา PCR ของไพรเมอร์ที่พัฒนาจากขม้นชันและไพล จำนวน 13 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	Annealing Temperature (°C)	PCR cycles
Cl-1	58	35
Cl-38	60	35
Cl-54	58	35
Cl-58	56	35
Cl-61	60	35
Cl-65	56	35
Cl-102	56	35
Cl-104	56	40
Cl-117	56	35
Zc-23	56	35
Zc-75	56	35
Zc-84	56	35
Zc-85	56	35

ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ที่ใช้บอกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ PCR ทำโดยใช้  $\phi$ X 174 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ HinfI ให้ขนาดความยาวของลำดับเบสที่ได้เท่ากับ 200 - 300 คู่เบส

### 3.3 ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส

#### 3.3.1 การเตรียมกระจก

ก. นำแผ่นกระจกของ BIO RAD ขนาด 31.5 x 38 เซนติเมตร ล้างให้สะอาด เช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 รอบ แล้วเช็ดด้วยน้ำยา bind silane เพื่อให้เจล

เกาะติดบนกระจก (เตรียมจาก 0.5% acetic acid ใน 95 % ethanol เท่ากับ 1 มิลลิลิตร เติม bind silane 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน) เช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ อีกจำนวน 3 รอบ

ข. นำ chamber เช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 รอบ และเช็ดด้วยน้ำยา clean view จำนวน 1 รอบ เพื่อไม่ให้เจลดติดกระจก

ค. นำแผ่นกระจกมาประกบกับ chamber และใส่ spacer ทั้ง 2 ข้างกระจก

### 3.3.2 การเตรียม Polyacrylamide gel ความเข้มข้น 4.5 เปอร์เซ็นต์

ก. นำ 4.5% polyacrylamide ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 10% APS ปริมาตร 290 ไมโครลิตร และ TEMED 80 ไมโครลิตร ใส่ในบีกเกอร์เขย่าให้ผสมกันและค่อย ๆ เทลงบนชุดกระจกที่เตรียมไว้จนเต็ม ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วใส่หัวที่ด้านบนของเจลเพื่อดันเจลและทำให้เกิดช่องว่างในการ run gel ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 40 - 60 นาที นำเจลที่ได้ไปทำอิเล็กโทรโฟริซิส

ข. นำชุดกระจกที่เตรียมไว้มาวางใน tank ที่ใส่บัฟเฟอร์ 1X TBE ประมาณ 100 มิลลิลิตร จนเต็ม chamber ประกอบชุด run gel เข้าด้วยกัน เทบัฟเฟอร์ 1X TBE ให้ท่วมผิวเจลดึงหัวออก ไล่ฟองอากาศและเศษเจลแล้วปิดฝาชุดอิเล็กโทรโฟริซิส

ค. ต่อสายไฟเข้ากับเครื่อง power supply ทำ pre - run โดยใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ นานประมาณ 30 นาที หรือเมื่อเจลมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ง. นำ PCR product ที่เติมสีโบรโมฟินอลบลูความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสีไซลิไนไซยานอล (xylene cyanol) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที โหลดตัวอย่างดีเอ็นเอ 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปโหลดบริเวณช่องว่างระหว่างกระจกในแต่ละช่อง

จ. เมื่อเจลที่เตรียมไว้มีอุณหภูมิประมาณ 48 - 60 องศาเซลเซียส ปิดไฟเพื่อไล่ฟองอากาศและเสียบหัวด้านบน โดยให้ปลายหัวเสียบอยู่ในเจล 1 - 2 มิลลิเมตร และไหลดเจลลงในช่องหัว

ฉ. เปิดเครื่องโดยใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที หรือจนกว่าสี xylene cyanol เคลื่อนลงมาหนึ่งส่วนสามของเจลจึงปิดเครื่อง

ช. นำเจลไปย้อมด้วย silver nitrate

### 3.3.3 ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยการย้อม silver nitrate

ก. นำแผ่นกระจกแช่ใน 10% acetic acid ให้ท่วมเจล เขย่าเบา ๆ นาน 20 นาที นำ 10% acetic acid ออกเพื่อเก็บไว้

ข. ล้างแผ่นกระจกในน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที เขย่าเบา ๆ อย่างสม่ำเสมอ

ค. แช่ในสารละลาย silver nitrate (ซิลเวอร์ไนเตรด 1 กรัม, ฟอรัมาลดีไฮด์ 1.5 มิลลิลิตร, น้ำ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน) เขย่าเบา ๆ อย่างสม่ำเสมอ นาน 30 นาที เทสารละลายทั้งหมดออก

ง. ล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว นาน 1 นาที จำนวน 1 ครั้ง

จ. แช่ในสารละลาย developer (โซเดียมคาร์บอเนต 30 กรัม ละลายน้ำ 1 ลิตร เติมโซเดียมไตรออกไซด์เฟต ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร เติมฟอรัมาลดีไฮด์ 1.5 มิลลิลิตร/ลิตร) ปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร แช่เย็นประมาณ 10 องศาเซลเซียส จนเห็นแอลลิซัดเจนขึ้น

ฉ. หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย stop solution (10% acetic acid ที่เก็บไว้) เขย่าจนหมดฟองอากาศ

ช. ล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 นาที

ซ. ผึ่งแผ่นกระจกให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

#### 4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 นำข้อมูลแอลลีลแต่ละไพรเมอร์ของขมิ้นชัน 129 ตัวอย่าง บันทึกเป็นข้อมูลไบนารี (binary) โดยการเปรียบเทียบการเกิดแอลลีลบนเจลในแต่ละไพรเมอร์ โดยให้คะแนนตำแหน่งที่เกิดแอลลีลเป็น “1” และตำแหน่งที่ไม่เกิดแอลลีลเป็น “0” (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 3** เปรียบเทียบตัวอย่างการให้คะแนนแอลลีลบนเจล Polyacrylamide

		รูปแบบของแอลลีล		
A	B	แอลลีลที่เป็นไปได้	A	B
—	—	A	1	1
—		B	1	0
	—	C	0	1

นำข้อมูลที่ได้อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป NTSYS (Numerical Taxomy and Multivariate Analysis System) pc รุ่น 2.02e โดยใช้โปรแกรม SIMQUAL คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) และนำข้อมูลที่ได้อสร้าง dendrogram โดยวิธีการคำนวณแบบ UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Mean Analysis) (Sneath and Sokal, 1973) ด้วยโปรแกรม SHAN หาค่า cophenetic correlation (r) เพื่อตรวจสอบค่า goodness of fit โดยใช้โปรแกรม COPH และ MXCOMP

#### 4.2 คำนวณค่า Polymorphic Information Content (PIC) จากสูตร

$$PIC = 1 - \sum p_i^2$$

โดย  $p_i$  คือ ความถี่ของแอลลีล ที่  $i$  ซึ่ง  $p_i$  ประกอบด้วย  $p_a$  (absent allele) และ  $p_p$  (present allele) (Ott, 1991) ค่า PIC เป็นค่าที่บ่งชี้โอกาสที่จะพบตัวอย่างที่คัดเลือกมีการเกิด polymorphism ซึ่งถ้า  $PIC > 0.7$  พิจารณาได้ว่ามีค่า polymorphism สูง

##### 5. การจำแนกความสัมพันธ์โดยใช้ **Microsatellite markers** ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

คัดเลือกตัวแทนของท่อนพันธุ์มันชันจำนวน 34 สายพันธุ์ ที่ได้จากการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ microsatellite markers สายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา ในเดือนพฤษภาคม 2548 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้ระยะปลูกระหว่างต้น 60 เซนติเมตร และระหว่างแถว 75 เซนติเมตร ก่อนปลูกรองก้นหลุมด้วยปุ๋ยมูลไก่อัตรา 250 กรัมต่อหลุม ปลูกด้วยท่อนพันธุ์ที่มีตาจำนวน 2 - 5 ตา ให้น้ำสม่ำเสมอและกำจัดวัชพืชเมื่ออายุ 30 วันหลังปลูก ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 จำนวน 2 ครั้ง เมื่ออายุ 60 และ 120 วันหลังปลูก อัตรา 15 กรัม/ต้น (ประมาณ 1 ช้อนโต๊ะ) บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต เมื่อมันชันอายุ 120 วันหลังปลูก ดังนี้

- ความสูง : วัดจากบริเวณลำต้นเหนือดินถึงฐานใบที่สูงสุดของต้น (เซนติเมตร)
- รูปร่างใบ : เปรียบเทียบกัน 2 ลักษณะ คือ รูปร่างรี หรือรูปร่างรีแกมขอบขนาน
- ฐานใบ : เปรียบเทียบกัน 4 ลักษณะ คือ รูปร่างมน ก่อนข้างมน สอบแคบ หรือมนก่อนข้างป้าน
- สีใบ : เปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสีมาตรฐาน
- สีใบระดับของช่อดอก : เปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสีมาตรฐาน
- สีของปลายใบระดับ : เปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสีมาตรฐาน
- จำนวนต้นต่อกอ : นับจำนวนต้นทั้งหมดที่แตกกอ

ในเดือนกุมภาพันธ์ 2549 เก็บเกี่ยวหัวหลัก และแง่ม้วนชั้นที่อายุ 9 เดือน โดยลำต้นเหนือดินเปลี่ยนสภาพเป็นสีเหลืองแห้งหรือสีน้ำตาลและเหี่ยวโทรม ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำต้นใต้ดิน ดังต่อไปนี้

- นำหนักสดรวมหลังเก็บเกี่ยวต่อต้น (กรัม) : ชั่งหัวหลักและแง่ม้วนทั้งหมดที่ได้จากแต่ละต้นของแต่ละสายพันธุ์ด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

- จำนวนและความยาวเฉลี่ยของหัวหลักของกอดต่อต้น : นับจำนวนหัวหลักทั้งหมด และวัดความยาวทั้งหมด เพื่อหาค่าเฉลี่ยของหัวหลักต่อต้น (เซนติเมตร)

- เส้นผ่านศูนย์กลางของหัวหลักต่อต้น: ใช้เวอร์เนียวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวหลักที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของกอด (มิลลิเมตร)

- จำนวนและความยาวเฉลี่ยของแง่ม้วนที่ 1 (primary rhizome) ต่อต้น : นับจำนวนแง่ม้วนที่ 1 ทั้งหมดและวัดความยาวทั้งหมด เพื่อหาค่าเฉลี่ยของแง่ม้วนที่ 1 (เซนติเมตร) ต่อต้น

- จำนวนและความยาวเฉลี่ยของแง่ม้วนที่ 2 (secondary rhizome) ต่อต้น : นับจำนวนแง่ม้วนที่ 2 ทั้งหมดและวัดความยาวทั้งหมด เพื่อหาค่าเฉลี่ยของแง่ม้วนที่ 2 (เซนติเมตร) ต่อต้น

- จำนวนและความยาวเฉลี่ยของแง่ม้วนที่ 3 (tertiary rhizome) ต่อต้น : นับจำนวนแง่ม้วนที่ 3 ทั้งหมดและวัดความยาวทั้งหมด เพื่อหาค่าเฉลี่ยของแง่ม้วนที่ 3 (เซนติเมตร) ต่อต้น

- สีผิวของหัวหลักและแง่ม้วน : เปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสีมาตรฐาน

- สีเนื้อในแง่ม้วน : ใช้มีดหั่นแง่ม้วนที่ 1 บริเวณข้อที่ 3 ตามขวาง เพื่อเปรียบเทียบสีในแง่ม้วนกับแผ่นเทียบสีมาตรฐาน

- กลิ่น : ใช้มีดหั่นแง่ม้วนที่ 1 บริเวณข้อที่ 3 ตามขวาง เพื่อเปรียบเทียบกลิ่นโดยการดมกลิ่นให้คะแนนเป็น 3 ระดับ คือ กลิ่นมาก กลิ่นปานกลาง และกลิ่นน้อย

- ปริมาณน้ำมัน : ใช้มีดหั่นแฉ่งที่ 1 บริเวณข้อที่ 3 ตามขวาง เปรียบเทียบปริมาณน้ำมันในแฉ่งด้วยสายตา โดยให้คะแนนเป็น 3 ระดับ คือ มาก ปานกลาง และน้อย

- รูปร่างของหัวหลัก : พิจารณาจากลักษณะที่สังเกตเห็น เช่น ทรงกลม ทรงกระบอก

- ลักษณะของแฉ่ง : พิจารณาจากขนาดและรูปร่างของแฉ่งที่ 1 โดยใช้เวอร์เนีย วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณกึ่งกลางของแฉ่งที่ 1 เพื่อหาขนาดของแฉ่ง บันทึกข้อมูลโดยกำหนดให้แฉ่งที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1.5 เซนติเมตร เป็นแฉ่งขนาดใหญ่ แฉ่งที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 - 1.5 เซนติเมตร เป็นแฉ่งขนาดปานกลาง และแฉ่งที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1.2 เซนติเมตร เป็นแฉ่งขนาดเล็ก และพิจารณารูปร่างของแฉ่งจากลักษณะที่สังเกตเห็น เช่น ยาว เรียว อ้วนสั้น

- ลักษณะการแตกกอของลำต้นใต้ดิน : นำลำต้นใต้ดินทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วย หัวหลักและแฉ่งหลังเก็บเกี่ยวมาตัดรากให้เหลือเฉพาะหัวหลักและแฉ่ง (การเก็บเกี่ยวต้องระมัดระวังไม่ให้ลำต้นใต้ดินแตกหรือหลุดร่วง เพื่อให้ได้ทุกส่วนของลำต้นใต้ดินที่สมบูรณ์ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา) โดยพิจารณาการแตกของแฉ่งทั้ง 3 ชนิด โดยพิจารณาทิศทางการขึ้นของแฉ่ง บันทึกข้อมูลโดย กำหนดให้แฉ่งที่มีแนวโน้มชี้ลงในแนวดิ่งเป็นการแตกกอเป็นระเบียบ แฉ่งที่มีแนวโน้มชี้ลงในแนวดิ่ง และชี้ทำมุมแหลมหรือมุมป้านกับแนวดิ่งเป็นการแตกกอค่อนข้างเป็นระเบียบ และแฉ่งที่มีแนวโน้มชี้ทำมุมแหลมหรือมุมป้านกับแนวดิ่งเป็นการแตกกอไม่เป็นระเบียบ

- วิเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ (%) : โดยเครื่อง HPLC กำหนดให้ตัวอย่างที่มีสารเคอร์คูมินอยด์น้อยกว่า 4% มีสารเคอร์คูมินอยด์ต่ำ และตัวอย่างที่มีสารเคอร์คูมินอยด์มากกว่า 4% มีสารเคอร์คูมินอยด์สูง

## 6. การวิเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์

วิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ทุกสายพันธุ์ด้วยเครื่อง HPLC

## 6.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

6.1.1 เตรียมแก๊งขมิ้นชั้นทั้ง 3 ชนิด ประกอบด้วยแก๊งที่ 1 2 และ 3 เฉลี่ยตัวอย่างละ 80 กรัม หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ หนาประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

6.1.2 บดด้วยเครื่องบด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh สุ่มตัดตัวอย่างด้วยวิธี compartment โดยการคนตัวอย่างให้เข้ากัน แล้วสุ่มตัดกลับ (ตารางที่ 4) โดยเลือกตัดแบบใดแบบหนึ่ง A หรือ B ตัวอย่างละ 1 กรัม ใส่ใน thimble extraction แล้วปิดด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันความชื้น

**ตารางที่ 4** แสดงการตัดตัวอย่างผงขมิ้นชั้น โดยสุ่มเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>
<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>

6.1.3 นำตัวอย่างที่เตรียมใน thimble extraction มาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดไขมันออก เป็นเวลา 60 นาที และสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเมทานอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 90 นาที ด้วยชุดสกัดสาร

6.1.4 นำสารละลายที่สกัดได้ มาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแห้ง

6.1.5 นำสารที่ได้ละลายด้วยเมทานอลชนิดสำหรับเครื่อง HPLC (HPLC grade) ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรองขนาดอนุภาคเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน (Guddadarangavvanahally *et al.*, 2002) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6.1.6 นำสารสกัดที่ได้จากการกรองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ด้วยเครื่อง HPLC และคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

## 6.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

6.2.1 นำสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล HPLC grade ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร ได้ สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน (stock solution)

6.2.2 คูณสารละลายมาตรฐานใน stock solution ปริมาตร 200 400 600 และ 800 ไมโครลิตร ใส่ในขวดเก็บสาร (vial) ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 ไมโครลิตร โดยคูณสารละลายเมทานอล HPLC grade ปริมาตร 800 600 400 และ 200 ไมโครลิตร ใส่ในขวดเก็บสาร จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

### 6.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ด้วยเครื่อง HPLC

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ เทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยมีสภาวะที่สำคัญดังนี้

- อัตราการไหลของสาร (flow rate) 1.0 มิลลิลิตร/นาที
- สารตัวพาสารละลายให้เคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย Tetrahydrofuran (THF) : acetonitrile : 1% acetic acid อัตรา 10 : 30 : 60 (Min Hsiung, 1999)
- คอลัมน์ที่ใช้คือ Zorbax SB-C18 Column (4.6 x 150 nm)
- ตัวตรวจสอบที่ใช้คือ UV-Vis Detector ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร
- สารละลายที่ฉีดปริมาตร 5 ไมโครลิตร

## 7. สถานที่ทำการทดลอง

7.1 ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ. ปากช่อง

จ. นครราชสีมา

7.2 ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ต. กำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม

7.3 ห้องปฏิบัติการศูนย์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตบางเขน จ. กรุงเทพมหานคร

## 8. ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มเก็บรวบรวมขมึนชันจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย เดือนธันวาคม พ.ศ. 2546 ปลุกไว้ในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ เพื่อนำมาวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ microsatellite markers ในห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี เดือนตุลาคม พ.ศ. 2547 และนำสายพันธุ์ที่จำแนกได้มาปลูกเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ สิ้นสุดการทดลองเดือนมีนาคม พ.ศ. 2549

## ผลการทดลอง

### 1. การคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR

สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่ทำให้เกิด polymorphism จำนวน 13 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 5) ประกอบด้วยไพรเมอร์ที่พัฒนาจากขม้นชั้นจำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ CI-1, CI-38, CI-54, CI-58, CI-61, CI-65, CI-102, CI-104 และ CI-117 และไพรเมอร์ที่พัฒนาจากไหลจำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ Zc-23, Zc-75, Zc-84 และ Zc-85 ทุกไพรเมอร์ประกอบด้วยลำดับเบสของสาย forward และสาย reverse

### 2. การตรวจสอบแอลลีลโดยใช้ Microsatellite markers

ตรวจสอบการเกิดแอลลีลของขม้นชั้นที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยจำนวน 129 ตัวอย่าง โดยใช้ microsatellite markers จำนวน 13 คู่ไพรเมอร์ เพื่อแยกขนาดของแอลลีลโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\phi$ X - 174 บนเจด polyacrylamide ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส พบว่าแต่ละไพรเมอร์สามารถสังเคราะห์แอลลีลได้แตกต่างกัน (ตารางที่ 5) โดยมีจำนวนแอลลีลต่อโลกัศระหว่าง 2 - 10 แอลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.54 แอลลีลต่อโลกัศ โดยแอลลีลทั้งหมดที่สังเคราะห์ได้มีขนาดระหว่าง 140 - 311 คู่เบส (bp) มีจำนวนแอลลีลที่เกิด polymorphism ทั้งหมด 85 แอลลีล พบว่าไพรเมอร์ CI-38, CI-65, CI-102, CI-104 และ Zc-84 สามารถสังเคราะห์แอลลีลได้มากที่สุดคือ 10 แอลลีล (ภาพที่ 3) ซึ่งมีขนาดระหว่าง 151 - 311 คู่เบส และไพรเมอร์ CI-58 และ Zc-85 สังเคราะห์แอลลีลได้น้อยที่สุดคือ 2 แอลลีล (ภาพที่ 5 และ 8) มีขนาดระหว่าง 151 - 200 คู่เบส และเมื่อนำทุกไพรเมอร์มาคำนวณค่า PIC พบว่ามีค่าระหว่าง 0.011 - 0.775 เฉลี่ยเท่ากับ 0.548 โดยพบไพรเมอร์ CI-58 และ Zc-85 มีค่า PIC เท่ากับ 0.011 และ 0.015 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าเฉลี่ยของ PIC (ตารางที่ 5)

**ตารางที่ 5** ขนาดของแอลลีล จำนวนแอลลีล และค่า Polymorphic Information Content (PIC) ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ที่พัฒนาจากขม้นชั้นและ โพลจำนวน 13 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ขนาดของแอลลีล (base pair, bp)	จำนวนแอลลีล	PIC	
CI-1	151-249	5	0.622	
CI-38	200-249	10	0.733	
CI-54	200- 249	3	0.429	
CI-58	151-200	2	0.111	
CI-61	200-249	6	0.726	
CI-65	249-311	10	0.775	
CI-102	151-200	10	0.520	
CI-104	200-311	10	0.695	
CI-117	51-249	7	0.738	
Zc-23	140-200	6	0.734	
Zc-75	200-249	4	0.500	
Zc-84	151-249	10	0.655	
Zc-85	151-200	2	0.015	
ผลรวม	13	140-311	85	7.128
เฉลี่ย			6.54	0.548