



การใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกสายพันธุ์กระชายในประเทศไทย

The Use of RAPD Technique for Identification of Krachai Ecotype in Thailand

โดย

นิภาพร ก้านทอง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

ประจำปีงบประมาณ 2545

งานห้องสมุดกลางเทวศร์
สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
วันที่..... ๑๑/๑๑/๒๕๕๒.....
เลขทะเบียน..... ๐๐๐๑๔๖.....
เลขหมู่..... ๖๑.....

76 6240

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกสายพันธุ์กระชายด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ ดีเอ็นเอตัวอย่างกระชายทั้งหมด 36 ตัวอย่างจากทุกภาคของประเทศไทยแล้วเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ จำนวน 10 ชนิดและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม UPMGA โดยทำการทดลองที่ คณะเกษตรศาสตร์บางพระ อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี จากการทดลองพบว่าไพรเมอร์ทุกชนิดสามารถจำแนก กลุ่มกระชายตัวอย่างได้ และจัดกลุ่มกระชายตัวอย่างได้ 2 กลุ่มใหญ่ แต่อย่างไรก็ตามกระชายทุกตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงมากจนคล้ายกับมีแหล่งกำเนิดเดียวกัน



ABSTRACT

The objective of this study were to use of RAPD technique for identification of Krachai ecotype in Thailand . DNA from 36 sample of Krachai that collected from every part of Thailand are amplified by 10 primer and relation analysis by UPMGA. This study was conducted at Faculty of Agriculture at Bangpra Sriracha, Chonburi.

The results showed every primer can made different pattern. After comparison of RAPD pattern from each sample can divide into 2 groups. However every sample is closely genetic relation likes it came from same original.



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(ก)
ABSTRACT	(ข)
บทที่ 1	
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตการวิจัย	2
บทที่ 2	
การตรวจเอกสาร	3
วิธีและอุปกรณ์	17
บทที่ 3	
ผลการวิจัยและวิจารณ์	26
บทที่ 4	
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	48
บรรณานุกรม	49



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะทางกายภาพและที่มาของตัวอย่างกระชาย 10 ตัวอย่าง	17
2	การจัดกลุ่มลักษณะทางกายภาพบางประการของกระชาย	20
3	ไพรเมอร์ 10 ชนิดที่ใช้ในการวิจัย	23
4	ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	24
5	ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพรเมอร์ A1	37
6	ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพรเมอร์ A2	38
7	ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพรเมอร์ A3	39
8	ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพรเมอร์ A4	40
9	ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพรเมอร์ A5	41
10	ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพรเมอร์ B1	42
11	ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพรเมอร์ B2	43
12	ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพรเมอร์ B3	44
13	ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพรเมอร์ B4	45
14	ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพรเมอร์ B5	46



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์	7
2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ A1 –A5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคเหนือ	27
3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ B1 –B5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคเหนือ	28
4 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ A1 –A5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	29
5 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ B1 –B5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	30
6 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ A1 –A5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคกลาง	31
7 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ B1 –B5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคกลาง	32
8 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ A1 –A5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคตะวันออก	33
9 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ B1 –B5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคตะวันออก	34
10 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ A1 –A5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคใต้	35
11 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ B1 –B5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคใต้	36
12 Phylogeny tree ของกระชาย	47

บทที่ 1

บทนำ

กระชายเป็นพืชที่คนไทยคุ้นเคยมานานในรูปของเครื่องเทศที่ประกอบร่วมกับอาหารและพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณด้านขับลม ช่วยย่อยอาหาร รักษาปากเปื่อย ขับปัสสาวะ และบำรุงกำลัง โดยธรรมชาติของกระชายเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ง่าย ไม่ต้องการการบำรุงรักษา จึงนิยมปลูกบริโภคกันภายในครัวเรือน หรือเป็นอาชีพของเกษตรกรบางกลุ่มเท่านั้น แต่ในปัจจุบันคนไทยเริ่มใส่ใจในสุขภาพ และมีความนิยมในการบริโภคพืชพรรณและสมุนไพรแทนการใช้อยาที่เป็นสารเคมีมากขึ้น ซึ่งกระชายเป็นสมุนไพรตัวหนึ่งที่ประชาชนให้ความสนใจและเป็นพืชที่มีศักยภาพในการพัฒนาสู่เกษตรอุตสาหกรรมในลักษณะของการแปรรูปเป็นแบบต่าง ๆ อาทิเช่น น้ำพร้อมดื่ม, เครื่องดื่มบำรุงกำลัง หรือผสมในอาหารสำเร็จรูปได้ จึงจำเป็นต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานของกระชายในด้านต่าง ๆ เช่น การจำแนกสายพันธุ์, การเขตกรรม หรือปริมาณของสารสำคัญในกระชายเป็นต้น ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะมีประโยชน์ทั้งทางด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม

การศึกษาข้อมูลด้านการจำแนกสายพันธุ์กระชายในอดีตที่ผ่านมา ใช้วิธีการศึกษาลักษณะภายนอกของพืช เช่น ดอก, ผล หรือ เมล็ด ซึ่งวิธีนี้สามารถจำแนกพืชในสกุลกระชายได้ดี แต่ยังไม่สามารถจำแนกเฉพาะกระชายชนิดที่ใช้ในการบริโภคได้ จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่นที่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์และความแตกต่างของกระชายชนิดที่ใช้บริโภค ซึ่งเทคนิคที่เหมาะสมวิธีหนึ่ง คือ การใช้เทคนิค RAPD เพราะเป็นเทคนิคที่ศึกษาความแตกต่างในระดับของดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม สามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตภายในสายพันธุ์เดียวได้ มีการใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาจำแนกพืชภายในชนิดเดียวกัน เช่น ส้มโอ, มะม่วง, พริก และ หญาแฝก เป็นต้น จึงใช้เทคนิค RAPD เพื่อจำแนกสายพันธุ์กระชายสำหรับเป็นข้อมูลในการพัฒนาสายพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

จำแนกสายพันธุ์กระชายและหาความหลากหลายของสายพันธุ์กระชายในประเทศไทย

ขอบเขตการวิจัย

การศึกษานี้หาวิธีการสกัดดีเอ็นเอของกระชายที่เหมาะสมที่สุด โดยเปรียบเทียบวิธีการอย่างน้อย 3 วิธี เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณที่ดีพอสำหรับการเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง PCR และสามารถหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการจำแนกสายพันธุ์กระชายด้วยเทคนิค RAPD ได้



บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

กระชายเป็นผักพื้นบ้านชนิดหนึ่งที่นิยมใช้เป็นเครื่องเทศในการปรุงอาหารหลายชนิด นอกจากนี้กระชายยังมีสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารและช่องท้อง เช่น แก้โรคท้องอืดท้องเฟ้อ ท้องร่วงท้องเดิน บิด จุกเสียดแน่น เป็นต้น แต่ภายหลังสรรพคุณที่ทำให้มีคนสนใจกระชามากขึ้น คือ เรื่องบำรุงกำลังไปจนถึงบำรุงกำหนัด และเพราะสรรพคุณประการนี้เองที่ทำให้พืชตระกูลกระชายเป็นพืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

กระชาย ถูกจัดอยู่ในพรรณพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) และอยู่ในสกุล *Boesenbergia* หรือสกุล กระชาย ซึ่งได้มีการศึกษาทบทวนพืชสกุลนี้และพบว่ามีขึ้นอยู่ในประเทศไทย 13 ชนิด และในจำนวนนี้มีอยู่ 3 ชนิดที่เป็นพืชพันธุ์ใหม่ พืชสกุลนี้มีต้นขนาดเล็กสูงไม่เกิน 60 เซนติเมตร

ตัวอย่างชนิดพืชในสกุลกระชายที่พบในประเทศไทย คือ

1. *Boesenbergia basispicata* Larsen ex Sirirugsa “กระชายเขาหลวง”

เป็นพืชพันธุ์ใหม่ชนิดหนึ่งใน 3 ชนิดดังกล่าวข้างต้น พบครั้งแรกที่เขาหลวง นครศรีธรรมราช ลักษณะพืชขึ้นเป็นกอไรโซม ผอมบาง ต้นเหนือดินสูง 40-60 เซนติเมตร กาบใบสีเขียวเรื่อแดง ช่อดอกสีแสดคล้ำ ดอกสีขาวและมีจุดประสีแสดบริเวณตรงกลาง เหมาะสำหรับเป็นไม้ประดับ

2. *Boesenbergia curtisii* (Bak.) Schltr.

พบครั้งแรกที่เกาะลังกาวิ มาเลเซีย ชอบขึ้นบริเวณเขาหินปูน ในประเทศไทยพบมากที่บริเวณภาคใต้ตั้งแต่ชุมพรลงไปถึงสตูล ส่วนภาคอื่นๆ ที่พบเช่น ชลบุรี กาญจนบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ช่อดอกเกิดกลางลำต้นระหว่างกาบใบอยู่ในสุดประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมากอัดกันแน่น อาจพบได้ครั้งละ 1-3 ดอก

3. *Boesenbergia longipes* (King & Prain) Schltr. นิลญี่

พบครั้งแรกที่เปรู มาเลเซีย ในประเทศไทย ภาคเหนือพบที่ตาก ภาคใต้พบที่นครศรีธรรมราช และตรัง ลักษณะเด่นคือ กาบใบเป็นร่อง ดอกสีขาวมีจุดสีแสดเรียงเป็นแถวบริเวณกลางกระพุ้งกลีบ

4. *Boesenbergia plicata* (Ridl.) Holtt.

พบครั้งแรกที่เกาะลังกาวิ มาเลเซีย ในประเทศไทยพบมากในบริเวณภาคใต้ กระจัดกระจายทั่วไปตั้งแต่ชุมพรถึงสตูล ในภาคอื่นๆ ที่พบเช่น แม่ฮ่องสอนและชลบุรี เป็นต้น และชอบขึ้นอยู่

บริเวณเขาหินปูน ลักษณะเด่นของพืชชนิดนี้คือ ช่อดอกซึ่งเกิดอยู่ระหว่างกาบใบคู่ในสุดนั้นมีขนาดยาว อาจยาวถึง 25 เซนติเมตร และนับว่ายาวที่สุดในสกุลนี้ มีต้นที่ออกดอกเป็นสีเหลืองและบางต้นก็ออกดอกเป็นสีแดง ซึ่งควรจะได้มีการศึกษาต่อไปว่าสามารถจะแยกเป็นคนละชนิดหรือสายพันธุ์ได้หรือไม่

5. *Boesenbergia prainiana* (Bak.) Schltr. กระตืออแดง

พบครั้งแรกที่เปรัก มาเลเซีย ขอบพื้นที่ใกล้น้ำหรือลำธารในประเทศไทยพบที่จังหวัดนราธิวาส และปัตตานี ลักษณะของช่อดอกคล้ายคลึงกับ “กระชายเขาหลวง” แต่เกิดอยู่ระหว่างกาบใบคู่และมีสีเขียว กาบใบสั้นและแผ่นใบกว้างกว่าแผ่อยู่ใกล้ผิวดิน

6. *Boesenbergia pulcherrima* (Wall.) Kuntz. บุษบง

พบครั้งแรกที่เมืองทวาย ประเทศพม่า ในประเทศไทยที่พบได้เกือบทั่วทุกภาค แต่กระจายอยู่มากบริเวณภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ พะเยา และตาก เป็นต้น ลำต้นเหนือดินค่อนข้างพอม อาจสูงถึง 50 เซนติเมตร บางครั้งอาจโน้มเอียงลงสู่พื้นดิน ช่อดอกถูกโอบหุ้มอยู่ด้วยกาบใบคู่ในสุด ดอกมีสีขาวและแต้มด้วยแถบสีแดง

7. *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. กระชาย

เป็นพืชพื้นเมืองแถบอินโดนีเซียและมาเลเซีย และปลูกกันทั่วไปในประเทศไทยจนกลายเป็นพืชเศรษฐกิจอย่างหนึ่ง เนื่องจากไโรโซมและรากของพืชชนิดนี้มีกลิ่นหอม นิยมนำมาใช้เป็นเครื่องปรุงแต่งรสอาหาร นอกจากนั้นยังใช้เป็นพืชสมุนไพรด้วย ช่อดอกถูกโอบหุ้มอยู่ด้วยกาบใบคู่ในสุดจนเกือบมิด ดอกบานจะโผล่ให้เห็นชัดเจนมีสีม่วง (พวงเพ็ญ , 2537)

กระชายที่ใช้บริโภคในประเทศไทยมีอยู่ 3 ชนิดคือ กระชายเหลือง, กระชายแดง และกระชายดำ โดยกระชายดำนั้นจะอยู่ในสกุลที่แตกต่างไปจากกระชายเหลืองดังรายละเอียดต่อไปนี้

กระชายเหลือง

ชื่อสามัญ/ชื่อภาษาอังกฤษ *Boesenbergia*

ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Boesenbergia rotunda* (Linn.) Mansf.

วงศ์ Zingiberaceae

ชื่ออื่น/ชื่อท้องถิ่น เช่น กระเอน , ระเอน (เหนือ) , จิงทราย (มหาสารคาม) ,

ว่านพระอาทิตย์ (กทม.) , จี๊ปู ชีฟู (ฉาน-แม่ฮ่องสอน)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กระชายเป็นพืชล้มลุก มีอายุได้หลายปี สูงประมาณ 2-3 ฟุต มีกาบใบหุ้มลำต้นตลอด ใบเลี้ยงเดี่ยวสีเขียวเรียวใหญ่ ก้านใบและลำต้นมีสีแดง เป็นพืชประเภทผักยืนต้น แต่ก้านใบบนดินจะ

แห้งไประยะหนึ่งและเหลือลำต้นใต้ดินที่จะงอกงามต่อไปอีก มีลำต้นเป็นหัวกลมอยู่ใต้ดิน มีเหง้าใต้ดินเป็นรูปคล้ายกระสวยจำนวนมาก เนื้อในของเหง้าและรากมีสีเหลือง ส่วนรากเก็บอาหารแยกเป็นกระเปาะจากเหง้าเรียกว่ากระโปกหรือนมกระชาย มีราก 2 ชนิด คือรากฝอย และรากชนิดเป็นรูปกลมยาวส่วนกลางป่อง (tuberous rootstock) มักเรียกกันว่าหัว ก้านใบส่วนล่างติดอยู่กับลำต้นพุ่มตรงขึ้นไป ก้านใบเป็นกาบบางโดยมากหุ้มสลับกันอยู่ 2 ข้าง ก้านยาวประมาณ 2 เท่าของใบ ใบเป็นรูปคล้ายใบหอกหรือใบพาย ขอบเรียบ เส้นฝอยของใบแผ่กระจายจากเส้นกลางใบคล้ายขนนก ส่วนที่อยู่เหนือดินประกอบด้วยโคน , ก้าน , ใบ กาบใบจะมีสีแดงเรื่อๆ แผ่นใบเป็นรูปวงรี ปลายแหลม กว้าง 4.5-10 เซนติเมตร ยาว 15-30 เซนติเมตร ด้านในของก้านใบมีร่องลึก ดอกออกเป็นช่อ กลีบดอกสีขาวอมชมพู ซึ่งดูแล้วสวยงามมาก โดยดอกจะแทรกอยู่ระหว่างกาบใบที่โคนต้น (ดวงรัตน์, 2541) มีกลิ่นจืดที่ลำต้นใต้ดินและที่รากที่เป็นหัวมากกว่า กลิ่นของหัวกระชายเป็นกลิ่นเฉพาะของพืชชนิดนี้ เนื่องจากมีวัตถุหอมระเหยตามธรรมชาติอยู่ในนั้น พืชตระกูลกระชายเจริญเติบโตได้ดีในที่ที่มีอากาศร้อนชื้นและเขตอบอุ่น ในประเทศไทยพบปลูกอยู่กระจายทั่วทุกภูมิภาค (บุญยัติ , 2527) ชอบดินปนทรายไม่ชอบดินและ ฤดูปลูกคือฤดูร้อน ราวเดือนเมษายน (เรณู , 2541)

กระชายแดง

อยู่ใน วงศ์ขิง (Zingiberaceae) หัวเลื้อยยาวออกจากหน่อไปไกล ลักษณะต้นเดิมเหมือนขมิ้นขาว มีคู้มกลมๆที่ราก ใบเหมือนใบขมิ้น ต้นแดงท้องใบแดง หน้าใบเขียวหม่นและเป็นนวลเมื่อถูกแสงแดดและจะสะท้อนแสงได้

กระชายดำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Kempferia parviflora* Wall.ex Bakm. อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เช่นเดียวกับกระชายเหลือง เป็นพรรณไม้ล้มลุกลำต้นมีความสูงประมาณ 90 เซนติเมตร ส่วนกลางของลำต้นเป็นแกนแข็ง มีกาบหรือโคนใบหุ้ม ใบมีกลิ่นหอม กาบใบแทงขึ้นจากหัวในดิน ออกเป็นรัศมีติดผิวขนาดใบกว้าง 7-9 เซนติเมตร ยาว 30-35 เซนติเมตร ดอกสีม่วงแดงเป็นช่อ กลีบรองและกลีบดอกเชื่อมติดกัน มีรูปลักษณะเป็นท่อม้วน โดยเชื่อมติดกันเป็นท่อยาว เกสรตัวผู้เหมือนกับกลีบดอก อับเรณูอยู่ใกล้ปลายท่อเกสรตัวเมียมีขนาดยาว เล็ก ยอดของดอกเป็นรูปปากแตรเกลี้ยงไม่มีขน เหง้ามีลักษณะเป็นหัวใต้ดินคล้ายพริกขี้หนู ข่า มีสีม่วงเข้มหรือสีดำ และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวของเนื้อด้านใน (แสงไทย , 2544 ,ก.)

ประโยชน์ของกระชาย

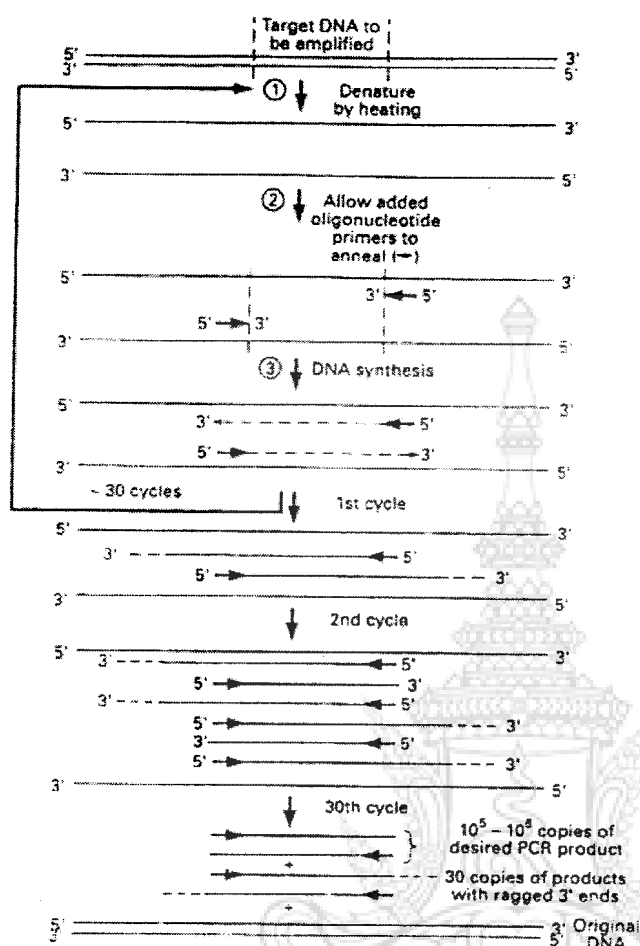
ในเหง้าของพืชตระกูลกระชายมีน้ำมันหอมระเหยประมาณร้อยละ 0.08 ในน้ำมันหอมระเหยมีสารหลายชนิด เช่น 1,5-Cineol , Boesenbergia A , dl-Pinostrobin Camphor เป็นต้น และยัง

มีสาร Flavonoid และ Chromene ด้วย สารจากเหง้าของพืชตระกูลกระชายนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis* , แบคทีเรียในลำไส้ น้ำมันหอมระเหยช่วยขับลม ช่วยให้กระเพาะและลำไส้เคลื่อนไหว (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2542) สารที่พบในส่วนของน้ำมันหอมระเหยและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ คืออัลฟาไพเนน , ลินาลูล, เจอรานิออล, โอซิมีน แคมเฟอร์ บอร์นีออล และเมธิลซินนามेट ส่วนกลไกในการยับยั้งการเจริญของสารดังกล่าวนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด (บัญญัติ , 2527) ซึ่งการนำไปใช้ประโยชน์ของกระชายสามารถแบ่งได้เป็น 2 ด้าน คือ ในด้านการประกอบอาหาร และทำผลิตภัณฑ์ต่างๆ และในด้านของสมุนไพร

เทคนิคพีซีอาร์

จากการศึกษากระบวนการนี้ทำให้ทราบกลไกการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส เอนไซม์จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้โดยต้องมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นต้นแบบ (template) และมีส่วนหนึ่งเป็นสายคู่ โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสจะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอตรงจุดที่ต่อเนื่องกันระหว่างบริเวณที่เป็นสายเดี่ยวกับบริเวณที่เป็นสายคู่ โดยเกาะทางด้านปลาย 3 ของบริเวณที่เป็นสายสั้น ขณะเดียวกันก็จะจับกับโมเลกุลของนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) เพื่อนำมาต่อกับปลาย 3 ของดีเอ็นเอสายที่สั้นกว่า โดยอาศัยพลังงานที่มาจากการสลายพันธะของหมู่ฟอสเฟตนั่นเอง เอนไซม์จะเคลื่อนที่ไปตามความยาวของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นต้นแบบแลเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3 ของสายดีเอ็นเอที่สั้นกว่าไปเรื่อยๆจนได้เป็นดีเอ็นเอสายที่สมบูรณ์

ในห้องปฏิบัติการก็สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ โดยมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวสายหนึ่งที่จะใช้เป็นต้นแบบเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายคู่ที่เป็นคู่สม ใส่สารละลายดีเอ็นเอด้านแบบในหลอดทดลอง เติมเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสและนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dGTP, dCTP และ dTTP) แต่องค์ประกอบดังกล่าวนี้ยังไม่เพียงพอสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ต้องมีจุดเริ่มต้นโดยมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวสั้น ๆ เข้าไปจับคู่กับดีเอ็นเอด้านแบบที่บริเวณใดบริเวณหนึ่งก่อน เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสจึงจะเข้าไปเกาะและเริ่มสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอสายสั้นๆนั้นโดยทิศทางและตำแหน่งในการสังเคราะห์จะต่อจากปลาย 3' ของดีเอ็นเอสายสั้นไปเรื่อยๆ ดีเอ็นเอสายสั้นที่เป็นส่วนเริ่มต้นนี้เรียกว่าไพรเมอร์ (primer) โดยเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ใดๆ ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของบริเวณที่ต้องการ โดยปลาย 3' ของไพรเมอร์มีทิศทางเข้าสู่ส่วนที่ต้องการสังเคราะห์ ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์
ที่มา: สุรินทร์ (2545)

ในกรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบเป็นเกลียวคู่ ไพริเมอร์ไม่สามารถจะเข้าไปจับได้ และเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสก็ไม่สามารถจะสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้ ต้องทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบเกลียวคู่เสียสภาพกลายเป็นสายเดี่ยว (denature) ไพริเมอร์จึงจะมีโอกาสเข้าไปเกาะ (anneal) ตรงบริเวณที่มีเบสคู่สม และเอนไซม์จึงจะสามารถนำนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่มาสังเคราะห์ต่อจากไพริเมอร์ (extension) ได้ โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เช่น จากเดิมมี 1 โมเลกุลจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 โมเลกุล ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาลำดับกัน (denaturation-annealing-extension) หลายๆรอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2, 4, 8, ... เท่าไปเรื่อยๆจนถึง 2^n เท่าเมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ (ภาพที่ 4)

ถ้าใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจากแบคทีเรีย *E. coli* หรือจากเซลล์อื่น เมื่อทำให้ดีเอ็นเอเสียหายโดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 95°C เอนไซม์ก็จะเสียหายด้วยจึงต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงไป ในปฏิกิริยาทุกรอบของการสังเคราะห์ ต่อมาเกิดการค้นพบเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จากแบคทีเรียในน้ำพุร้อน *Thermus aquaticus* เอนไซม์นี้สามารถทนความร้อนได้สูง ทำให้การดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์สะดวกขึ้น ไม่ต้องมีการเติมเอนไซม์ และสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องอัตโนมัติได้ โดยควบคุมอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอน ทำซ้ำ 30 – 40 รอบ ก็สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้เป็นล้านๆ เท่า โดยใช้เวลาเพียง 3 – 4 ชั่วโมงเท่านั้น สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนนั้น

ขั้นที่ 1 คือ ทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย มักใช้ที่ $94 - 95^{\circ}\text{C}$ ส่วนขั้นที่สองทำให้ไพรเมอร์จับตัวกับดีเอ็นเอต้นแบบ จะอยู่ในช่วง $25 - 65^{\circ}\text{C}$ ขึ้นกับขนาดและองค์ประกอบของเบสในไพรเมอร์ที่ใช้ ทั้งนี้เพราะขนาดและองค์ประกอบของเบสมีผลต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการแยกเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยว

เมื่อทราบลำดับเบสของยีนใดๆ แล้ว สามารถสังเคราะห์ไพรเมอร์ 2 ชนิดสำหรับส่วนหัวและท้ายของยีนนั้น นำมาใช้เพิ่มปริมาณส่วนของยีนดังกล่าวเพื่อแยกยีนนั้นจากจีโนมหรือจากดีเอ็นเอโดยรวมได้ โดยอาจใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการแยกส่วนของยีนใดๆ ที่ทราบลำดับเบสเพื่อมาใช้โคลนยีนใช้เป็นโพรบเพื่อตรวจหาชิ้นที่มีความสัมพันธ์กัน ใช้ตรวจโพลีเมอร์เฟสในสิ่งมีชีวิต ใช้ในการตรวจสอบจีโนมไทป์ ตรวจหาเชื้อโรคที่เกิดกับคน สัตว์ หรือพืช เป็นต้น

เนื่องจากเทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ไวมาก สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นล้านๆ เท่าได้อย่างรวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยก็สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอก เช่น จากอากาศ ผิวหนัง ผม เป็นต้น เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าวจึงควรทำพีซีอาร์ในบริเวณที่สะอาดไม่ปะปนกับการทดลองอื่น อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ควรสะอาดมีคุณภาพสูง แยกเด็ดขาดจากการทดลองอื่น สวมถุงมือในการปฏิบัติงาน และมีหลอดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ (negative control) ในการทดลองทุกครั้ง การปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอกนี้เป็นปัญหาที่สำคัญมากในการทดลองเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยๆ เช่น ตรวจดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากอาหาร ดีเอ็นเอของแบคทีเรียหรือไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในคน เป็นต้น ในการทำพีซีอาร์ต้องใช้สารเคมีต่างๆ ดังนี้

1. บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา ซึ่งมักจะมาพร้อมกับเอนไซม์ *Taq* polymerase โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่จะใช้จริง (10x buffer) ซึ่งจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา
2. dNTP ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2

มิลลิโมลาร์ โดยอาจซื้อสำเร็จหรือซื้อมาแต่ละชนิด แล้วจึงนำมารวมกันให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ ในปฏิกิริยาจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์

3. ไพริเมอร์ ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ มีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยไพริเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้คู่กันควรมีส่วนประกอบของเบส G+C เท่ากันเพื่อให้ค่า T_m เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน และไม่ควรใช้ไพริเมอร์ที่มีลักษณะปลาย 2 ข้างเป็นคู่สมกัน (palindrome sequence) ทั้งภายในไพริเมอร์เดียวกันและระหว่างไพริเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้คู่กัน แต่ในบางกรณีก็พบว่าอาจจะใช้ไพริเมอร์ที่มีลักษณะไม่เหมาะสมดังกล่าวได้บ้าง การออกแบบไพริเมอร์อาจทำได้จากลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณโดยตรงหรือใช้โปรแกรมสำเร็จรูปก็ได้ เมื่อสังเคราะห์ไพริเมอร์เรียบร้อยแล้ว จึงนำมาละลายในน้ำหรือ TE buffer ให้มีความเข้มข้น 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (หรือ 5 ไมโครโมลาร์) ปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาคือให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 - 2.0 ไมโครโมลาร์

4. ดีเอ็นเอเป้าหมาย ใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีนัก เช่น ดีเอ็นเอจากหยดเลือด เนื้อเยื่อที่เก็บในพาราฟิน เป็นต้น แต่ถ้าใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีจะได้ผลผลิตมากกว่า ปริมาณดีเอ็นเอใช้ได้ตั้งแต่ 5-500 นาโนกรัม โดยทั่วไปนิยมใช้อยู่ในช่วง 10-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งอาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์ก็ได้ แต่ส่วนใหญ่จะแยกต่างหากเพื่อให้ปรับได้ในปริมาณที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอแต่ละชนิด เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีเมอเรส และมีรายงานว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อปฏิกิริยามาก ดังนั้นในการทดลองกับตัวอย่างชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน จึงควรทดลองปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ก่อนเพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ 1.5-10 มิลลิโมลาร์

6. เอนไซม์ เนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอเสถียรด้วยความร้อน เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ใช้จึงเลือกเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ (thermostable DNA polymerase) เอนไซม์ชนิดแรกแยกได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* YT1 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 - 80 °C มีกิจกรรมได้สูงสุดที่ pH 7.3 - 8.3 ชนิดที่ 2 แยกได้จากแบคทีเรียเดียวกันเป็นชนิดที่คนใช้กันมาก รู้จักกันในชื่อ *Taq* polymerase ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 - 80 °C และต่อมาสามารถแยกเอนไซม์ได้อีกหลายชนิดจากแบคทีเรียต่างๆ โดยทุกชนิดที่แยกได้ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์เพียงสายเดียว (monomer) ขนาดอยู่ระหว่าง 61 - 100 กิโลดาลตัน

ความแตกต่างของเอนไซม์แต่ละชนิดคือการมีคุณสมบัติตัดดีเอ็นเอจากปลาย (exonuclease activity) เพราะเอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอ็นเอจากปลาย 3' (3' → 5' exonuclease) จะสามารถกำจัดนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ผิดพลาดได้ (proofreading)

การเลือกใช้เอนไซม์ในการทำพีซีอาร์เบื้องต้นจะพิจารณาจากความสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ยาวมากน้อยเพียงใดจากการเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละครั้ง (processivity) และ ความถูกต้องในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (fidelity) เช่น *Taq* polymerase มีอัตราการสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดพลาดเท่ากับ 2×10^{-5} ส่วน *Pfu* polymerase มีค่าเพียง 1.6×10^{-6} ในการทำพีซีอาร์เพื่อการวิเคราะห์ผลทางคุณภาพอาจเลือกใช้เอนไซม์ชนิดใดก็ได้ แต่ถ้าต้องการความถูกต้อง เช่น การโคลนยีน การตรวจสอบจีโนมไทป์ของสเปิร์ม การวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เพียงตัวเดียว ควรเลือกใช้เอนไซม์ที่มีระบบการตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดคือมี (3' → 5' exonuclease proofreading) เช่น เอนไซม์ *Mth*, *pfu*, *Tac* และ *Tma* เป็นต้น

เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสทนความร้อนที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ชนิดแรกที่นิยมใช้กัน คือ *Taq* polymerase แม้ว่าจะมีอัตราการสังเคราะห์เบสผิดพลาดสูงกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น แต่ก็ยังนิยมใช้มากเนื่องจากมีราคาถูกกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น และได้มีการตัดโพลิเพปไทด์ของเอนไซม์นี้ออกไปบางส่วน ทำให้ทนความร้อนได้มากขึ้น เรียกชื่อว่า Stoffel fragment ซึ่งทำงานได้ในช่วงความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนที่กว้างขึ้นจึงนิยมใช้ในการทำอาร์เอพีดี

อาร์เอพีดี (RAPD:Random amplified polymorphic DNA)

อาร์เอพีดีเป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์อีกแบบหนึ่งโดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary) วิธีการนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่นได้อีก เช่น arbitrary primed PCR (AR-PCR), DNA amplification fingerprinting (DAF) หรือ multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP) ซึ่งแต่ละวิธีที่เรียกนี้มีข้อแตกต่างกันบ้างคือขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้ แต่หลักการไม่แตกต่างกันคือใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม มีนักวิจัยบางกลุ่มใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดพร้อมกันซึ่งก็ได้เช่นเดียวกัน แต่ที่นิยมคือใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวและใช้วิธีแบบที่เรียกว่า อาร์เอพีดีซึ่งตั้งขึ้นโดย William และคณะในปี ค.ศ.1990 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอากาโรสเจลและย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

DAF ใช้ครั้งแรกโดย Caetano-Anolles และคณะ ในปี ค.ศ.1991 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียง 5-8 นิวคลีโอไทด์และใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณโดยใช้อุณหภูมิ 2 ระดับเท่านั้น แทนที่จะใช้ 3 ระดับแบบที่ใช้กับพีซีอาร์ทั่วไป แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในโพลีอะครีลาไมด์เจลและเจลและย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

AP-PCR ทำโดย Welsh และ McClelland ในปี ค.ศ.1990 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 20 หรือมากกว่า 20 นิวคลีโอไทด์ ใช้โปรแกรมเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 โปรแกรม คือใช้อุณหภูมิสำหรับ annealing ต่ำในรอบแรก แล้วจึงเพิ่มให้สูงขึ้นอีก 30-40 รอบ ในการพีซีอาร์ช่วงหลังใช้นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีลงไป แล้วจึงแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยโพลีอะครีลาไมด์เจล ตรวจสอบผลโดยทำออโตเรดิโอกราฟ ซึ่งนับเป็นวิธีที่ยุ่งยากที่สุด

วิธีการเอพิดีของ William และคณะ ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสเป็นคู่สมกับ โดยไม่จำเป็นต้องทราบไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอส่วนใดบนโครโมโซมใด โอกาสที่จะพบลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์คือ 1 ใน 4^{10} โดยประมาณ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอโดยเกิดคู่สมได้ 100 เปอร์เซ็นต์และนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดมีส่วนเท่าๆกันในจีโนม สามารถประมาณค่าของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้นจากไพรเมอร์ 1 ชนิดได้จากสมการ

$$b = (2,000 \times 4^{-2n}) \times C$$

เมื่อ b คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่คาดหมายในหนึ่งไพรเมอร์ n คือความยาวของไพรเมอร์ คิดเป็นจำนวนนิวคลีโอไทด์ และ C คือค่าขนาดของจีโนมหรือค่า C value ตัวอย่างเช่น ข้าวโพดมีจีโนมขนาด 6×10^9 คู่เบส นำมาทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จะได้แถบดีเอ็นเอประมาณ 10.9 แถบ แต่จากการทดลองของนักวิจัยหลายท่านพบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไม่ได้ขึ้นกับขนาดของจีโนม พืชที่มีจีโนมขนาดใหญ่อาจเกิดแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าพืชที่มีจีโนมขนาดเล็กก็ได้ การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน ($5' \rightarrow 3'$) จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงดังกล่าวได้ แต่ถ้าไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดียวกันในทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายแต่ทิศทางแยกออกจากกัน หรือเกาะได้ใน 2 สายที่ห่างไกลกันมาก แม้ทิศทางจะเข้าหากันก็ไม่สามารถจะเกิดผลผลิตได้ ความแตกต่างของแถบอาร์เอพีดี หรือโพลีเมอร์พีซิมที่เกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่างอาจเกิดจาก

1. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่มากสอดแทรกในระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะทำให้ไพรเมอร์ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

2. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอส่วนที่เป็นที่เกาะกับไพรเมอร์หายไปหนึ่งตำแหน่งหรือทั้ง 2 ตำแหน่งทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอจากบริเวณดังกล่าว

3. มีการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ทำให้ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายไม่ได้จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

4. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามาหรือหายไป ทำให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป

โพลิมอร์ฟิซึมของอาร์เอพีดีมักเกิดขึ้นในลักษณะการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอของพืชพบทั้งจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรีย ในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ อาร์เอพีดีพบว่าแถบดีเอ็นเอบางส่วนประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนไมโทคอนเดรีย และน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์มาจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ดังนั้นแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD marker) ส่วนใหญ่จึงมาจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส ซึ่งมีการถ่ายทอดมาจากทั้งฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่ แม้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดีจะทำได้ง่าย รวดเร็วและให้ข้อมูลได้มาก แต่ก็มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ บางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิมเนื่องจากอาร์เอพีดีมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะต่างๆ จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากอาร์เอพีดียังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโมโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้

ปรีชา(2542) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอของข้าวหอมพื้นเมือง 9 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์แบบสุ่มเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในยีนของข้าวที่ศึกษาจำนวน 6 ไพรเมอร์นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลอง นำมาแยกในวุ้นโดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และศึกษารูปแบบของแถบของดีเอ็นเอ ผลจากการศึกษาพบว่า จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดรวม 42 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 341 – 1400 คู่เบส และดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างจีโนมของข้าวทั้ง 9 พันธุ์ มีจำนวน 23 แถบ (54.8%) และจากการประเมินระดับความหลากหลายของดีเอ็นเอ พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.01 – 0.64 ซึ่งเป็นระดับความหลากหลายของดีเอ็นเอที่มีความผันแปรมากนั้นอธิบายได้ว่ามีสาเหตุมาจากข้าวทั้ง 9 พันธุ์นี้มีฐานพันธุกรรมที่กว้าง

ปรีชา (2543) การคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายของดีเอ็นเอของพืชสกุลกระเจียวโดยใช้เทคนิค RAPD – PCR จากการศึกษาที่มีการใช้เงื่อนไขของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มในยีนโนมของกระเจียวจำนวน 7 ตัวอย่าง ซึ่งใบประดับมีสีแตกต่างกันโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 20 แบบ พบว่าไพรเมอร์จำนวน 19 แบบ (95%) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเงื่อนไขที่ใช้ทดลองได้ และเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกจากไพรเมอร์กลุ่มนี้จำนวน 7 แบบ (OPAM – 01, OPAM – 03, OPAM – 12, OPAM – 18, OPB – 01, OPB – 14 และ , OPB – 05) ที่ให้แถบชัดเจนและเกิดซ้ำได้มาศึกษาเพื่อประเมินความหลากหลายของดีเอ็นเอและระบุชนิด พบว่าแถบที่เกิดขึ้นมีทั้งที่แสดงถึงความแตกต่างของดีเอ็นเอและแถบที่แสดงถึงความเป็นเอกลักษณ์ของพืชชนิดนี้ ดังนั้น ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค RAPD – PCR ที่ใช้เงื่อนไขในการทดลองและไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้มีศักยภาพในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอและสามารถใช้แถบของดีเอ็นเอเครื่องหมายในการระบุชนิดของกระเจียว เพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมข้ามชนิดต่อไป

บุษราคัมและพัฒนา (2544) จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหญ้าแฝกในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มความยาว 10 นิวคลีโอไทด์จำนวน 6 ไพรเมอร์ และเมื่อนำข้อมูลการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมาศึกษาความสัมพันธ์ของหญ้าแฝกด้วยโปรแกรม NT - SYS และสร้าง phylogenetic tree ที่เหมาะสม สามารถจัดจำแนกหญ้าแฝกทั้ง 42 กลุ่มพันธุ์ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ได้อย่างชัดเจน โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยหญ้าหอม 24 กลุ่มพันธุ์ ส่วนอีกกลุ่มประกอบด้วยหญ้าแฝกคอน 18 กลุ่มพันธุ์

ธีระชัยและนฤมล (2544) จากการศึกษาการใช้เทคนิค RAPD ตรวจสอบส้มโอพันธุ์สายน้ำผึ้งและขาวน้ำผึ้ง โดยได้ใช้ไพรเมอร์ 144 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส้มโอพันธุ์สายน้ำผึ้งด้วยเทคนิค RAPD พบว่าไพรเมอร์ 131 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หรือคิดเป็น 90.97 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ 36 ชนิด จากกลุ่มนี้ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันคิดเป็น 27.48 เปอร์เซ็นต์ โดยคำนวณค่า genetic similarity ได้ 0.785 จึงยืนยันได้ว่าส้มโอพันธุ์สายน้ำผึ้งและพันธุ์ขาวน้ำผึ้งไม่ใช่พันธุ์เดียวกัน

ธีระชัย (2541) จากการศึกษาการพัฒนาเทคนิค RAPD เพื่อจำแนกและรองรับสายพันธุ์ส้มโอพบว่าส้มโอทั้ง 18 สายพันธุ์เมื่อสกัดแยกดีเอ็นเอและนำมาเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ 30 ชนิด พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันและสามารถแยกได้อย่างชัดเจน และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของดีเอ็นเอของแถบดีเอ็นเอแต่ละสายพันธุ์ พบว่าสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของส้มโอได้ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม A และกลุ่ม B โดยมี สายพันธุ์

ขาว แก้ว ขาวจีบ และขาวพวง แยกออกไปไม่เข้ากลุ่มใด ดังนั้นจึงใช้เทคนิคอาร์เอพีดีจำแนกสายพันธุ์ส้มโอได้

การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ

พืชเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญของมนุษย์ มนุษย์ได้ใช้พืชเพื่อการดำรงชีวิตทั้งโดยตรงและทางอ้อม เป็นแหล่งให้อาหารเลี้ยงชีวิต ให้เครื่องนุ่งห่ม ให้ที่อยู่อาศัยแก่มนุษย์ พืชหลายชนิดมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรค เป็นแหล่งพลังงานให้มนุษย์ได้ใช้ ชีวิตของมนุษย์ดำรงอยู่ไม่ได้ถ้าขาดพืช นับแต่เกิดสิ่งมีชีวิตขึ้นมาบนพื้นโลก ประมาณ 3 พันล้านปีมาแล้ว ประมาณกันว่ามีพืชเกิดขึ้นในโลกมากกว่า 4 พันล้านชนิด จากจำนวนดังกล่าวนี้ได้มีผู้คาดคะเนว่ามีเหลืออยู่เพียง 4 ล้านชนิดเท่านั้น ซึ่งคิดเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ของพืชที่มีอยู่ในโลก จำนวนพืชกว่า 99.9 เปอร์เซ็นต์ ได้สูญหายไปเพราะไม่สามารถดำรงได้

ยีน (gene) หรือดีเอ็นเอซึ่งเป็นสายพันธุ์กรรม เป็นตัวควบคุมบังคับ กำหนดหน้าที่การทำงานของพืชแต่ละชนิดให้สามารถเจริญเติบโต สร้างเซลล์สืบพันธุ์ มีการผสมพันธุ์ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ที่ต่างชนิดกัน และสร้างเมล็ดเพื่อให้เกิดลูกหลานใหม่ต่อไป พืชที่ไม่สามารถดำรงเผ่าพันธุ์ไว้ได้ แสดงว่า กลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมลักษณะต่างๆ ของพืชนั้นล้มเหลวในการทำหน้าที่คุ้มครองป้องกันหรือช่วยเหลือ ให้พืชได้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปได้ พืชดังกล่าวจึงสูญพันธุ์ไป

สำหรับพืชที่มีความสามารถในการรักษาเผ่าพันธุ์ไว้ได้ จำเป็นต้องมีกลุ่มของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมให้พืชนั้น สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ สภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ สภาพการเพาะปลูกที่เปลี่ยนไป การเพิ่มขึ้นของจำนวนและชนิดของประชากรแมลง ตลอดจนโรคพืชชนิดใหม่ๆ ที่เกิดขึ้นมาตลอดเวลา

ปัจจัยสำคัญในการที่ช่วยให้พืชสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ คือ การแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variability) ซึ่งเกิดขึ้นและสะสมอยู่ในพืช พืชได้การแปรผันทางพันธุกรรมจากการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติเรียกว่า การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) พืชทุกชนิดมีโอกาสกลายพันธุ์ได้ตลอดเวลา เกิดได้ทุกเซลล์ และทุกระยะของการเจริญเติบโต อัตราการกลายพันธุ์เป็นคุณสมบัติเฉพาะของยีนและของพืชแต่ละชนิดนอกจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติแล้ว พืชได้การแปรผันทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้นจากการที่มีการอพยพ (migration) ของพืชใหม่ๆ เข้ามาในกลุ่มของประชากรเดิม มีการผสมพันธุ์ (genotype) ของพืชที่ต่างชนิดกันทำให้เกิด

จีโนไทป์ใหม่ ขึ้นมาจากยีนรีคอมบิเนชัน (gene recombination) ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ของพืชที่ต่างชนิดกัน

ปัจจัยที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ

การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้โดยที่ไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน เรียกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ แบ่งออกได้เป็น 2 พวก

1. ปัจจัยภายในของพืช องค์ประกอบทางพันธุกรรม เป็นความผิดพลาดที่เกิดขึ้นในจีโนไทป์ของพืชเอง เช่น พืชที่มีการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของโครโมโซมที่อยู่ในจีโนไทป์ เช่น เป็นพวकिनเวอร์ชันเฮไซโทไรโกด หรือ ทรานสโลเคชันเฮเทโรไซโกด เมื่อการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบว่ามี การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีความผิดปกติเนื่องจากเซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนยีนมากกว่าปกติหรือน้อยกว่าปกติ เรียกว่า เดลีเซียนซี คูพลีเคชัน แกมีท เนื่องจากบางส่วนของโครโมโซมขาดหายไปและบางส่วนเกินมา

สภาพทางสรีระ ในพืชมีการปลูกเปรียบเทียบเมล็ดเก่าที่เก็บไว้เป็นเวลานานกับเมล็ดใหม่ที่เพิ่งเก็บเกี่ยว เมื่อนำเมล็ดทั้งสองมาปลูก พบว่า เมล็ดที่เก็บไว้เป็นเวลานานๆ ทำให้มีอัตราการกลายพันธุ์สูง ทั้งนี้เพราะในเมล็ดมีกระบวนการเมแทบอลิซึม เกิดขึ้น และมีพวกเมแทบอลิต์และของเสียต่างๆ เกิดขึ้นภายในเซลล์ของเมล็ดสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสิ่งที่ก่อกลายพันธุ์ขึ้นเองตามธรรมชาติ

2. ปัจจัยจากสภาพแวดล้อม

2.1. อาหาร

ปัจจัยที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ คือ อาหาร การปลูกพืชในดินที่ขาดแร่ธาตุบางอย่างจะมีผลต่ออัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น และ ในปีค.ศ. 1938 ได้ทดลองปลูกต้นลิ้นมังกร ในดินที่ขาดธาตุกำมะถัน ธาตุฟอสฟอรัส และไนโตรเจน พบว่า มีอัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติสูงกว่าการปลูกในดินที่ไม่ขาดธาตุเหล่านี้ การปลูกในดินที่ขาดแมกนีเซียมและแคลเซียม เมื่อตรวจดูโครโมโซม พบว่ามีการแตกหักของโครโมโซมเกิดขึ้นมากกว่าปกติ

2.2 อุณหภูมิ

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงวันหนึ่ง ๆ ถ้าสูงมากหรือต่ำมาก อาจมีผลต่ออัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในบริเวณนั้นด้วย ตัวอย่างที่เห็นชัดเจนได้ อัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในบริเวณนั้นด้วย ตัวอย่างที่เห็นชัดเจนได้แก่ รายงานการทดลองในแมลงหวี่ จากการเลี้ยงแมลงหวี่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีอัตราการกลายพันธุ์ในลักษณะลีทล ซึ่งทำให้แมลงหวี่ถึงตายเท่ากับ 0.087 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงแมลงหวี่เป็น

22 องศาเซลเซียส และ 28 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ในลักษณะที่เพิ่มเป็น 0.188 และ 0.325 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.3. รังสีในสิ่งแวดล้อม

ในธรรมชาติมีแหล่งให้กำเนิดรังสีต่าง ๆ เช่น รังสีจากการสลายตัวของพวกเรดิโอ นิวไคลด์ เช่น ยูเรเนียม ทอเรียม เรดิโอ นิวไคลด์ มีกระจายกระจายทั่วไปในพื้นโลก และเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติขึ้นในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ใกล้บริเวณที่มีเรดิโอ นิวไคลด์เหล่านี้ นอกจากนี้ยังมีพวกรังสีคอสมิกที่มาจากนอกโลก และจากพวกเรดิโอ นิวไคลด์ที่มนุษย์นำมาใช้ในงานวิจัยด้านต่าง ๆ เช่น ทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม เป็นต้น

2.4. สิ่งก่อกลายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมที่เกิดเองตามธรรมชาติ

สารที่มีสมบัติเป็นสิ่งที่ก่อกลายพันธุ์หลายชนิดได้มาจากพืช กระบวนการเมแทบอลิซึมทำให้ได้พวกเมแทบอไลต์ที่มีคุณสมบัติเป็นสิ่งที่ก่อกลายพันธุ์ด้วย เช่น พวก อัลคาลอยด์ ฟีนอล ควิโนน โทรโปโลน อะมิน กรดอะมิโน และอะมิโน เป็นต้น ในสภาพทางสรีระที่เป็นปกติ พืชสามารถคุ้มครองตัวเองจากสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่สร้างขึ้นในตัวเองได้ โดยการแยกเอนไซม์และสับสเตรทออกจากกันด้วยการจัดแยกไว้ในออร์แกเนลล์ต่างกัน หรือควบคุมไม่ให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีขึ้นเมื่อเมล็ดหรือต้นพืชได้รับการกระทบกระเทือน เช่น เกิดเมล็ดแตกหรือเกิดบาดแผลบนต้นพืช ทำให้เกิดการรวมตัวของเอนไซม์และสับสเตรท ตัวอย่างเช่น ผักกระหล่ำ สารแอลลิกลอ โซไทโอซัยยานेट ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสิ่งที่ก่อกลายพันธุ์ สารนี้ถูกจับไว้โดยกลูโคสซึ่อไซโนกริน เมื่อนำเมล็ดหรือส่วนของต้นพืชมาบดให้ละเอียด มีการสร้างสารแอลลิกลอ โซไทโอซัยยานेटทันที โดยการทำงานเอนไซม์ มัยโรซิน ดังนั้น ภายใต้สภาวะการปกติอาจมีบางสิ่งบางอย่างที่ทำให้ระบบคุ้มครองป้องกันภัยตัวเองล้มเหลวลง ทำให้พืชต้องได้รับอันตรายจากสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่สร้างขึ้นในตัวเองได้ (สิรินุช, 2540)

นอกเหนือจากสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืชแล้ว ยังมีสิ่งก่อกลายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการนำสารเคมีต่าง ๆ มาใช้ในการเกษตร เพื่อป้องกันและกำจัดศัตรูพืช สารเคมีหลายชนิดพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสิ่งที่ก่อกลายพันธุ์ ดังนั้นสารเคมีเหล่านี้เป็นปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุของการเกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติของพืช

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1.พืชทดลอง

พืชที่ใช้ในการทดลอง คือ กระชายเหลือง โดยนำส่วนของใบอ่อนมาใช้ในการสกัด ดีเอ็นเอ ซึ่งสุ่มเก็บตัวอย่างมาจากสถานที่ต่างๆจากภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ภาคกลาง, ภาคตะวันออกและภาคใต้ ดังตารางที่ 1 และแสดงการจัดกลุ่มลักษณะทางกายภาพดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพและที่มาของตัวอย่างกระชาย 10 ตัวอย่าง

หมายเลข	สัญลักษณ์	ลักษณะทางกายภาพ	ที่มา
1	N1	A1	บ้านพิบูลทอง ต.คลองขลุง อ. คลองขลุง จ. กำแพงเพชร
2	N2	A	บ้านโคงเตง ต. วังเจ้า กิ่งอำเภอ วังเจ้า จ. ตาก
3	N4	A/B1	กระชายป่า คอยผักหั่วแวน ต. วังเหนือ อ.วังเหนือ จ. ลำปาง
4	N9	B	บ้านสลงใน ต.สลง อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ (บ้านลุงปิ่น)
5	N12	B/A1	บ้านแม่น้ำเรือใต้ ต. แม่น้ำเรือ ใต้ อ. เมือง จ. พะเยา
6	N19	C	บ้านน้ำพร้าว ต. ไทรฮ้อย อ.เด่นชัย จ. แพร่
7	N29	B12	บ้านนิคม ต. เขาเจ็ดลูก อ. ทับ ล้อ จ. พิจิตร
8	EN2	A1	บ้านอาโพน อ. บัวเชด จ. สุรินทร์
9	EN4	B/A12	บ้านจรัส(เขตรักษาพันธุ์สัตว์ ป่า) อ. บัวเชด จ. สุรินทร์
10	EN5	C12	บ้านเลิศจรุง จ. สุรินทร์

11	EN9	B12	บ้านโคกสว่าง ต. ห้วยแถลง อ. ห้วยแถลง จ. นครราชสีมา
12	EN11	A1 (ยายมากแดง)	บ้านโคกสว่าง ต. ห้วยแถลง อ. ห้วยแถลง จ.นครราชสีมา
13	EN13	A1 (แก้งกะอามแดง)	แก้งกะอาม อ.สมเด็จ จ. กาฬสินธุ์
14	EN15	D12	ภูสีฐาน บ้านวังมบ ต. กุดว่า อ. ภูผินารายณ์ จ. กาฬสินธุ์
15	EN29	A1 (ยายมากเขียว)	บ้านโคกสว่าง ต. ห้วยแถลง อ. ห้วยแถลง จ.นครราชสีมา
16	EN31	A1 (แก้งกะอามเขียว)	แก้งกะอาม อ.สมเด็จ จ. กาฬสินธุ์
17	C2	A	42 ม5 บ้านย่านมัทรี ต. พุทธิศรี จ. นครสวรรค์
18	C5	A	152 ม2 ต.ทุ่งขวาง อ. กำแพง แสน จ. นครปฐม
19	C8	A	37 ม5 บ้านหนองหญ้าปล้อง ต. ท่ามะกา อ. ท่ามะกา จ. กาญจนบุรี
20	C12	A (ใบยาว)	ม3 บ้านบนเขาแก่งเรียง ต. ท่ากระดาน อ. ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี
21	C13	A(ใบมน)	ม3 บ้านบนเขาแก่งเรียง ต. ท่ากระดาน อ. ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี
22	C23	B	ม3 บ้านนิคมสร้างตนเอง อ. เมือง จ. ลพบุรี
23	C26	B	41 ม9 บ้านแถว ต. ห้วยทราย อง หนองแค จ. สระบุรี

24	E4	A1	32 หมู่ 2 ต. แสนดั่ง อ. เขาสมิง จ. ตราด
25	E5	D1	7 หมู่ 2 บ้านท่าหาด ต. แสนดั่ง อ. เขาสมิง จ.ตราด
26	E7	A2	95/23 หมู่ 9 ต. จันทนิมิตร อ. เมือง จ. จันทบุรี
27	E8	B12	บ้านวังสมบูรณ์ จ.สระแก้ว
28	E17	A1	73 บ้านกระโทน ต.เกาะจันทร์ อ. เกาะจันทร์ จ. ชลบุรี
29	E61	A(ไบมน)	56 หมู่ 3 บ้านบางปิด ต. บางปิด อ.แหลมงอบ จ.ตราด
30	E62	A(ไวยาว)	56 หมู่ 3 บ้านบางปิด ต. บางปิด อ.แหลมงอบ จ.ตราด
31	S2	A1	10 ม.3 บ้านเขาดอก ต. เขาดอก อ.เคียนซา จ. สุราษฎร์ธานี
32	S12	A1	2 ม1 บ้านบางสองรา ต. บาง ใหญ่ อ.กระบุรี จ.ระนอง
33	S13	A1	50 ม1 บ้านหนองบอน ต. ท่า แซะ อ. ท่าแซะ จ.ชุมพร
34	S15	A1	50/1 ม2 บ้านไร่บน ต. ทราช ทอง อ. บางสะพาน จ.ประจวบ
35	S31	A1 (ควนกรด1)	18 ถ.ตลาดใน 2 ต. ปากแพรก อ. ทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช
36	S32	A1 (ควนกรด4)	18 ถ.ตลาดใน 2 ต. ปากแพรก อ. ทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช

ตารางที่ 2 การจัดกลุ่มลักษณะทางกายภาพบางประการของกระชาย

สัญลักษณ์	ลักษณะทางกายภาพ
A	ส่วนล่างของกาบใบมีสีแดง ท้องใบมีสีเขียว
B	กาบใบมีสีแดงตลอดกาบใบ ท้องใบมีสีแดงเรื่อ
A/B	ส่วนล่างของกาบใบแดง ก้านใบมีสีเขียว ท้องใบมีสีแดงเรื่อ
B/A	กาบใบมีสีแดงตลอด ท้องใบมีสีเขียว
C	กาบใบมีสีแดงจัดตลอดความยาวของกาบใบ ท้องใบมีสีแดงจัด
D	กาบใบมีสีเขียวตลอดความยาวของกาบใบ ท้องใบมีสีเขียว
E	กาบใบมีสีเขียวตลอด ท้องใบมีสีแดง

2. สารเคมี

2.1 สารเคมี สำหรับสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้แก่ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) , sodium chloride (NaCl), sodium dodesyl sulfate(SDS), isopropanol, phenol, ethanol 70 %, ethanol 90%, isoamyl, chloroform, c etyl triethylammonium bromide (CTAB), agarose, bromophenol blue, ethidium bromide (EtBr), TE buffer, liquid N₂, extraction buffer, น้ำกลั่น

2.2 ดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาใช้ในการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ (1 KB marker)

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1 เครื่องมือสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกรกขนาดเล็ก , เครื่องปั่นเหวี่ยง, หลอดเซนติฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร , ที่วางหลอดเซนติฟิวจ , กล้องโคมไฟน้ำแข็ง , ตู้เย็น , ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส , เทอร์โมมิเตอร์ , นาฬิกาจับเวลา

3.2 เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ขนาดและปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ electrophoresis chamber, power supply, UV transilluminator, Spectrophotometer

3.3 เครื่องชั่ง ตวง วัด ได้แก่ เครื่องชั่งหยาบ , เครื่องชั่งละเอียด , กระจกตวงขนาดต่างๆ , ปิเปตขนาดต่างๆ , ไมโครปิเปตขนาดต่างๆ , เครื่องมือวัดความเป็นกรด-เบส , ช้อนตักสาร , ขวดวัดปริมาตร

3.4 เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่างๆ , ขวดรูปชมพู่ , ขวดใส่สารเคมี , แท่งแก้วคนสาร

3.5 อุปกรณ์สำหรับให้ความร้อน ได้แก่ หม้อนึ่งความดัน , เตาอบแห้ง , เตาไมโครเวฟ , ตู้ควบคุมอุณหภูมิ , อ่างควบคุมอุณหภูมิ

3.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายภาพ ได้แก่ กล้องโพลาไรซ์, ฟิเตอร์สีแดง , ฟิล์ม โพลาไรซ์

วิธีการ

1. การเก็บใบพืชเพื่อนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

โดยเก็บเฉพาะใบอ่อนของกระชายแต่ละสายพันธุ์ ชั่งน้ำหนัก แล้วล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ก่อนนำมาทำการสกัดดีเอ็นเอ

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle(1990) มีขั้นตอนการสกัดดังนี้

- 2.1. ชั่งใบกระชาย ให้มีน้ำหนัก 1.5 กรัม ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
- 2.2. บดใบพืชด้วยไนโตรเจนเหลว
- 2.3. เติม 500 ไมโครลิตร CTAB buffer
- 2.4. เขย่าเบาๆ ด้วยมือ นาน 10 นาที
- 2.5. บ่มทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
- 2.6. หมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- 2.7. ดูดส่วนใส 300 ไมโครลิตร ใส่ eppendorf tube หลอดใหม่ เติม isoamylchloroform 200 ไมโครลิตร
- 2.8. ผสมให้เข้ากันเบาๆ นาน 10 นาที
- 2.9. หมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- 2.10. ดูดส่วนใสด้านบนใส่ eppendorf tube หลอดใหม่ เติม 95 เปอร์เซ็นต์ อีก 1 เท่า
- 2.11. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
- 2.12. หมุนเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

2.13. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง

2.14. ทำให้แห้ง แล้วละลายตะกอนใน TE buffer

3.การวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ UV Spectrophotometer

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวัดปริมาณด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer โดยเจือจางดีเอ็นเอด้วย TE buffer อัตราการเจือจางขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่มีอยู่โดยสังเกตจากตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ก่อนละลายใน TE buffer ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวัดคือ 260 และ 280 นาโนเมตร โดยดีเอ็นเอจะมีความสามารถในการดูดกลืนแสง ได้ดีที่สุดที่ 260 นาโนเมตร สำหรับโปรตีนสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ถ้าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร มีค่าระหว่าง 1.8-1.9 ถือว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ แต่ถ้าค่ามากกว่า 1.9 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนอยู่มาก และการวัดปริมาณดีเอ็นเอจากค่าการดูดกลืนแสงมีความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) ถ้ามีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าดีเอ็นเอเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

จากปริมาตรของดีเอ็นเอที่มีอยู่ ทำให้ทราบได้ว่ามีดีเอ็นเอทั้งหมดกี่ไมโครกรัม ที่สามารถนำไปใช้ได้

4.การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

4.1. เตรียม 1.5 % agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1x TBE ชั่ง agarose 1.5 กรัม ละลายใน 1x TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน

4.2. รอให้เจลเย็นลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในแผ่นรองเจล ซึ่งมี comb เสียบอยู่

4.3. รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 40 นาที วางแผ่นเจลลงใน electrophoresis chamber แล้วเท 1x TBE buffer ให้ท่วมเจลโดยให้สูงกว่าแผ่นเจลประมาณ 5 มิลลิลิตร

4.4. นำตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ต้องการวิเคราะห์ขนาดมาผสมกับ gel loading buffer แล้วหยอดลงในช่องเจล (well) อย่างระมัดระวังไม่ให้ฟุ้งกระจาย

4.5. ต่อ chamber เข้ากับ power supply ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 50-100 โวลต์ จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก จนกระทั่ง เคลื่อนที่มาเกือบถึงปลายของขอบเจล

น้ำ

4.6. เตรียมสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ใน

4.7. นำแผ่นเจลที่ run gel เสร็จแล้วย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide ในข้อ 4. 6 ซึ่งเตรียมใส่ถาดไว้เป็นเวลา 15 นาที

4.8. นำแผ่นเจลที่ย้อมไว้มาล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยน้ำเป็นเวลา 5 นาที

4.9. นำแผ่นเจลไปตรวจดูแถบสีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (สวมแว่นตากันแสงทุกครั้ง) ควรทำในห้องมืด

4.10. ถ่ายภาพสีเอ็นเอบนเจลด้วยกล้องโพลาไรซ์ (ศิริพร, 2531)

5.การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอกระชายมาเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD) ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยจะตรวจหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มเติมปริมาณดีเอ็นเอได้ แล้วจึงเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลเป็นบวกมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอ ตัวอย่างทั้งหมดอีกครั้งหนึ่ง ส่วนความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ นั้นแสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ 10 ชนิด ที่ใช้ในการทำวิจัย

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'→3')
A1	CAGGCCCTTC
A2	TGCCGAGCTC
A3	AGTCAGCCAC
A4	AATCGGGCTG
A5	AGGGGTCTTG
B1	GTTTCGCTCC
B2	TGATCCCTGG
B3	CATCCCCCTG
B4	GGACTGGAGT
B5	TGCGCCCTTC

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารที่ใช้	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาตร(μ l)
ดีเอ็นเอกระชายแต่ละสายพันธุ์	100 mg	2.0
บัฟเฟอร์	1 เท่า*	1.5
MgCl ₂	1.5 mM	1.5
dNTP ความเข้มข้นชนิดละ	200	1.5
DNA polymerase	5 Units/100 μ l	1.0
Primer	5 pmole	0.075
น้ำกลั่น	เติมจนครบ 15	0.425
		ปริมาตรรวม 15 μ l

*1 เท่า buffer คือ 500 mM KCl , 200 mM โดยใช่ ในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

บ่มที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตามด้วย 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที จำนวน 33 รอบ และจบโดยให้อยู่ที่ 72 องศาเซลเซียส อีก 10 นาที แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งานในขั้นต่อไป

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วย้อมด้วยเอริเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ถ่ายภาพเก็บไว้

การวิเคราะห์ผลของอาร์เอฟดี

จากแถบดีเอ็นเอที่ได้สามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง และบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่างได้ด้วย โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ให้สัญลักษณ์เป็น + หรือให้คะแนนเป็น 1 ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้สัญลักษณ์เป็น - หรือให้คะแนนเป็น 0 ในการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอเกิดปัญหาได้บ่อยๆ เช่น แถบดีเอ็นเอในบางแถวอาจหรือไม่ชัดเจน หรือตำแหน่งอาจคลาดเคลื่อนจากกันเนื่องจากเกิด smile อันมีสาเหตุจากแถบดีเอ็นเอแถวที่อยู่ด้านนอกเคลื่อนที่ไปช้ากว่าแถบดีเอ็นเอที่อยู่แถวกลาง เป็นต้น ในกรณีดังกล่าวนี้ ถ้าแถบดีเอ็นเอในแถวใดไม่ชัดเจนไม่อาจบอกได้แน่ชัด ให้ตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวออกไปไม่ต้องนำมาคิด การให้คะแนนหรือตรวจดูแถบดีเอ็นเอนี้อาจดูด้วยสายตาหรือใช้เครื่องอ่านก็ได้ เปรียบเทียบความเหมือนของแบบของดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละคู่โดยใช้ค่า similarity index(S) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$S = 2 \times N_{ab} / (n_a + n_b)$$

เมื่อ n_a และ n_b แทนจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในตัวอย่าง a และ b ตามลำดับ และ N_{ab} คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทั้ง 2 ตัวอย่าง โดย S จะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดย 0 คือ ทั้งสองตัวอย่างไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันเลย และ $S = 1$ หมายถึงทั้งสองตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด นอกจากการคำนวณค่า S แล้ว สามารถศึกษาความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่างโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average)

สถานที่ทำการทดลอง

ห้อง 1137 อาคารปฏิบัติการรวม ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์บางพระ
สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

ระยะเวลาในการทดลอง

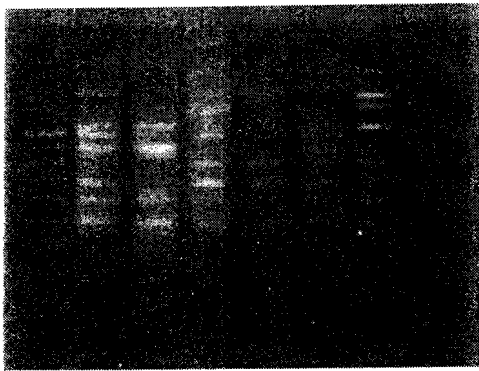
การทดลองเริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม 2544 ถึงเดือนมีนาคม 2546



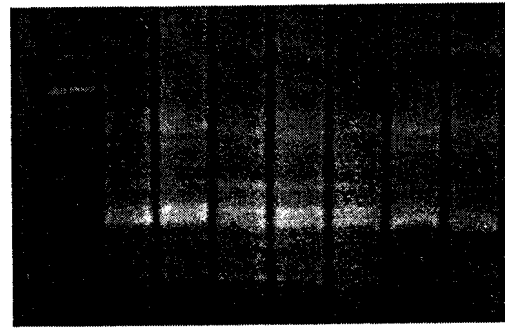
บทที่ 3

ผลการวิจัยและวิจารณ์

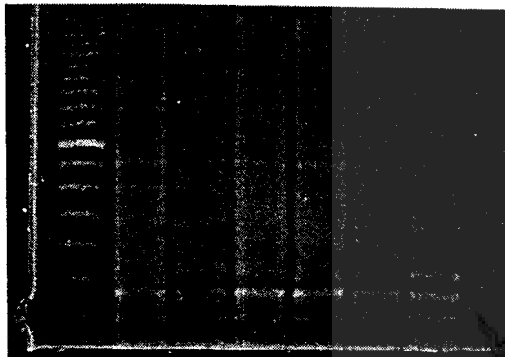
การตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด (A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2, B3, B4 และ B5) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของใบกระชายทั้งหมด 36 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่เก็บมาจากจังหวัดต่างๆ ในภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ภาคกลาง, ภาคตะวันออกและภาคใต้ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 10 ชนิดซึ่งจะเกิดรูปแบบของ ดีเอ็นเอ เฉพาะที่ในกระชายแต่ละสายพันธุ์จึงใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ดังภาพที่ 2-11 และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากแถบขนาดตั้งแต่ 300 – 1700 bp ดังตารางที่ 5 –14 โดยทุกไพรเมอร์สามารถแสดงความแตกต่างและจัดกลุ่มกระชายจากทุกภาคของประเทศไทยได้ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่างกระชายโดยใช้โปรแกรม UPMGA และสร้าง phylogene tree ดังภาพที่ 12 พบว่าสามารถแบ่งกระชายตัวอย่างจากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นกระชายจากภาคเหนือ 4 ตัวอย่าง ภาคกลาง 6 ตัวอย่าง และภาคตะวันออก 5 ตัวอย่าง ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นกระชายจากภาคเหนือ 2 ตัวอย่าง ภาคตะวันออก 1 ตัวอย่าง ภาคใต้ 5 ตัวอย่าง และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมและอยู่เฉพาะกลุ่มสอง โดยเฉพาะตัวอย่างกระชายจากแก่งกระฮามใบแดง (EN 13) มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกระชายตัวอย่างทั้งหมดมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามจากค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่คำนวณได้ (ไม่แสดงข้อมูล) นั้น แสดงว่ากระชายตัวอย่างทั้งหมดมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมากถึงแม้จะมีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างทางกายภาพอาจเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมมากกว่าผลจากพันธุกรรม เพราะกระชายที่ขึ้นในต่างพื้นที่จำเป็นต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น สภาพของดิน, ความเป็นกรดด่าง และปริมาณน้ำฝน เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลการจำแนกกลุ่มด้วยเทคนิค RAPD นี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกสายพันธุ์กระชายและพัฒนาการปลูกในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต



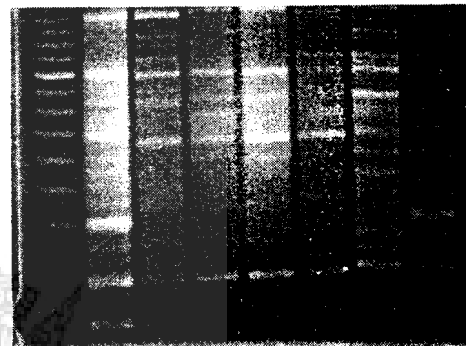
ก. ไพร์เมอร์ A1



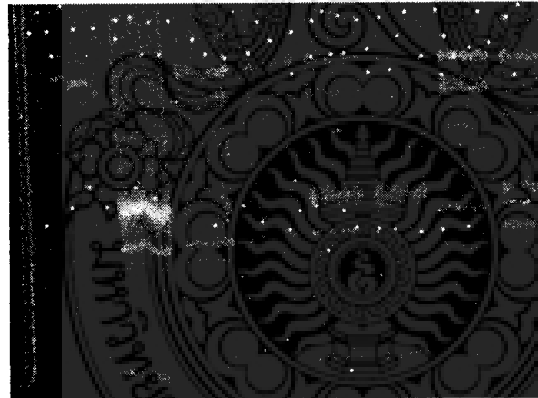
ข. ไพร์เมอร์ A2



ค. ไพร์เมอร์ A3

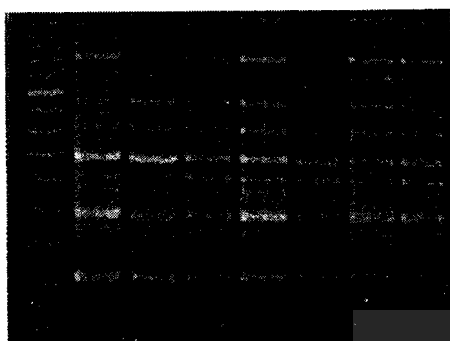


ง. ไพร์เมอร์ A4

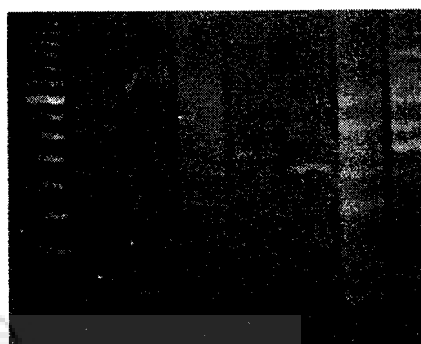


จ. ไพร์เมอร์ A5

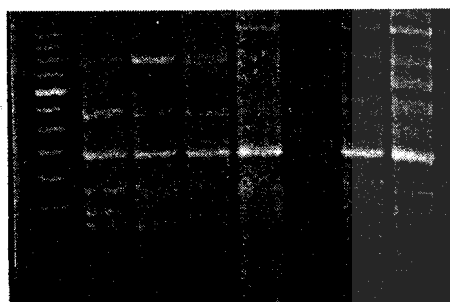
ภาพที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพร์เมอร์ A1 - A5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่างๆในภาคเหนือ ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 โดยแถวแรกของเจล คือ marker



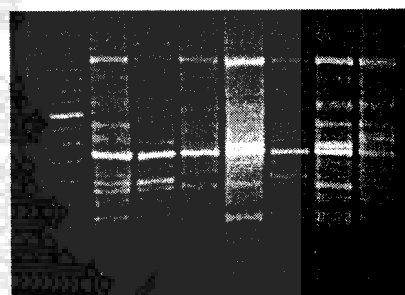
ก. ไพร์เมอร์ B1



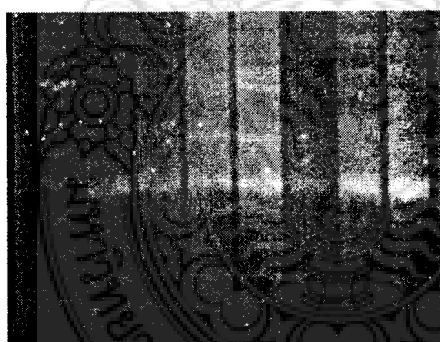
ข. ไพร์เมอร์ B2



ค. ไพร์เมอร์ B3

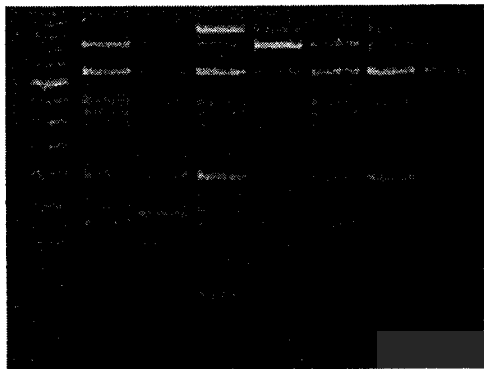


ง. ไพร์เมอร์ B4

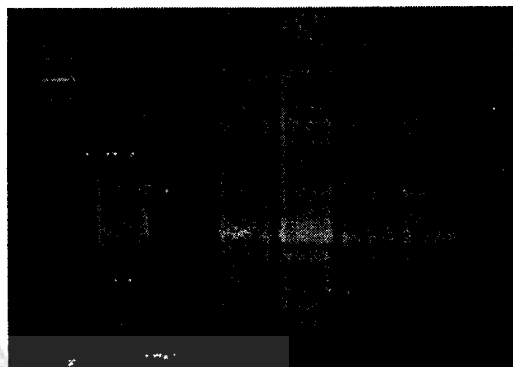


จ. ไพร์เมอร์ B5

- ภาพที่ 3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพร์เมอร์ B1-B5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่างๆในภาคเหนือดังรายละเอียดในตารางที่ 1 โดยแถวแรกของเจล คือ marker



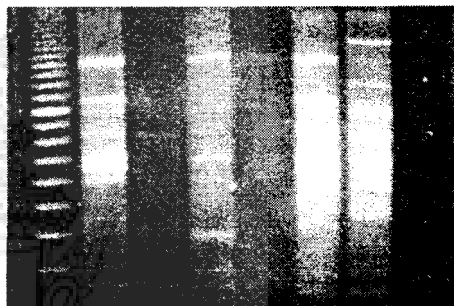
ก. ไฟร์เมอร์ A 1



ข. ไฟร์เมอร์ A 2



ค. ไฟร์เมอร์ A3

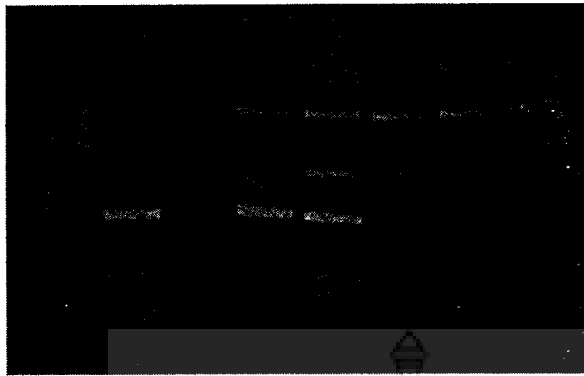


ง. ไฟร์เมอร์ A4



จ. ไฟร์เมอร์ A5

ภาพที่ 4 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไฟร์เมอร์ A1-A5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่างๆในภาคตะวันออกเฉียงเหนือดังรายละเอียดในตารางที่ 1 โดยแถวแรกของเจล คือ marker



ก. ไฟร์เมอร์ B3

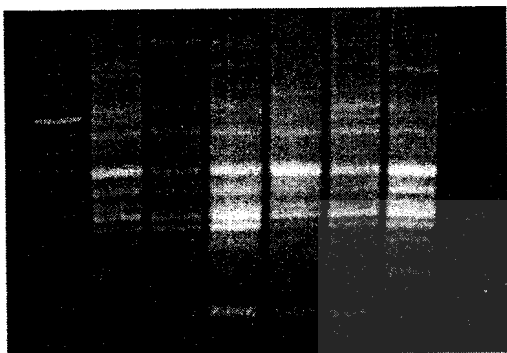


ข. ไฟร์เมอร์ B4

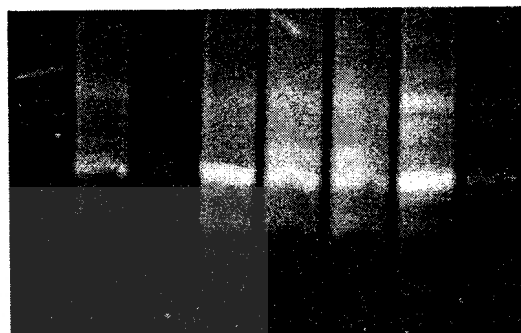


ค. ไฟร์เมอร์ B 5

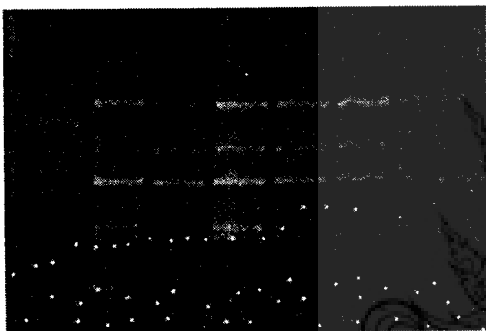
- **ภาพที่ 5** แสดงแถบสีเอ็นเอทีเกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไฟร์เมอร์ B1-B5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่างๆในภาคตะวันออกเฉียงเหนือดังรายละเอียดในตารางที่ 1 โดยแถวแรกของเจล คือ marker



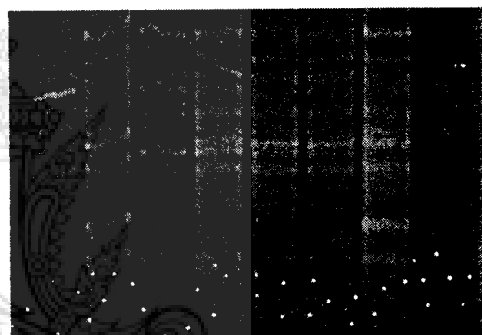
ก.ไฟร์เมอร์ A1



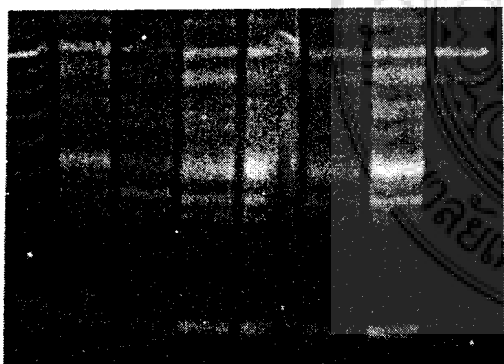
ข.ไฟร์เมอร์ A2



ค.ไฟร์เมอร์ A3

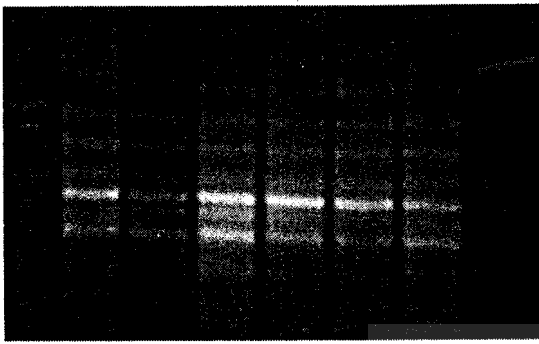


ง.ไฟร์เมอร์ A4

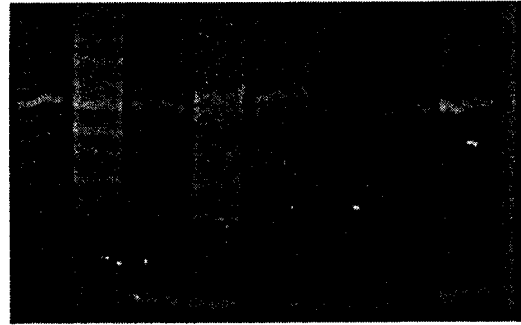


จ.ไฟร์เมอร์ A5

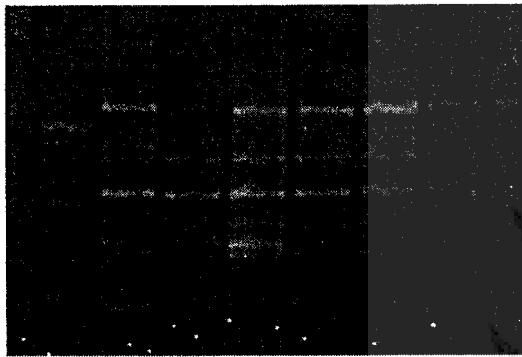
- ภาพที่ 6 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไฟร์เมอร์ A1-A5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่างๆ ในภาคกลางดังรายละเอียดในตารางที่ 1 โดยแถวแรกของเจล คือ marker



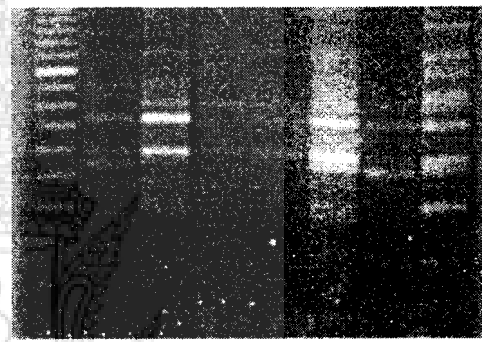
ก. ไพร์เมอร์ B 1



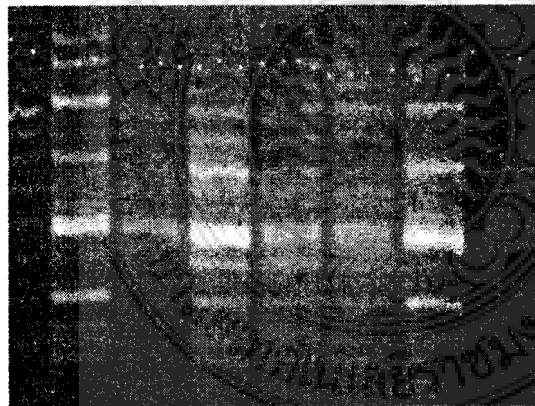
ข. ไพร์เมอร์ B 2



ค. ไพร์เมอร์ B 3

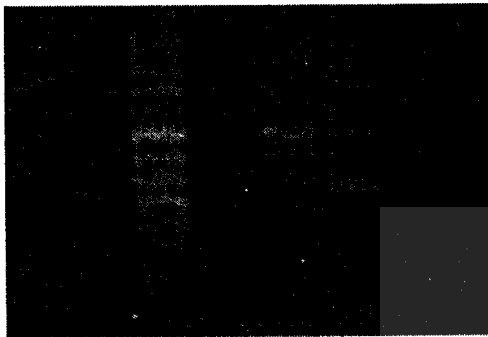


ง. ไพร์เมอร์ B 4

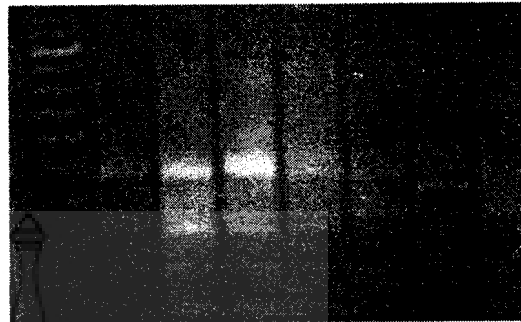


จ. ไพร์เมอร์ B 5

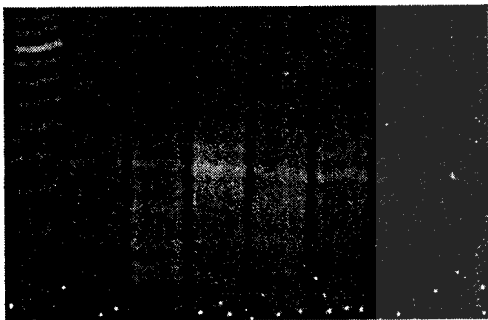
- ภาพที่ 7 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพร์เมอร์ B 1- B 5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่างๆในภาคกลางดังรายละเอียดในตารางที่ 1 โดยแถวแรกของเจลคือ marker



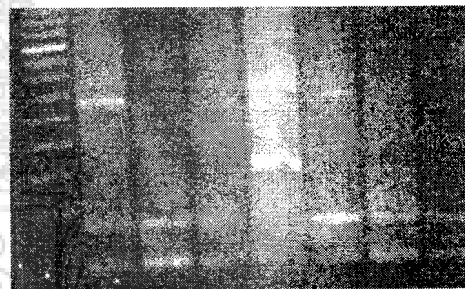
ก. ไฟร์เมอร์ A1



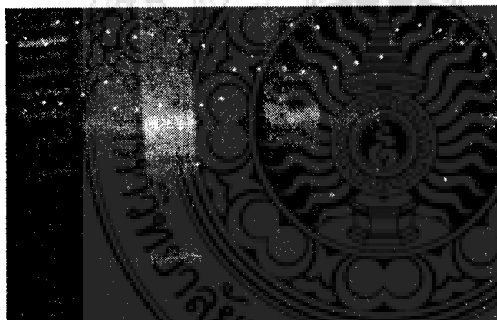
ข. ไฟร์เมอร์ A 2



ค. ไฟร์เมอร์ A 3

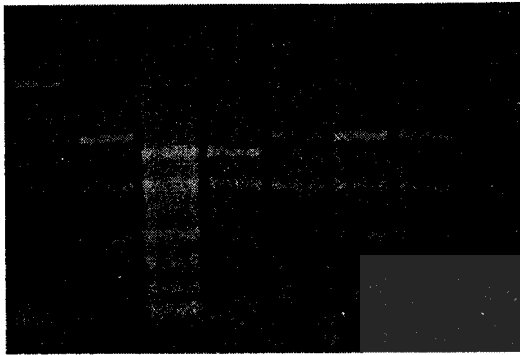


ง. ไฟร์เมอร์ A 4

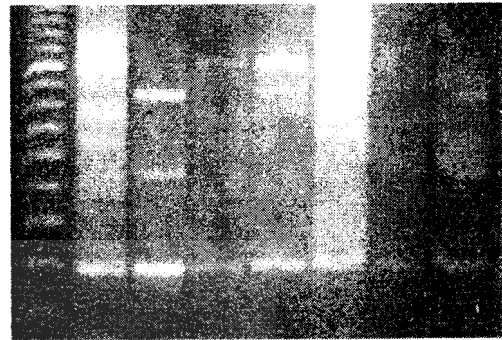


จ. ไฟร์เมอร์ A5

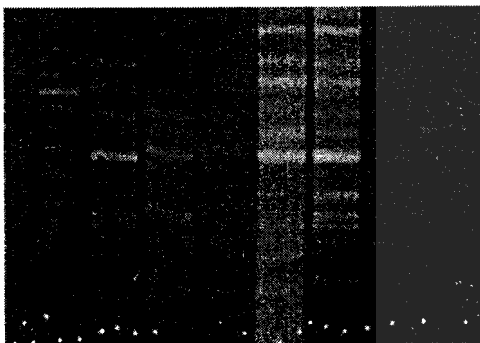
ภาพที่ 8 แสดงแถบคิเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไฟร์เมอร์ A1-A5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่างๆในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในตารางที่ 1 โดยแถวแรกของเจลคือ marker



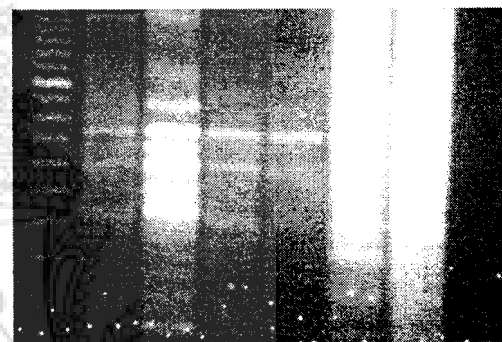
ก. ไฟร์เมอร์ B 1



ข. ไฟร์เมอร์ B2



ค. ไฟร์เมอร์ B 3

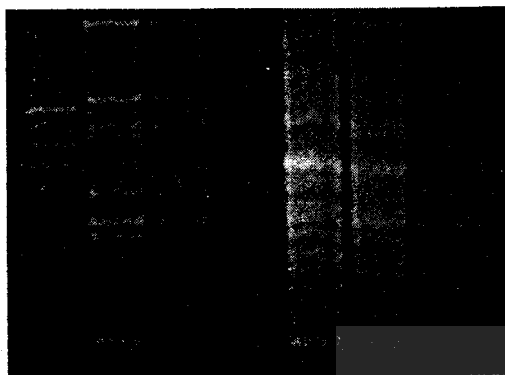


ง. ไฟร์เมอร์ B4

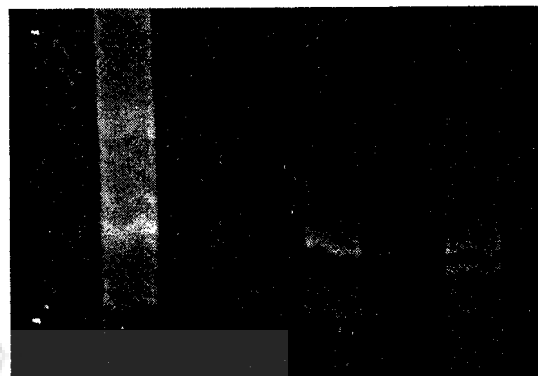


จ. ไฟร์เมอร์ B5

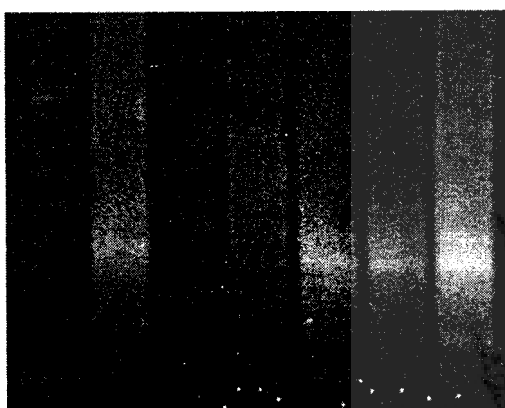
ภาพที่ 9 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไฟร์เมอร์ B1-B5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่างๆในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในตารางที่ 1



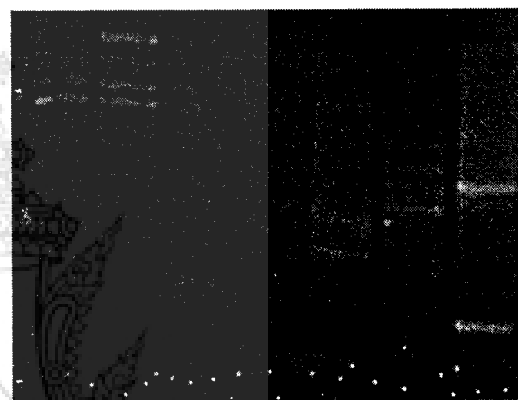
ก. ไพร์เมอร์ A1



ข. ไพร์เมอร์ A2



ค. ไพร์เมอร์ A3

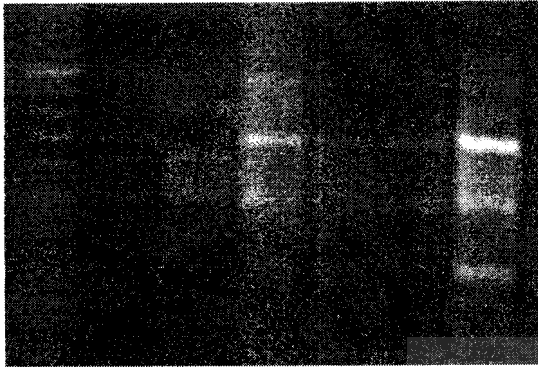


ง. ไพร์เมอร์ A4

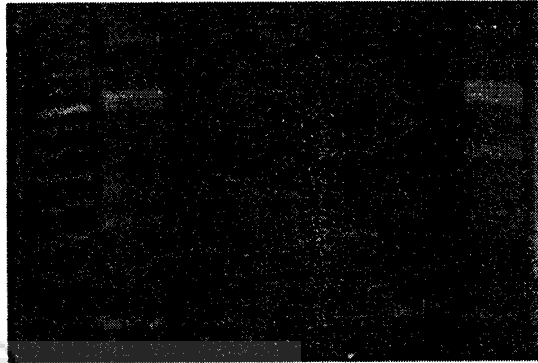


จ. ไพร์เมอร์ A5

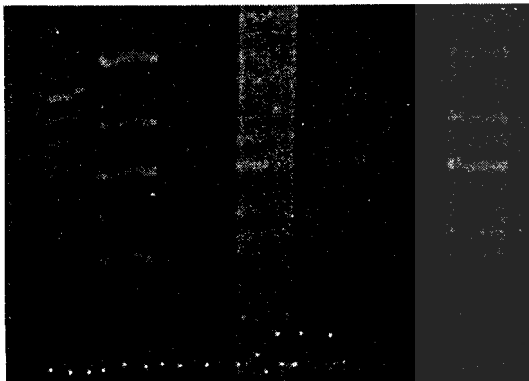
ภาพที่ 10 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพร์เมอร์ A1-A5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่างๆ ในภาคใต้ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 โดยแถวแรกของเจล คือ marker



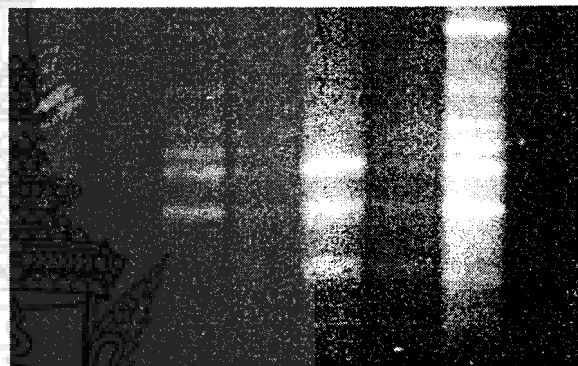
ก. ไฟร์เมอร์ B1



ข. ไฟร์เมอร์ B2



ค. ไฟร์เมอร์ B3



ง. ไฟร์เมอร์ B4



จ. ไฟร์เมอร์ B5

ภาพที่ 11 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไฟร์เมอร์ B1-B5 ของกระชายที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่างๆในภาคใต้ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 โดยแถวแรกของเจล คือ marker

ตารางที่ 5. ขนาดของแถบคี่เอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไฟร์เมอร์ A1 (● แสดงว่ามีแถบคี่เอ็นเอเกิดขึ้น)

ตัวอย่าง ขนาด (คู่เบส)	N1	N2	N4	N9	N 12	N 19	N 29	EN2	EN4	EN5	EN9	EN 11	EN 13	EN 15	EN 29	EN 31	C2	C8	C 12	C 13	C 23	C 26	E4	E5	E8	E 17	E 61	E 62	S2	S12	S13	S15	S32	
1250			●				●	●		●	●	●	●		●	●	●		●	●	●			●					●			●		
1100	●	●				●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●		●	●	●	●			●	●		●	●	●	●		
1000	●	●	●	●	●		●	●	●	●		●			●	●	●			●				●		●	●		●	●	●	●	●	
900	●	●			●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●			●	●	●	●		
850	●	●				●		●		●		●			●	●		●	●	●		●			●			●			●		●	
800			●	●		●	●	●		●		●	●		●	●	●			●	●				●				●					
700	●	●	●	●	●	●	●										●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●	●	
600	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
500	●	●	●	●	●		●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
470	●	●	●					●		●	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
400	●	●													●																			
300	●	●						●		●	●	●			●																●			

ตารางที่ 6. ขนาดของแถบตีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพร์เมอร์ A2 (● แสดงว่ามีแถบตีเอ็นเอเกิดขึ้น)

ตัวอย่าง ขนาด (คู่เบส)	N1	N2	N4	N9	N 12	N 19	N 29	EN2	EN4	EN5	EN9	EN1 1	EN1 3	EN1 5	EN2 9	EN3 1	C2	C8	C 12	C 13	C 23	C 26	E4	E5	E8	E 17	E 61	E 62	S2	S12	S13	S15	S32
800	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●				●	●	●	●	●	●		●					●	●		●	●
700		●		●		●					●		●			●	●	●			●	●							●	●		●	●
650		●							●		●		●			●	●				●								●	●			
590	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●		●	●	●	●	●		●	●									●	●			
500	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●		●	●	●	●	●	●	●
480	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
400	●	●	●	●			●		●	●	●	●	●	●				●				●	●				●	●		●			●



ตารางที่ 7. ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไฟร์เมอร์ A 3 (• แสดงว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น)

ตัวอย่าง ขนาด (คู่เบส)	N1	N2	N4	N9	N 12	N 19	N 29	EN2	EN4	EN5	EN9	EN 11	EN 13	EN 15	EN 29	EN 31	C2	C8	C 12	C 13	C 23	C 26	E4	E5	E8	E 17	E 61	E 62	S2	S12	S13	S15	S32	
550		•	•	•	•	•		•			•	•				•	•	•	•	•	•	•										•	•	
500		•	•	•	•	•		•	•		•	•	•	•	•				•	•	•	•			•	•	•				•	•	•	
470	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•							•	•	•	•	•	•	
400	•		•	•	•	•		•		•	•					•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•					•	•
300						•	•	•	•	•			•	•		•						•		•	•	•	•		•	•		•	•	



ตารางที่ 8. ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพร์เมอร์ A4 (• แสดงว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น)

ตัวอย่าง ขนาด (คู่เบส)	N1	N2	N4	N9	N 12	N 19	N 29	EN2	EN4	EN5	EN9	EN 11	EN 13	EN 15	EN 29	E N31	C2	C8	C 12	C 13	C 23	C 26	E4	E5	E8	E 17	E 61	E 62	S2	S12	S13	S15	S32
1400	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•			•	•	•		•
1000	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•			•	•	•	•	•	•			•				•	•	•		
850	•	•	•	•		•		•	•	•	•	•	•			•	•	•	•	•	•				•				•				•
700	•	•	•	•	•	•	•	•		•		•	•		•	•	•	•	•	•	•				•	•			•	•			•
600	•		•	•		•	•	•				•	•			•	•	•	•	•	•				•								•
400	•						•			•		•	•			•	•	•	•	•		•			•								
350	•	•				•	•					•	•				•	•	•										•	•			
280	•	•	•	•	•	•	•	•	•			•	•		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•
180	•	•	•	•	•	•	•	•	•			•	•		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•



ตารางที่ 9. ขนาดของแถบตีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไฟร์เมอร์ A 5 (• แสดงว่ามีแถบตีเอ็นเอเกิดขึ้น)

ตัวอย่าง ขนาด (คู่เบส)	N1	N2	N4	N9	N 12	N 19	N 29	EN2	EN4	EN5	EN9	EN 11	EN 13	EN 15	EN 29	EN 31	C2	C8	C 12	C 13	C 23	C 26	E4	E5	E8	E 17	E 61	E 62	S2	S12	S13	S15	S32
1000	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
850	●	●	●			●	●	●	●	●		●	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●
800	●	●				●											●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●				●
750	●	●	●	●	●	●	●								●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●				●
550	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●				●
500	●		●			●	●	●	●	●		●	●	●	●		●	●	●		●	●	●	●	●	●		●					●
450	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●			●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●				●
400	●	●	●	●	●	●	●								●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●				●



ตารางที่ 10. ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพรเมอร์ B 1 (● แสดงว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น)

ตัวอย่าง ขนาด (คู่เบส)	N1	N2	N4	N9	N 12	N 19	N 29	EN2	EN4	EN5	EN9	EN 11	EN 13	EN 15	EN 29	EN 31	C2	C8	C 12	C 13	C 23	C 26	E4	E5	E8	E 17	E 61	E 62	S2	S12	S13	S15	S32	
1300	●		●	●		●	●			●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●									
1100	●	●	●	●		●	●	●		●	●				●	●	●	●	●	●	●		●	●		●	●				●			
1000	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●		●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●		●	
800	●	●	●	●	●	●	●				●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●		●	
700	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●		●	●	
600	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●		●	●	●		●	●	●	●	●			●		●	●	●	●	●	●			
550	●	●	●	●		●	●					●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●			
500	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
300	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●	●	●



ตารางที่ 11. ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไฟร์เมอร์ B 2 (• แสดงว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น)

ตัวอย่าง ขนาด (คู่เบส)	N1	N2	N4	N9	N 12	N 19	N 29	EN2	EN4	EN5	EN9	EN 11	EN 13	EN 15	EN 29	EN3 1	C2	C8	C 12	C 13	C 23	C 26	E4	E5	E8	E 17	E 61	E 62	S2	S12	S13	S15	S32
1400							•			•			•		•		•					•	•			•			•	•	•		•
1050						•	•			•							•	•	•	•			•			•	•		•	•	•		•
1000	•					•	•	•		•	•				•		•		•	•	•	•	•		•		•		•	•	•	•	•
800	•				•	•	•	•		•			•	•	•	•	•				•	•	•		•	•						•	•
750			•	•		•	•	•		•	•		•				•	•				•	•		•	•			•				
650	•	•	•		•	•	•	•		•		•		•		•	•						•					•	•	•	•	•	•



ตารางที่ 12. ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไฟร์เมอร์ B3 (● แสดงว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น)

ตัวอย่าง ขนาด (คู่บส.)	N1	N2	N4	N9	N 12	N 19	N 29	EN2	EN4	EN5	EN9	EN 11	EN 13	EN 15	EN 29	EN 31	C2	C8	C 12	C 13	C 23	C 26	E4	E5	E8	E 17	E 61	E 62	S2	S12	S13	S15	S32
1100					●			●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●			●		●		●
900				●		●			●				●				●						●	●		●							
830	●	●	●	●		●	●	●			●	●	●			●	●	●	●	●					●	●			●	●	●		●
650	●	●	●	●		●	●	●		●	●	●			●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●	●	●	●	●
510	●			●			●	●		●	●				●		●	●	●	●	●	●	●		●	●			●		●		
450	●		●	●			●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●	●	●	●	●
410	●	●	●					●		●	●	●			●		●	●	●	●	●	●	●		●	●			●		●		●



ตารางที่ 13. ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไพร์เมอร์ B4 (● แสดงว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น)

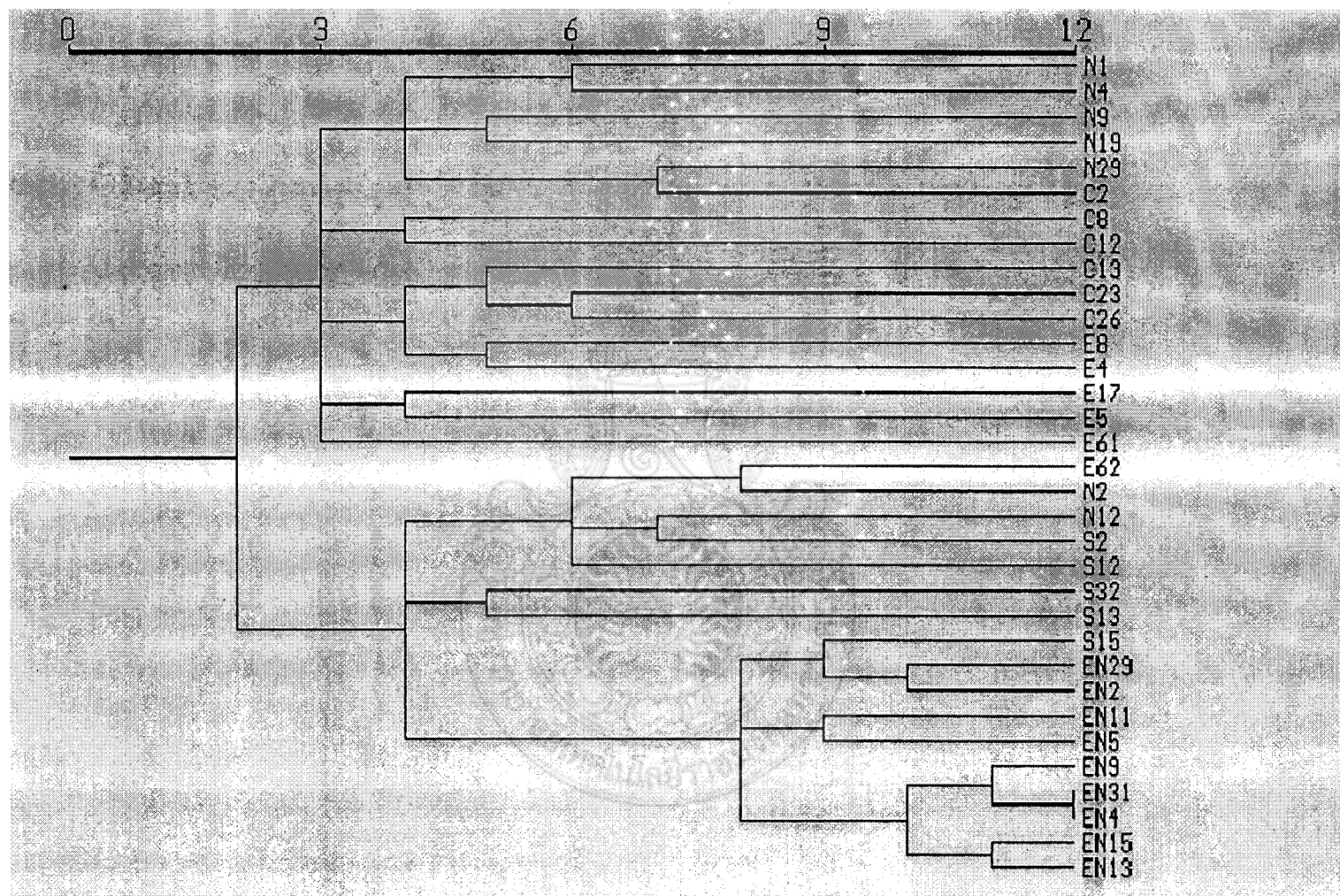
ตัวอย่าง ขนาด (คู่เบส)	N1	N2	N4	N9	N 12	N 19	N 29	EN2	EN4	EN5	EN9	EN 11	EN 13	EN 15	EN 29	EN 31	C2	C8	C 12	C 13	C 23	C 26	E4	E5	E8	E 17	E 61	E 62	S2	S12	S13	S15	S32	
1700	●	●	●					●	●	●	●	●	●	●	●	●								●			●							
1500	●	●	●	●	●	●	●			●	●			●						●			●	●			●	●			●			●
1300	●		●			●	●	●	●		●		●										●								●			●
800	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●			●	●	●	●	●	●	●		●			●
620	●		●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●															●		●	●
600	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
500	●					●	●		●	●	●		●	●	●	●					●	●		●							●		●	●
450	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●							●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●



ตารางที่ 14. ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกระชายหลังจากตัดด้วยไฟร์เมอร์ B5 (● แสดงว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น)

ตัวอย่าง ขนาด (คู่เบส)	N1	N2	N4	N9	N 12	N 19	N 29	EN2	EN4	EN5	EN9	EN 11	EN 13	EN 15	EN 29	EN 31	C2	C8	C 12	C 13	C 23	C 26	E4	E5	E8	E 17	E 61	E 62	S2	S12	S13	S15	S32	
1000		●		●		●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●			●	●						
900		●		●	●	●	●			●	●	●		●	●	●		●	●	●													●	
800						●	●	●		●	●		●				●	●	●		●	●		●	●		●	●	●					
600	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
580	●	●	●	●	●	●	●			●	●	●		●			●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
500		●	●	●		●	●			●	●	●					●	●	●	●									●				●	
400	●		●	●		●	●	●		●	●	●			●		●	●	●	●	●				●	●			●			●	●	





ภาพที่ 12 Phylogeny tree ของกระชาย

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

การใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากกระชายตัวอย่างจากทุกภาคของประเทศไทยทั้งหมด 36 ตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า สามารถจำแนกกระชายได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ แต่ 2 กลุ่มนี้ไม่สอดคล้องกับการจำแนกทางกายภาพ และกระชายตัวอย่างทั้งหมดมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกันมากจนเหมือนมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกันแล้วจึงมีการแพร่กระจายไปตามภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย





บรรณานุกรม

- ธีระชัย ธนानันท์. 2541. การพัฒนาเทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อการจำแนกและรับรองสายพันธุ์ส้มโอ. รายงานการวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัย ธรรม-
ศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี. 59 น.
- ธีระชัย ธนานันท์ และ นฤมล ธนานันท์. 2544. การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบส้มโอพันธุ์สายพันธุ์สายน้ำผึ้ง. รายงานการสัมมนาทางวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12. 172 – 175 น.
- ปรีชา ประเทพา. 2543. พันธุศาสตร์ยุคใหม่ เทคโนโลยีดีเอ็นเอ เพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากร พันธุ
กรรม. อภิชาติการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 210 น.
- พวงเพ็ญ ศิริรักษ์ 2537. พันธุศาสตร์ยุคใหม่ รวมผลงานสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 8. นวิ
ธรรมดาการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 301 น.
- รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2535. พืชเครื่องเทศและสมุนไพร. ตำรา – เอกสารวิชาการฉบับที่ 59. หน่วย
ศึกษานิเทศก์. กรมการฝึกหัดครู. 52 – 53 น.
- วันดี กฤษณพันธ์. 2539. สมุนไพรสารพัดประโยชน์. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล. 264 น.
- วิสุทธิ ใบไม้. 2527. พันธุศาสตร์. ศิลปกิจการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 423 น.
- สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยา
ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 1 – 18 น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.
ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 10 – 67 น.