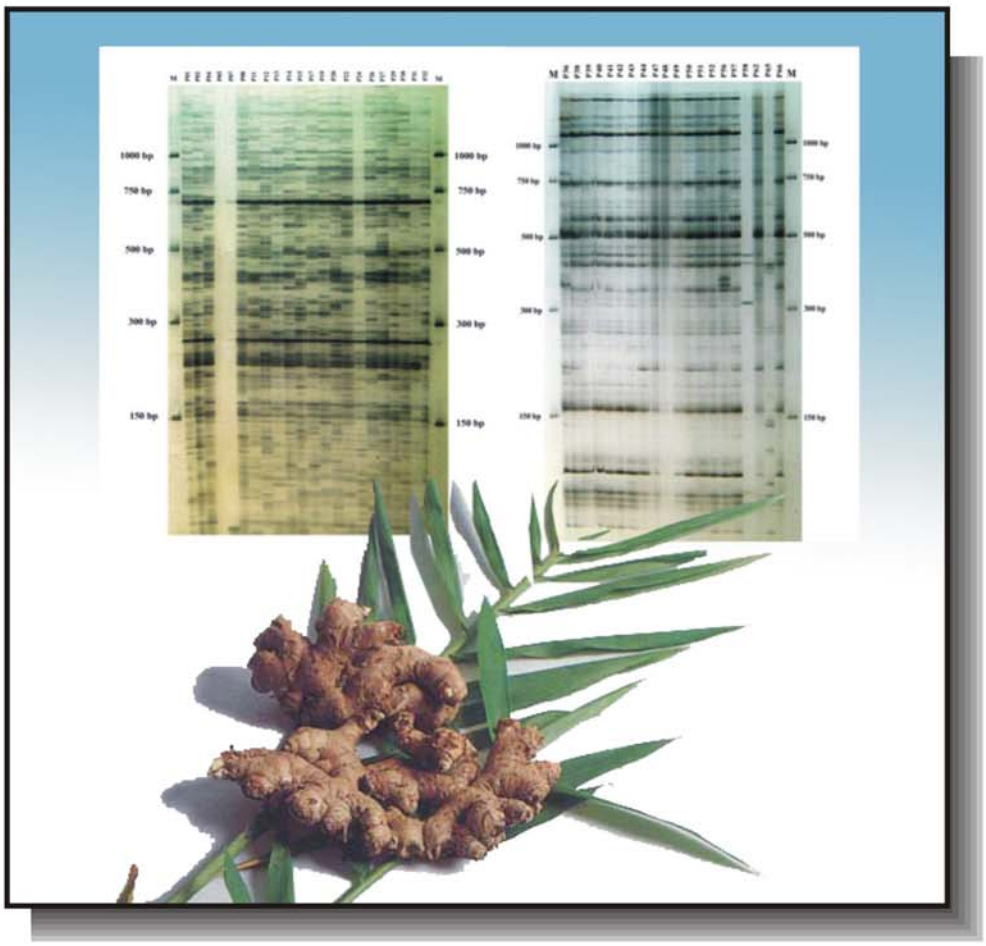
วว.

โครงการวิจัยที่ ภ. 49-21 / ย. 2 / รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพล



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 49-21

การวิจัยและพัฒนาการบูรณาการด้านสมุนไพร “ไพล”

โครงการย่อยที่ 2

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพล

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพล

โดย

อิทธิฤทธิ์ อึ้งวิเชียร

สมนึก ชัยดรุณ

วินัย สุพัฒนกุล

จำลองลักษณ์ เรืองวัชราภรณ์

บรรณาธิการ

นฤมล รื่นไวย์

ลิขิต หาญจางสิทธิ์

บุญเรียม น้อยชุมแพ

พิสุทธิ์ พลับสวาท

วัชรีวรรณ ทรัพย์รุ่งเรือง

วว., กรุงเทพฯ 2554

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นางเกษมศรี หอมชื่น)
ผู้ว่าการ

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง	ข
สารบัญรูป	ค
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	11
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	29
4. สรุปผลการทดลอง	55
5. ข้อเสนอแนะ	57
6. เอกสารอ้างอิง	58

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. รายละเอียดข้อมูลแหล่งที่สำรวจเก็บตัวอย่าง 11
ตารางที่ 2. สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย 18
ตารางที่ 3. ลำดับเบสของ DNA adapter สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ 23
ตารางที่ 4. ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทำ Preselective amplification (PCR I) 24
ตารางที่ 5. ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทำ Selective amplification (PCR II) 25
ตารางที่ 6. คู่ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทำ Selective amplification (PCR II) ของไพล 25

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพลที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ *E*-AAG/*M*-CTA (B4) [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน] 32

รูปที่ 2. Phylogenetic tree ของไพลเหลืองที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11 โดยอาศัยข้อมูลเทคนิค AFLP จำนวน 111 AFLP markers จากคู่ไพรเมอร์ *E*-AAG/ *M* – CTA (B4) 33

รูปที่ 3. ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพลเหลืองที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ *E*-ACC/*M*-CAG (D6) [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน]. 36

รูปที่ 4. Phylogenetic tree ของไพลเหลือง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11 โดยอาศัยข้อมูลเทคนิค AFLP จำนวน 117 AFLP markers จากคู่ไพรเมอร์ *E*-ACC/*M*-CAG (D6) 37

รูปที่ 5. ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพลที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ *E*– ACT/*M*– CAG (F3) [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน] 41

รูปที่ 6. Phylogenetic tree ของไพลเหลืองที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11 โดยอาศัยข้อมูลเทคนิค AFLP จำนวน 139 AFLP markers จากคู่ไพรเมอร์ *E*– ACT/*M*– CAG (F3) 42

รูปที่ 7. Phylogenetic tree ของไพลเหลืองที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11 โดยอาศัยข้อมูลเทคนิค AFLP จำนวน 367 AFLP markers 46

รูปที่ 8. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตัวอย่างไพลและที่ไม่ใช่ไพลจากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ *E*-AGG/ *M*-CAC (H2) [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน] 49

รูปที่ 9. Phylogenetic tree ของไพลชนิดต่าง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11 โดยอาศัยข้อมูลเทคนิค AFLP จำนวน 678 AFLP markers 50

รูปที่ 10. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพลม่วงที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ *E*-ACC/*M*-CAG (D6) [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน] 52

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 11. Phylogenetic tree ของไพลม่วงที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11 โดยอาศัยข้อมูลเทคนิค AFLP จำนวน 508 AFLP markers 53

รูปที่ 12. การกระจายตัวและแนวโน้มในภาพรวมของค่าสีสัน (Hue angle) ของตัวอย่างเหง้าไพลต่างๆ ที่เกิดใหม่และเกิดข้ามปี 54

STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF PHLAI

Ittirit Ungvichian, Somnuk Chaidaroon, Winai Supatanakul and Jamlongluk Ruangwatcharaporn.

ABSTRACT

Phlai (*Zingiber cassumunar* Roxb) belongs to family Zingiberaceae. This medicinal plant has rhizome as a storage organ which can be used in the pharmaceutical industry as raw material of medicine for anti-inflammatory effect, swollenness, and muscular stiffness.

This research was carried out by surveying and collecting about 200 accessions from many regions of Thailand. The 125 accessions have been extracted and identified for their DNA fingerprints. The Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique was used to assess the genetic variation. The correlations were analyzed and classified to correspond with genetic groups. The results of the study showed that all 92 accessions of Phlai could be identified into 4 groups while the genetic segregation between accessions in the same group could be observed.

From this study, the results were also revealed that there was a large genetic diversity of *Zingiber cassumunar* Roxb. in Thailand, and these widely genetic resources could be highly benefited for the development and improvement of Phlai variety in the future.

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพล

อิทธิฤทธิ์ อึ้งวิเชียร[1], สมนึก ชัยดรุณ[1], วินัย สุพัฒนกุล[1] และ จำลองลักษณ์ เรืองวัชราภรณ์[1]

บทคัดย่อ

จากการสำรวจและรวบรวมสายพันธุ์ไพลที่พบในแหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศไทย, สามารถเก็บได้ประมาณ 200 ตัวอย่าง. จากนั้นได้นำมาทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี AFLP เพื่อศึกษาความแปรปรวนและความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพลที่พบ และเพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์, คัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ไพลให้มีผลผลิตและคุณภาพของน้ำมันที่ดีขึ้น. จากตัวอย่างที่การสำรวจและรวบรวม, สามารถทำการสกัดดีเอนเอจากไพลเหลืองจำนวน 92 ตัวอย่าง, ไพลม่วง 15 ตัวอย่าง และพืชในกลุ่มไพล 18 ตัวอย่าง. ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างไพลเหลืองเมื่อใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ และทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11, โดยอาศัยข้อมูลจาก 367 AFLP markers แล้วนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree, โดยวิธี UPGMA (Unweighted Method with Arithmetic Mean) ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตามสัมพันธ์ของตัวอย่างไพลเหลืองได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ และในแต่ละกลุ่มก็ยังมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมอยู่มากพอสมควร. ผลจากการศึกษาดังกล่าวสามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์ไพลเพื่อให้มีคุณลักษณะที่ดีเด่นต่อไป.

---

[1] ฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1. บทนำ

ไพลเป็นพืชในตระกูลเดียวกับขิง, มีเหง้าซึ่งเป็นแหล่งสะสมอาหารและนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเภสัช, ใช้ในการลดการอักเสบ ปวด, บวม, และรักษาการปวดเมื่อย. ปัจจุบันการศึกษาทางด้านวิชาการเขตกรรมและการจัดการที่เหมาะสมต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมยังมีน้อยมาก, ทำให้เกษตรกรมักมีปัญหาในด้านการเพาะปลูกและการจัดการ และนำมาซึ่งปัญหาผลผลิตต่ำ และคุณภาพของผลผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน, เป็นผลให้ระบบการผลิตยาในระดับอุตสาหกรรมเกิดปัญหาวัตถุดิบไม่เพียงพอและมีคุณภาพไม่ได้ตามมาตรฐาน. เนื่องจากการศึกษาทางด้านสรีรวิทยาจะไม่สามารถแจกแจงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ไพลได้อย่างชัดเจน. ดังนั้นหากมีการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA เพื่อช่วยในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม, ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์ไพลต่อไปในอนาคต. รวมทั้งสามารถจัดเก็บเป็นข้อมูลเพื่อใช้ในการอ้างอิง, ป้องกันไม่ให้ต่างประเทศมาใช้ทรัพยากรพืชสมุนไพรของประเทศไทย และทำผลประโยชน์จากทรัพยากรนั้นๆ อย่างไม่เป็นธรรม.

ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, วิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *In vitro* enzymatic gene amplification, เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการทำการศึกษาให้มีปริมาณสูงกว่าเดิม. เทคนิคนี้ถูกค้นพบโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ. 1983 อัตถทิพพหลคุณ (2536), อย่างไรก็ตามแม้ว่าเทคนิค PCR จะเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่าง, แต่ก็ยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง. ดังนั้นในปี ค.ศ. 1990 Williams และคณะ, จึงได้เสนอการใช้ไพรเมอร์ (primer) แบบสุ่มที่เรียงต่อกันแบบสุ่มความยาวประมาณ 8-10 เบส, มีชื่อเรียกว่า Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) หรือเรียกสั้นๆว่า Rapid, ซึ่งเป็นเทคนิคที่ประยุกต์มาจากเทคนิค PCR. โดยเทคนิค RAPD นี้ พบว่าเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน, โดยอาศัยหลักการเรียงตัวของลำดับเบส ได้แก่ Adenine (A), Thymine (T), Guanine (G) และ Cytosine (C) ที่แตกต่างกัน. นำดีเอ็นเอของพืชที่จะทำการทดสอบมาเพิ่มปริมาณในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยา PCR, โดยการสุ่มจับดีเอ็นเอของตัวอย่างพืช โดยใช้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีเบสเรียงกันอยู่ 8-10 ตัว, เป็นตัวสุ่มจับและสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ความยาวประมาณ 3 กิโลเบส. หลังจากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้มาทำปฏิกิริยาเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้า (electrophoresis), ในการใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อการจำแนกความแตกต่างในข้างฟ่าง. ตั้งเปรมศรี (2541) ได้นำ RAPD มาใช้โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 เบส จำนวน 9 ชนิด ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ, พบว่ามีไพรเมอร์

จำนวน 5 ชนิด ที่แสดงความแตกต่างในข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์, ดังนั้นความแตกต่างของข้าวฟ่างจึงขึ้นกับการพบหรือไม่พบแถบดีเอ็นเอ.

ในปีค.ศ. 1993 Zabeau and Vos ได้พัฒนาเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ซึ่งเป็นการนำเอาเอนไซม์ตัดจำเพาะมาใช้ร่วมกับเทคนิค PCR, โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความสามารถในการเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนต่างๆ ของโครโมโซมอย่างจำเพาะเจาะจง, ทำให้สามารถที่จะเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนจีโนม (genome) ซึ่งมีความซับซ้อนได้เป็นอย่างดี. โดยปกติแล้วชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาเลือกเพิ่มปริมาณและตรวจสอบโดยการแยกชิ้นส่วนและขนาดของดีเอ็นเอ, จะปรากฏชิ้นส่วนของดีเอ็นเอประมาณ 50-100 ชิ้นหรือแถบ. จากผลการแยกที่เด่นชัดดังกล่าวจึงได้มีการนำเอาเทคนิค AFLP และเทคนิคทางด้านดีเอ็นเอชนิดอื่นมาใช้ในการศึกษาด้านต่าง ๆ กันอย่างกว้างขวาง.

Lin *et al.* (1996) เปรียบเทียบการทำแผนที่ดีเอ็นเอของถั่วเหลือง (*Glycine max*), โดยใช้เทคนิค RFLP, RAPD และ AFLP. พบว่าเทคนิค AFLP เหมาะสมในการนำมาทำแผนที่ดีเอ็นเอของถั่วเหลืองมากที่สุด, เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic มากกว่าเทคนิคอื่น ๆ.

Rout *et al.* (1998) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *Zingiber officinales* cv. V_3S_{18} ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบพันธุกรรมกับต้นพืชที่ปลูกในแปลงทดลอง รวม 15 ตัวอย่าง, พบว่าพืชจากทั้งสองแหล่งไม่มีความแปรผันทางพันธุกรรม.

Singh *et al.* (1999) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสะเดา 37 ตัวอย่างเก็บจากแหล่งต่างๆ ของประเทศอินเดีย และสะเดา 4 ตัวอย่างจากประเทศไทย, โดยใช้เทคนิค AFLP เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย 7 คู่ไพรเมอร์ได้แถบดีเอ็นเอ 422 แถบ. วิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard, เมื่อนำผลที่ได้ไปสร้างเดรนโดรแกรมโดยวิธี UPGMA, สามารถแยกสะเดา 37 ตัวอย่าง ของประเทศอินเดียออกจากสะเดา 4 ตัวอย่าง ที่เก็บจากประเทศไทยได้อย่างชัดเจน.

Chaoa *et al.* (2005) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของคล้า จำนวน 34 พันธุ์ โดยเทคนิค AFLP และใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะคือ *Eco*RI และ *Mse*I, เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย

ไพรเมอร์ 6 คู่ ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 733 แถบ. โดยจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดอยู่ระหว่าง 105-136 แถบต่อคู่ไพรเมอร์, เกิด Polymorphic 67.8 เปอร์เซ็นต์และหลังจากเปรียบเทียบความสัมพันธ์ โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Jacccard, เมื่อนำผลที่ได้ไปสร้างเดรนโดรแกรมโดยวิธี UPGMA, สามารถแบ่งกลุ่มของคล้าออกได้เป็น 4 กลุ่ม.

Khampila *et al.* (2005) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของพืชในสกุล Zingiber จำนวน 20 ชนิด, สกุล Alpinia 2 ชนิด และ Amomum 1 ชนิด ด้วยเทคนิค RAPD. ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 24 ชนิด, ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 237 แถบ. เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.1 โดยจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA, สามารถจัดพืชที่ศึกษาได้เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งส่วนมากสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา.

Jones *et al.* (2006) ใช้เทคนิค AFLP กับลิ้นจี่ 83 ตัวอย่างที่เก็บจากประเทศสหรัฐอเมริกา, ประเทศไทย และประเทศจีน. สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 337 แถบ, วิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ DICE, ในการศึกษาพันธุ์ลิ้นจี่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศจีน, อินเดีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้.

Chavan *et al.* (2008) ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกพืชในสกุลขิงที่มีความสำคัญทางการค้าระหว่าง *Zingiber officinale, Zingiber zerumbet* และ *Zingiber cassumunar* (หรือไพลไทย). โดยใช้เทคนิค SCAR, สามารถแยก *Zingiber officinale* ออกจากกลุ่มได้.

Bua-in and Paisooksantivatana (2009) ศึกษาพืชในสกุลขิงจำนวน 14 ชนิด 51 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD, ใช้ไพรเมอร์ 29 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 611 แถบ และพบความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างของ *Zingiber montanum*, ที่เก็บจาก 6 พื้นที่ของประเทศไทยโดยมีความแปรผันทางพันธุกรรม 87 เปอร์เซ็นต์.

เทคนิคการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลายชนิดรวมทั้งพืชตระกูลขิง, เห็นได้ว่าเทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ, จึงได้นำมาศึกษากันอย่างแพร่หลายในการหาความหลากหลาย หรือความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์. ในงานวิจัยการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพลจึงเลือกใช้เทคนิค AFLP, เพื่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีหลายรูปแบบ (polymorphism) และสามารถใช้ในการจัดกลุ่มของไพลที่มาจากหลายท้องถิ่นได้.

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไพล

ไพลเหลือง

ชื่ออื่นๆ : ปูเลย (ภาคเหนือ) (Pu-loei), พันเลย (Phan-loei), ปันเลย (เขมร) (Phan-loei) ไพล (ภาคกลาง), ว่านไฟ, ปูลอย.

ชื่อสามัญ : (Phlai), Cassumunar

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr. (Synonym: *Zingiber cassumunar* Roxb., *Zingiber purpureum* Roscoe)

ชื่อวงศ์ : ZINGIBERACEAE

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น : ลำต้นใต้ดินลักษณะเป็นเหง้าใหญ่ เนื้อในสีเหลืองแกมเขียว มีกลิ่นเฉพาะ.

ใบ : เดี่ยวเรียงสลับ รูปเรียวยาวปลายแหลม.

ดอก : เป็นช่อรูปกรวย แทงออกจากเหง้าใต้ดิน กลีบดอกสีนวล ใบประดับสีม่วง.

นิเวศวิทยา

ถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียแถบประเทศอินเดีย, มาเลเซีย, อินโดนีเซีย และไทย.ปลูกมากแถบสระแก้ว, ปราจีนบุรี, สุพรรณบุรี, กาญจนบุรี.

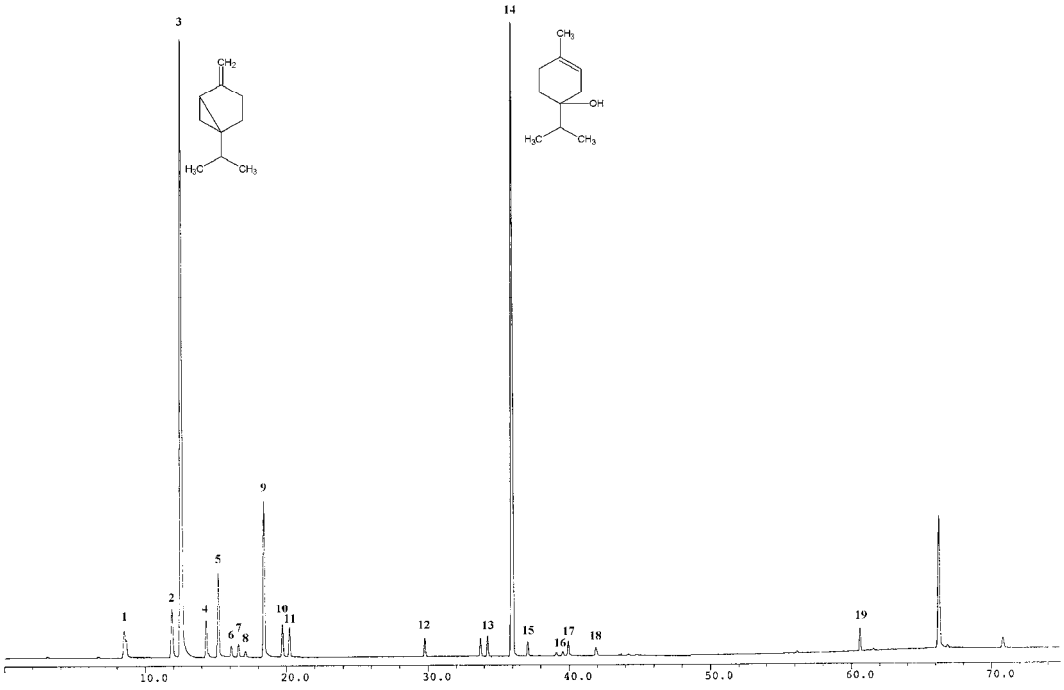
สรรพคุณ

เหง้า : แก้บิด, ขับฟองโลหิต, แก้ปวดท้อง, แก้ท้องผูก, แก้ท้องอืดเฟ้อ, แก้จุกเสียด, บีบมดลูก, แก้ปวดบวม.

น้ำมันไพล : น้ำมันสกัดจากเหง้าไพล ได้รับการพิสูจน์ผลทางยาแก้ปวดบวม โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และคณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล.

องค์ประกอบทางเคมีจากผลการวิจัย

เหง้าสด ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 0.8-1.0, องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันมีดังนี้ a-pinene; b-pinene; sabinene; a-terpinene; g-terpinene; terpinene-4-ol; 1-(3, 4 dimethoxyphenyl) buta-2-4 diene (DMPBD); camphene; myrcene; limonene; 1, 8-cineol; p-cymene; terpinolene; cis-sabinene hy drate; trans-sabinene hydrate; cis-p-menth-2-en-1-ol; trans-p-menth-2-en-1-ol; terpi nene-4-yl acetate; a- terpineol; a-terpinyl acetate; cis-piperitol .



รูปโครมาโทแกรม

1. α-pinene + α-thujene (2.10), 2. β-pinene (2.65), 3. sabinene (34.68), 4. myrcene + α-phellandrene (1.59), 5. α-terpinene (3.69), 6. limonene (0.45), 7. β-phellandrene (0.54), 8. 1,8-cineole (0.27), 9. γ-terpinene (6.73), 10. p-cymene (1.26), 11. terpinolene (1.14), 12. sabinene hydrate (0.63), 13. trans-menth-2-en-1-ol (0.71), 14. terpinen-4-ol (32.30), 15. cis-menth-2-en-1-ol (0.49), 16. terpinyl acetate (0.17), 17. α-terpineol (0.56), 18. trans-piperitol (0.84), 19. elemicin (0.76).

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ฤทธิ์ต้านอักเสบ (anti-inflammatory), ฤทธิ์ไล่แมลง/ฆ่าแมลง (insecticide/ insect repellant), ฤทธิ์คุมกำเนิด (spermicide), ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial).

รูปแบบของผลิตภัณฑ์

ครีมและขี้ผึ้งทาแก้ปวดบวม.

ความเป็นพิษ

1. น้ำมันไพลมีค่าขนาดของยาที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (LD50) ในหนูถีบจักร, หนูขาว และกระต่าย, เป็น 2.15, 0.86 และ 0.82 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามลำดับ.

2. การศึกษาพิษเฉียบพลันของน้ำมันไพลในหนูถีบจักร, หนูขาว และกระต่าย โดยการให้ยาทางปาก พบว่าน้ำมันไพลขนาดสูง ทำให้เกิดอาการผิดปกติในสัตว์ทดลอง. โดยทำให้การเคลื่อนที่ลดลง, สูญเสียการควบคุมการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อร่างกาย, สูญเสีย Wrighting reflex และตายในที่สุด.

3. Terpinene-4-ol มีค่า LD50 ในหนูเพศผู้ 3.55 กรัม/กิโลกรัม, LD50 ในหนูเพศเมีย 2.50 กรัม/กิโลกรัม.

4. น้ำมันไพล และ Terpinene-4-ol (99.5 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีผลแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์, เมื่อทดสอบด้วยวิธี Ames' Test โดยใช้เชื้อ Salmonella typhi murium TA 98 และ TA 100.

ไพลดำ

ชื่ออื่นๆ : ปูเลยดำ, ไพลม่วง, ดากเงาะ

ชื่อสามัญ : -

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Zingiber ottensii* Valeton (Synonym: Z. spectabile Griff.)

ชื่อวงศ์ : ZINGIBERACEAE

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น : ไม้ล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน เนื้อในเหง้ามีสีม่วงเข้ม, กลิ่นฉุนปลูกยาก แตกหน่อน้อย หนึ่งปีจะแตกแค่ 2-3 หน่อเท่านั้น.

ใบ : เดี่ยวเรียงสลับ โตกว่าไพล เล็กน้อย, กาบใบและก้านใบสีเข้ม.

ดอก : ช่อออกที่โคนต้น แทงช่อขึ้นมาจากเหง้าใต้ดิน, ใบประดับเมื่อยังอ่อนมีสีแดงปนเขียวแล้วเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือแดงเข้ม, กลีบดอกสีเหลืองอ่อน.

นิเวศวิทยา

พบในแถบร้อนชื้น.

สรรพคุณ

ใบ : แก้ครั่นเนื้อครั่นตัว แก้ปวดเมื่อย.

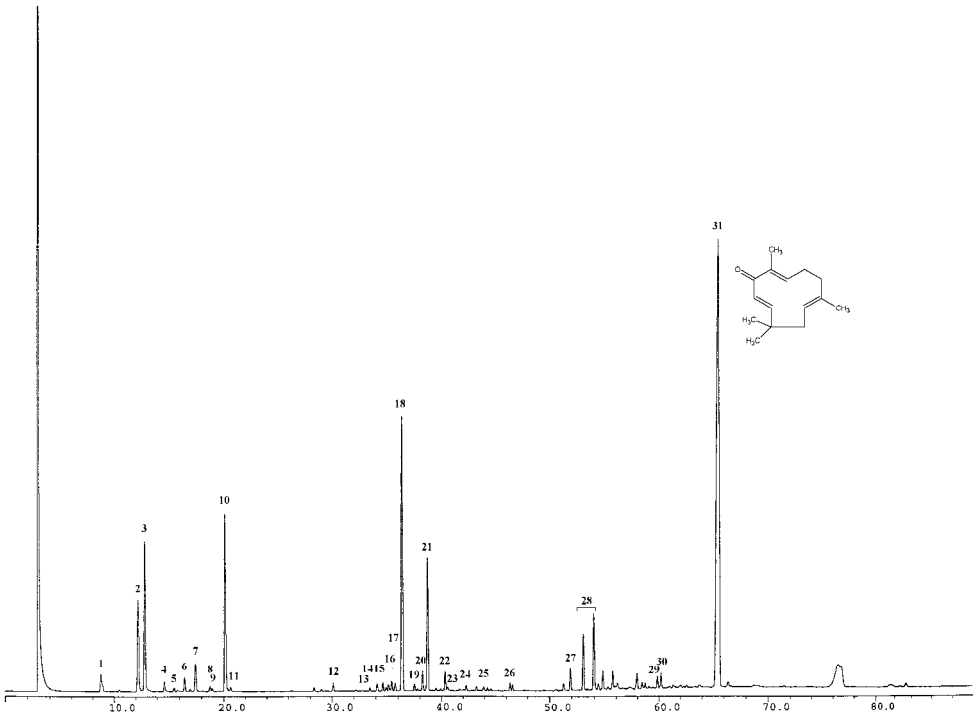
ดอก : แก้ช้ำใน, กระจายเลือดที่เป็นลิ่มเป็นก้อน, กระจายเลือดอันเกิดจากอภิญญาญาณธาตุ, ทำลายเลือดเสีย, ขับระดู, ต้นแก้อุจจาระพิการ, แก้ธาตุพิการ.

ราก : แก้เลือดกำเดา, แก้อาเจียนเป็นโลหิต.

เหง้า : ขับระดู, แก้เหน็บชา, แก้ปวดท้อง, แก้บิดเป็นมูกเลือด, ขับลม, แก้ท้องเสีย, แก้ลำไส้อักเสบ, ขับเลือดร้าย, แก้มุดกิตขาว, แก้อาเจียน, แก้ปวดฟัน, แก้อาเจียนเป็นโลหิต, แก้เด็กเป็นไข้สูงตัวสั่นตาเหลือก, แก้เคล็ดขัดยอก, ข้อเท้าแพลง, แก้โรคผิวหนัง, แก้ฝี, ทาแผลป้องกันการติดเชื้อ, ดูดหนอง, สมานแผล, แก้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เป็นยาทาเฉพาะที่.

องค์ประกอบทางเคมีจากผลการวิจัย

เหง้าสดประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 0.38, องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันมีดังนี้: องค์ประกอบทางเคมีที่ได้เคยมีรายงาน b-pinene (5.08 เปอร์เซ็นต์), d-3-carene (1.30 เปอร์เซ็นต์), g-terpinolene (5.13 เปอร์เซ็นต์), linalool (0.36 เปอร์เซ็นต์), terpinen-4-ol (16.81 เปอร์เซ็นต์), a-terpinolene (2.30 เปอร์เซ็นต์), a-copaene (0.08 เปอร์เซ็นต์), b-elemene (0.17 เปอร์เซ็นต์), b-elemene (0.17 เปอร์เซ็นต์), limonene (0.16 เปอร์เซ็นต์), a-gurjunene (0.12 เปอร์เซ็นต์), b-caryophyllene (1.46 เปอร์เซ็นต์), a-humulene (10.93 เปอร์เซ็นต์), b-bisabolene (0.31 เปอร์เซ็นต์), b-sesquiphyllandrene (1.50เปอร์เซ็นต์), humulene epoxide II (2.91 เปอร์เซ็นต์), b-eudesmol (0.94 เปอร์เซ็นต์), zerumbone (25.63 เปอร์เซ็นต์).



รูปโครมาโทแกรม

1. α-pinene + α-thujene (5.24), 2. β-pinene (4.32), 3. sabinene (6.48), 4. myrcene (0.36), 5. α-terpinene, 6. limonene (0.53), 7. 1,8-cineol, 8. γ-terpinene (0.17), 9. E-β-ocimene, 10. p-cymene (6.93), 11. terpinolene (0.15), 12. sabinene hydrate (0.29)*, 13. linalool (0.10), 14. sabinene hydrate (0.26)*, 15. bornyl acetate (0.27), 16. β-elemene, 17. β-caryophyllene (0.35), 18. terpinen-4-ol (11.17), 19. cis-menth-2-en-1-ol (0.23), 20. 2-alkanone (0.70), 21. humulene (5.64), 22. α-terpinene, 23. borneol (0.19), 24. trans-piperitol (0.17), 25. 4-phenyl butan-2-one (0.14), 26. p-cymene-8-ol (0.24), 27. caryophyllene oxide (0.77), 28. humulene oxides (4.90)*, 29. α-eudesmol (0.40), 30. β-eudesmol (0.61), 31. zerumbone (40.14).

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ไพลดำแสดงฤทธิ์ฆ่าไรทะเล, มีค่า IC50 ที่ความเข้มข้น 65 ppm และสาร zerumbone มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราก่อโรคพืช.

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

2.1.1 แหล่งเก็บตัวอย่างไพล

ตารางที่ 1. รายละเอียดข้อมูลแหล่งที่สำรวจเก็บตัวอย่าง

ลำดับ	หมายเลข	ชื่อท้องถิ่น	จังหวัด	พิกัดตำแหน่ง	ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (ม.)
1	P1	ไพลเหลือง	ตาก	N16 26.929 E98 47.797	751
2	P2	ไพลเหลือง	ตาก	N16 26.921 E98 47.794	749
3	P4	ไพลเหลือง	ตาก	N16 25.957 E98 48.582	736
4	P5	ไพลม่วง	ตาก	N16 25.973 E98 48.566	741
5	P7	ไม่ใช่ไพล	ตาก	N16 25.973 E98 48.550	731
6	P8	ไพลม่วง	ตาก	N16 25.954 E98 48.536	715
7	P9	ไพลม่วง	ตาก	N16 25.944 E98 48.536	713
8	P11	ไพลม่วง	หนองคาย	-	-
9	P12	ไพลเหลือง	หนองคาย	-	-
10	P13	ไพลเหลือง	หนองคาย	N18 16.411 E103 14.864	179
11	P14	ไพลเหลือง	หนองคาย	N18 24.732 E103 31.364	172
12	P15	ไพลเหลือง	หนองคาย	N18 25.047 E103 28.053	161
13	P17	ไพลเหลือง	หนองคาย	N18 13.536 E103 51.928	159
14	P18	ไพลเหลือง	หนองคาย	N18 10.602 E103 54.055	159
15	P19	ไม่ใช่ไพล	หนองคาย	N18 10.579 E103 54.054	153
16	P20	ไพลเหลือง	หนองคาย	N18 00.411 E104 00.740	173
17	P22	ไพลเหลือง	นครพนม	N17 06.866 E104 46.533	154

ลำดับ	หมายเลข	ชื่อท้องถิ่น	จังหวัด	พิกัดตำแหน่ง	ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (ม.)
18	P24	ไพลเหลือง	มุกดาหาร	N16 25.714 E104 33.182	162
19	P25	ไพลม่วง	มุกดาหาร	N16 25.681 E98 33.212	164
20	P26	ไพลเหลือง	กาฬสินธุ์	N16 30.961 E104 07.661	173
21	P27	ไพลเหลือง	สกลนคร	N17 07.421 E104 03.353	204
22	P29	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N15 07.554 E101 34.242	263
23	P30	ไพลเหลือง	ลพบุรี	N15 01.669 E101 16.737	205
24	P31	ไพลเหลือง	สระบุรี	N14 50.085 E101 17.777	399
25	P32	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 35.838 E101 39.033	483
26	P33	ไพลม่วง	นครราชสีมา	N14 35.806 E101 39.019	497
27	P36	ไพลเหลือง	จันทบุรี	N12 28.736 E102 10.438	6
28	P37	ไพลเหลือง	ตราด	N12 35.705 E102 27.843	35
29	P38	ไพลเหลือง	ตราด	N12 35.705 E102 27.843	35
30	P39	ไพลเหลือง	ตราด	N12 41.111 E102 27.651	110
31	P40	ไพลเหลือง	จันทบุรี	N12 43.630 E102 13.448	8
32	P41	ไพลเหลือง	จันทบุรี	N13 09.467 E102 13.914	184
33	P42	ไพลเหลือง	สระแก้ว	N13 26.832 E102 13.689	135
34	P43	ไพลเหลือง	สระแก้ว	N13 34.729 E102 20.059	84
35	P44	ไพลเสก	สระแก้ว	N13 39.188 E102 26.735	51
36	P47	ไพลเหลือง	ตราด	N12 14.063 E102 37.668	9
37	P48	ไพลเหลือง	ตราด	N11 51.144 E102 49.768	11
38	P49	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N15 36.617 E102 07.548	183
39	P50	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N15 16.723 E102 38.150	149
40	P51	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N15 11.770 E102 31.073	148
41	P52	ไพลเหลือง	สระบุรี	N14 53.498 E101 26.418	237

ลำดับ	หมายเลข	ชื่อท้องถิ่น	จังหวัด	พิกัดตำแหน่ง	ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (ม.)
42	P53	ไพลเสก	สระบุรี	N14 36.910 E101 00.722	29
43	P54	ไพลม่วง	สระบุรี	N14 36.907 E101 00.733	28
44	P55	ไพลเหลือง	สระบุรี	N14 31.078 E101 00.905	18
45	P56	ไพลเหลือง	สระบุรี	N14 23.975 E101 05.982	16
46	P57	ไพลเหลือง	ตราด	-	-
47	P58	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	-	-
48	P59	ไพลม่วง	เชียงใหม่	-	-
49	P60	ไพลม่วง	เชียงราย	N19 31.273 E98 57.759	472
50	P61	ไม่ใช่ไพล	เชียงราย	N19 31.259 E98 57.751	478
51	P62	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	N19 37.779 E98 57.554	591
52	P63	ไพลม่วง	เชียงราย	N19 35.566 E98 57.545	498
53	P64	ไพลดำ	เชียงใหม่	N19 26.575 E99 01.617	430
54	P65	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	N19 23.105 E99 09.266	419
55	P66	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	N19 33.443 E98 38.471	691
56	P67	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	N19 33.437 E98 38.464	728
57	P68	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	-	-
58	P69	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	N19 22.567 E98 57.234	416
59	P70	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 31.743 E101 57.950	176
60	P71	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 31.650 E101 57.943	236
61	P72	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 22.698 E101 52.372	416
62	P73	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 22.803 E101 54.604	434
63	P75	ไพลม่วง	นครราชสีมา	-	-
64	P76	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 22.767 E101 52.233	460
65	P78	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 23.232 E101 42.032	438

ลำดับ	หมายเลข	ชื่อท้องถิ่น	จังหวัด	พิกัดตำแหน่ง	ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (ม.)
66	P79	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 33.177 E101 34.572	464
67	P81	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 39.760 E101 47.449	258
68	P83	ไพลเหลือง	ปราจีนบุรี	N14 15.316 E101 53.665	159
69	P85	ไพลม่วง	นครราชสีมา	N14 16.190 E101 52.681	107
70	P86	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	-	-
71	P87	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 17.055 E101 53.799	103
72	P88	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 41.606 E101 54.709	219
73	P89	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 40.323 E102 11.313	176
74	P90	ไพลเสก	นครราชสีมา	N14 32.864 E102 06.037	216
75	P91	ไพลม่วง	นครราชสีมา	N14 32.830 E102 06.023	214
76	P92	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	-	-
77	P93	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 31.192 E102 15.692	200
78	P94	ไพลม่วง	นครราชสีมา	N14 31.190 E102 15.689	204
79	P95	ไพลเหลือง	นครราชสีมา	N14 29.133 E102 19.565	231
80	P96	ไพลเหลือง	บุรีรัมย์	N14 25.509 E102 36.540	214
81	P97	ไพลม่วง	สระแก้ว	N13 55.926 E102 42.970	78
82	P98	ไพลเหลือง	สระแก้ว	N13 48.711 E102 41.926	47
83	P99	ไพลเหลือง	สระแก้ว	N13 53.109 E102 44.559	59
84	P100	ไพลเขมร	สระแก้ว	N14 01.491 E102 49.469	65
85	P101	ไพลเสก	สระแก้ว	N14 02.134 E102 49.515	63
86	P102	ไพลเหลือง	บุรีรัมย์	N14 25.169 E102 56.387	233
87	P106	ไพลเหลือง	ร้อยเอ็ด	N15 39.864 E103 58.177	126
88	P107	ไพลเหลือง	อุบลราชธานี	N15 20.239 E104 38.957	125
89	P108	ไพลเหลือง	มุกดาหาร	N16 26.058 E104 36.772	186

ลำดับ	หมายเลข	ชื่อท้องถิ่น	จังหวัด	พิกัดตำแหน่ง	ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (ม.)
90	P109	ไพลเหลือง	มุกดาหาร	N16 23.435 E104 32.232	160
91	P111	ไพลเหลือง	ราชบุรี	N13 51.637 E99 52.723	38
92	P112	ไพลเหลือง	ราชบุรี	N13 56.946 E99 52.668	2
93	P115	ไพลเหลือง	นครสวรรค์	N15 46.522 E99 56.566	37
94	P116	ไพลเหลือง	ตาก	N16 07.752 E98 52.616	524
95	P117	ไพลเหลือง	ตาก	N16 05.086 E98 51.886	556
96	P118	ไพลม่วง	ตาก	N16 05.087 E98 51.865	545
97	P119	ไพลม่วง	ตาก	N16 04.338 E98 51.041	512
98	P120	ไพลเหลือง	ตาก	N16 04.312 E98 50.989	498
99	P122	ไพลม่วง	ตาก	N16 02.380 E98 39.890	764
100	P123	ไพลเหลือง	ตาก	N16 02.059 E98 39.668	749
101	P124	ไพลม่วง	ตาก	N16 02.054 E98 39.683	752
102	P125	ไพลม่วง	ตาก	N16 12.049 E98 52.906	528
103	P126	ไพลม่วง	ตาก	N16 20.828 E99 00.701	986
104	P127	ไม่ใช่ไพล	ตาก	N16 20.828 E99 00.701	991
105	P129	ไพลเหลือง	ตาก	N16 52.880 E98 37.645	216
106	P130	ไพลเหลือง	ตาก	N16 54.236 E98 36.956	212
107	P133	ไม่ใช่ไพล	ตาก	N17 13.819 E98 13.976	162
108	P134	ไม่ใช่ไพล	ตาก	N17 34.218 E97 54.680	94
109	P135	ไพลเหลือง	แม่ฮ่องสอน	N18 06.414 E97 56.333	235
110	P136	ไพลม่วง	แม่ฮ่องสอน	N18 06.420 E97 56.327	233
111	P140	ไพลเหลือง	แม่ฮ่องสอน	N18 03.418 E97 54.910	202
112	P141	ไพลเหลือง	แม่ฮ่องสอน	N18 31.961 E97 56.033	325
113	P142	ไพลม่วง	แม่ฮ่องสอน	-	-

ลำดับ	หมายเลข	ชื่อท้องถิ่น	จังหวัด	พิกัดตำแหน่ง	ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (ม.)
114	P144	ไพลเหลือง	แม่ฮ่องสอน	N19 30.675 E98 04.673	427
115	P146	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	N19 10.334 E98 41.519	733
116	P147	ไพลม่วง	เชียงใหม่	N19 10.335 E98 41.517	742
117	P148	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	N19 27.436 E98 58.096	443
118	P149	ไม่ใช่ไพล	เชียงราย	N19 39.092 E99 09.563	544
119	P150	ไม่ใช่ไพล	เชียงราย	N20 05.607 E99 16.797	974
120	P151	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	N20 05.551 E99 15.591	1006
121	P152	ไพลม่วง	เชียงใหม่	N20 05.540 E99 15.593	1005
122	P153	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	N20 01.493 E99 16.102	501
123	P156	ไพลเหลือง	เชียงราย	N19 48.345 E99 45.315	379
124	P157	ไพลเหลือง	เชียงราย	N19 30.255 E99 44.989	395
125	P158	ไพลเหลือง	พะเยา	N19 07.061 E99 54.459	419
126	P159	ไพลเหลือง	ลำปาง	N18 42.664 E99 57.466	279
127	P160	ไพลเหลือง	ลำปาง	N18 22.619 E99 36.352	266
128	P161	ไพลเหลือง	ลำปาง	N18 08.655 E99 25.718	227
129	P162	ไพลเหลือง	แพร่	-	-
130	P163	ไพลเหลือง	ตาก	-	-
131	P164	ไพลเหลือง	เพชรบูรณ์	-	-
132	P165	ไพลเหลือง	เพชรบูรณ์	-	-
133	P166	ไพลเหลือง	เพชรบูรณ์	-	-
134	P167	ไพลเหลือง	หนองคาย	-	-
135	P168	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	-	-
136	P169	ไพลเหลือง	เชียงใหม่	-	-
137	P170	ไพลเหลือง	สกลนคร	-	-

ลำดับ	หมายเลข	ชื่อท้องถิ่น	จังหวัด	พิกัดตำแหน่ง	ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (ม.)
138	P171	ไพลเหลือง	หนองคาย	-	-
139	P172	ไพลเหลือง	สระแก้ว	-	-
140	P173	ไพลหยวก	สระแก้ว	-	-
141	P174	ไพลเหลือง	สระแก้ว	-	-
142	P175	ไพลหยวก	นครปฐม	-	-
143	P176	ไพลหยวก	นครปฐม	-	-
144	P177	ไพลเหลือง	สุโขทัย	-	-
145	P178	ไพลเหลือง	พิษณุโลก	-	-
146	P179	ไพลหิน	กาญจนบุรี	-	-
147	P180	ไพลหยวก	กาญจนบุรี	-	-
148	P181	ไพลหยวก	กาญจนบุรี	-	-
149	P182	ไพลหยวก	กาญจนบุรี	-	-
150	P183	ไพลเสก	สระแก้ว	-	-
151	P184	ไพลม่วง	ขอนแก่น	-	-
152	P185	ไพลเหลือง	ขอนแก่น	-	-
153	P186	ไพลเหลือง	หนองคาย	-	-
154	P187	ไพลหยวก	สกลนคร	-	-
155	P188	ไพลเหลือง	สกลนคร	-	-
156	P189	ไพลม่วง	-	-	-

2.1.2 สารเคมี

ตารางที่ 2. สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

สารเคมี	ความบริสุทธิ์ %	บริษัท/ยี่ห้อ	รหัสสินค้า
2-mercaptoethanol	99	Merck	1.15433.0100
37% Formaldehyde	-	Merck	1.04003.2500
40% Acrylamide	-	Amersham Biosciences	17-1301-01
87% Glycerol	88	Amersham Biosciences	17-1325-01
Acetic acid	99.8	Merck	1.00063.2500
Agarose	-	GIBCO BNL	15510-019
Ammonium persulfate	98	Amersham Biosciences	17-1311-01
Bind silane	97	Amersham Biosciences	17-1330-01
Boric acid	-	Promega	161-0751
Bromophenol blue	-	Amersham Biosciences	62625-28-9
Chloroform	99.0-99.4	BDH	100776B
Deionized water	-	Labconco	-
Disodium ethylene diamine tetra acetate (EDTA)	99	Bio-rad	161-0729
dNTPs (dTTP, dATP, dCTP, dGTP)	-	Promega	U1240
*Eco*RI adapter, *Mse*I adapter	-	BSU Bioservice Unit	-
*Eco*RI adapter-A	-	BSU Bioservice Unit	-
*Eco*RI adapter-AAG	-	BSU Bioservice Unit	-
*Eco*RI adapter-ACA	-	BSU Bioservice Unit	-
*Eco*RI adapter-ACC	-	BSU Bioservice Unit	-
*Eco*RI adapter-ACT	-	BSU Bioservice Unit	-
*Eco*RI adapter-AGG	-	BSU Bioservice Unit	-
Ethanol alcohol	95	-	-
Ethidium bromide	-	Amersham Biosciences	17-1328-01
Formamide	99	Merck	1.12027.0100

สารเคมี	ความบริสุทธิ์ %	บริษัท/ยี่ห้อ	รหัสสินค้า
Hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)	98	Research Organics	1296c
Hydrochloric acid (HCl)	37	Merck	1.00317
Isoamyl alcohol	98.5	UNIVAR	1105
Isopropanol (2-propanol)	99.7	Merck	1.09634.2500
Lambda DNA / *Eco*RI+*Hin*fIII	-	Promega	G1731
Magnesium chloride (MgCl2)	99	Scharlau	MA0036
Methylene bisacrylamide	-	Amersham Biosciences	17-1304-01
*Mse*I adapter-C	-	BSU Bioservice Unit	-
*Mse*I adapter-CAA	-	BSU Bioservice Unit	-
*Mse*I adapter-CAC	-	BSU Bioservice Unit	-
*Mse*I adapter-CTA	-	BSU Bioservice Unit	-
*Mse*I adapter-CTT	-	BSU Bioservice Unit	-
*Mse*I adapter-CAT	-	BSU Bioservice Unit	-
N,N,N′, N′-tetramethyl ethylene diamine (TEMED)	99	Amersham Biosciences	17-1312-01
PCR Markers	-	Promega	G316A
Phi X174 RF DNA *Hin*f I	-	AB gene	AB -0391
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	-	Fluka	81390
Potassium chloride (KCl)	99.5	Merck	1.04936.1000
Ribonuclease (Rnase A)	-	Amersham Biosciences	27-0323.01
Silver nitrate	-	Merck	1.01512.0100
Sodium acetate	99	Merck	1.01539.0500
Sodium carbonate	99.9	Merck	1.06392.1000
Sodium chloride	99.5	Merck	1.06498.1000
Sodium chloride (NaCl)	99.5	Fluka	71376
Sodium hydroxide	99	Merck	1.06498.00
Sodium metabisulfate	98	Fluka	71928

สารเคมี	ความบริสุทธิ์ %	บริษัท/ยี่ห้อ	รหัสสินค้า
Sodium thiosulfate pentahydrate	99.5	Scharlau	So 0727
Taq DNA polymerase	-	Promega	M166B
Tris base	99.9	Amersham Biosciences	US75825
Tris-HCl	99	Amersham Biosciences	22676
*Tru*9I	-	Promega	R701A
Urea	100	Amersham Biosciences	57-13-6
Xylene cyanol	-	Fluka	42135
น้ำยาเคลือบกระจก	-	ห้างหุ้นส่วนจำกัด เคลียร์วิว	-
ไนโตรเจนเหลว	-	รังสิตอินดัสเตรียลแก๊ส	-

2.1.3 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ : GeneAmp®PCR system, Perkin-Elmer, USA.
- เครื่องวัดความเป็นกรด- เบส (pH meter) : Cyberscan 500 pH, Eutech Instruments, Singapore.
- เครื่องหมุนเหวี่ยงตัวอย่าง (centrifuge machine) : Universal 16R, Hettich Zentrifugen.
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) : HICLAVE TM HV-50, Hirayama, Japan.
- Micropipette : Transferpette®, Brand ขนาด P-10, P-50, P-200, P-1000.
- Pipette tips : Labsystem (ขนาด 1,000 ไมโครลิตร), Pharmacia Biotech, USA Costar (ขนาด 200 ไมโครลิตร), Corning Inc., USA Brand (ขนาด 10 ไมโครลิตร), Pharmacia Biotech, USA.
- หลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร : NalgeneTM, Nalgene, USA.
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร : SorensonTM, Bioscience Inc., USA.
- หลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร : SorensonTM, Bioscience Inc., USA.
- เตาไมโครเวฟ : รุ่น Super showerwave, Sanyo.
- Hybridization oven / Shaker : รุ่น SI20H, Stuart Scientific.
- ชุดถ่ายภาพเจลอะกาโรส Video Documentation System (VDS) : Image Master® VDS, Pharmacia Biotech, USA.
- ชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส : Power Supply EPS 301, Submarine HE99X, Pharmacia Biotech, USA.

- ชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบตั้ง : Hoefer®SQ3 Sequence Amersham biotech pharmacia รุ่น EPS 3500.
- ชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบตั้ง : BIO-RAD รุ่น Power PAC 3000.
- เครื่องวัดสี (chroma meter) Minolta รุ่น CR-200.

2.2 วิธีการ

2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใบ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยวิธีประยุกต์จาก Doyle and Doyle (1990) ซึ่งแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้ :

1. เลือกแผ่นใบที่มีขนาดพอสมควรแต่ยังไม่แก่จัดน้ำหนักประมาณ 0.5 กรัมต่อตัวอย่าง ใส่ลงในโกร่ง, เติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วม, บดให้ละเอียด ปล่อยให้ไนโตรเจนเหลวระเหยไปจนหมด แล้วถ่ายผงใบใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร, เติมสารละลาย CTAB Extraction buffer (0.2 กรัม CTAB, 1 mM NaCl, 0.1 กรัม PVP, 0.01 กรัม Sodium metabisulfate, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA) 700 ไมโครลิตร, บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส.

2. บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุก 15 นาที.

3. สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ chloroform ผสมกับ isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24 : 1 จำนวน 700 ไมโครลิตร, ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเบาๆ นานประมาณ 10 นาที.

4. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงตัวอย่าง (centrifuge machine) ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที.

5. ใช้ปิเปตต์ดูดส่วนใสด้านบน ถ่ายลงในหลอดเซนตริฟิวส์ใหม่, แล้วเติม isopropanol ที่แช่เย็นประมาณ 2/3 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้, ทำการแกว่งและเขย่าเบา ๆ เพื่อทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอนและรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน.

6. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงตัวอย่าง (centrifuge machine) ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที, เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างทำความสะอาดตะกอน ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์, โดยเติมเอทานอล 1 มิลลิลิตร พลิกหลอดไปมาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที 2 ครั้ง, ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายก้อนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, เติม RNase A (10 μg/ml) 20 ไมโครลิตร, บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ชั่วโมง.

7. ตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งโดยเติมสารละลาย 3 M sodium acetate (pH 5.2) จำนวน 100 ไมโครลิตร และ 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลที่แช่เย็น 2 มิลลิลิตร.

8. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงตัวอย่าง (centrifuge machine) ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที, ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง, ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนใน TE buffer ปริมาตร 100-200 ไมโครลิตร, ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง เก็บดีเอ็นเอที่ละลายแล้วไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส.

2.2.2 การตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการนำสารสกัดดีเอ็นเอมาทำอิเล็กโทรโฟรีซีส บน 0.8 เปอร์เซ็นต์ เจลอะกาโรสใน 0.5xTBE buffer, โดยชั่งอะกาโรส 1.2 กรัม เติมสารละลาย 0.5xTBE ที่เจือจางมาจาก 5xTBE (Tris-base 54 กรัม, Boric acid 27.5 กรัม, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร) 100 มิลลิลิตร. หลอมละลายอะกาโรสด้วยเตาไมโครเวฟจนอะกาโรสละลายหมด, ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิของอะกาโรสลดลงเหลือประมาณ 65 องศาเซลเซียส จึงเทลงในถาด แล้วใส่หวี (comb) เพื่อให้เกิดช่องสำหรับหยอดดีเอ็นเอ, ตั้งทิ้งไว้อีกประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัว. หลังจากนั้นหยอดดีเอ็นเอและดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ*Eco*RI / *Hin*d III) ลงในแต่ละช่องของเจลแล้วนำไปผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 80 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 45 นาที, โดยมี 0.5 xTBE เป็นอิเล็กโทรโฟรีซีสบัฟเฟอร์. หลังจากนั้นย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร ที่ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร, เขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 15 นาที, จึงนำมาตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง VDS (Video Documentation System for Gel Electrophoresis) ถ่ายภาพและบันทึกภาพเก็บไว้.

2.2.3 การวิเคราะห์จำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ปิยะโชคณากุล (2542)

1. การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, นำดีเอ็นเอประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI 12 Unit และ *Tru*9I (Isoschizomer ของ *Mse*I) 10 Unit, โดยใช้ดีเอ็นเอ 100 ng/µl, 10x Buffer ชนิด A ของ Boehringer Mainheim (33 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM KCl, and 0.5 mM DTT) 4 ไมโครลิตร, ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 40 ไมโครลิตร, บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง.

2. นำดีเอ็นเอจากข้อ 1. มาต่อด้วย DNA adapter สำหรับเอ็นไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด คือ *Eco*RI-adapter และ *Mse*I-adapter, โดยการเติมสารละลาย 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย *Eco*RI-adapter 5 พิโกโมลต่อไมโครลิตร, และ *Mse*I-adapter 50 พิโคโมลต่อไมโครลิตร, *T4 DNA ligase* 1.5 Unit, 10x Ligase buffer, ปรับปริมาตรให้ได้ 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วเติมลงไปในดีเอ็นเอจากข้อ 1. จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.

ตารางที่ 3. ลำดับเบสของ DNA adapter สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Adapter	Sequence
*Eco*RI adapter -01	5′ CTC GTA GAC TGC GTA CC 3′
*Eco*RI adapter -02	5′ AAT TGG TAC GCA GTC TAC 3′
*Mse*I adapter -01	5′ GAC GAT GAG TCC TGA G 3′
*Mse*I adapter -02	5′ TAC TCA GGA CTC AT 3′

3. การทำ Preselective amplification (PCR I), นำดีเอ็นเอจากข้อ 2 ปริมาณ 5 ไมโครลิตร นำมาเพิ่มปริมาณด้วยการทำ PCR, โดยคัดเลือกรอบแรกใช้ชิ้นดีเอ็นเอเริ่มต้นหรือ ไพรเมอร์ (Primer) ที่สามารถเข้าคู่กับ adapter ที่ต่อไว้ในข้อ 2. และเพิ่มเบสที่ใช้ในการคัดเลือกเข้าด้าน 3'-end อีก 1 เบส โดยใช้ไพรเมอร์ด้าน *Eco*RI และ *Mse*I ชนิดละ 5 พิโกโมลต่อไมโครลิตร ในสารละลายที่ประกอบด้วย 1.5 mM MgCl2, 0.2 mM dNTPs, 1 Unit Taq polymerase, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0). ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร, ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยในแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน.

ขั้นที่ 1 Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที.
ขั้นที่ 2 Annealing 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที.
ขั้นที่ 3 Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที.

เป็นจำนวน 20 รอบ แบ่งสารละลายมาทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทร-โฟรีซีส บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์, ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส, เมื่อตรวจสอบผลโดยการย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์จะพบแถบรอยยาว (smear) ในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส.

ตารางที่ 4. ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทำ Preselective amplification (PCR I)

PCR I	Sequence
*Eco*RI adapter -A	5′GAC TGC GTA CCA ATT CA 3′
*Eco*RI adapter -T	5′GAC TGC GTA CCA ATT CT 3′
*Mse*I adapter -C	5′GAT GAG TCC TGA GTA AC 3′

4. การทำ selective amplification (PCR II) โดยนำดีเอ็นเอ จากข้อ 3. ปริมาณ 5 ไมโครลิตร, นำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการคัดเลือกชิ้นที่จะเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่มีเบสที่ต่อกับไพรเมอร์ที่สามารถเกาะกับ adapter 3 เบส โดยใช้ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย *Eco*RI และ *Mse*I ชนิดละ 5 พิโกโมลต่อไมโครลิตร, ในสารละลายที่ประกอบด้วย 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 1 Unit Taq polymerase, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้โปรแกรม.

ขั้นที่ 1 Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที.
ขั้นที่ 2 Annealing 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที.
ขั้นที่ 3 Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที.

เป็นจำนวน 1 รอบ แล้วลดอุณหภูมิในขั้น Annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย

ขั้นที่ 4 Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที.
ขั้นที่ 5 Annealing 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที.
ขั้นที่ 6 Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที.

อีกเป็นจำนวน 23 รอบ, เมื่อจบปฏิกิริยา PCR แล้ว นำมาเติม AFLP loading buffer (98 เปอร์เซ็นต์ formamide, 10 mM EDTA, 0.1 เปอร์เซ็นต์ Bromophenal blue, 0.1 เปอร์เซ็นต์ Xylene cyanol) 20 ไมโครลิตร, นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที พร้อมทำอิเล็กโทรโฟรีซีส.

ตารางที่ 5. ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทำ Selective amplification (PCR II)

PCRII	Sequence
*Eco*RI adapter –AAG	5′GAC TGC GTA CCA ATT CAA G 3′
*Eco*RI adapter -ACC	5′GAC TGC GTA CCA ATT CAC C 3′
*Eco*RI adapter -ACT	5′GAC TGC GTA CCA ATT CAC T 3′
*Eco*RI adapter -AGG	5′GAC TGC GTA CCA ATT CAG G 3′
*Mse*I adapter -CAC	5′GAT GAG TCC TGA GTA ACA C 3′
*Mse*I adapter -CAG	5′GAT GAG TCC TGA GTA ACA G 3′
*Mse*I adapter -CTA	5′GAT GAG TCC TGA GTA ACT A 3′
*Mse*I adapter -CTT	5′GAT GAG TCC TGA GTA ACT T 3′

ตารางที่ 6. คู่ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทำ Selective amplification (PCR II) ของไพล

ลำดับที่	Adapter	PCR I	PCR II
1	*Eco*RI + *Mse*I	*Eco*RI - A + *Mse*I – C	*Eco*RI – AAG+ *Mse*I – CTA (B4)
2	*Eco*RI + *Mse*I	*Eco*RI - A + *Mse*I – C	*Eco*RI – ACC + *Mse*I – CTT (D6)
3	*Eco*RI + *Mse*I	*Eco*RI - A + *Mse*I – C	*Eco*RI – ACT + *Mse*I – CAG (F3)
4	*EcoRI* + *MseI*	*EcoRI - A* + *MseI - C*	*EcoRI* - AGG + *MseI* – CAC (H2)

5. การเตรียมกระจกสำหรับการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส, โดยนำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้สะอาดทั้งสองแผ่น, เช็ดกระจกแผ่นหนึ่งด้วย Bind silane (Bind silane 1 ไมโครลิตร, Glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับแผ่นกระจก, เช็ดกระจกอีกแผ่นด้วยน้ำยาเคลือบกระจก เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก, ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที นำกระจกทั้งสองแผ่นประกอบเข้าชุด, โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง, หันด้านที่ทา Bind silane และน้ำยาเคลือบกระจกเข้าหากัน ใช้กระดาษกาวติดรอบกระจกทั้ง 3 ด้าน เพื่อกันไม่ให้เจลรั่ว, เว้นด้านบนไว้สำหรับใส่อะคริลาไมด์เจล และเสียบหวี.

6. การเตรียมอะคริลาไมด์เจล 8 เปอร์เซ็นต์ ที่มีประกอบด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ Acrylamide-methyl bisacrylamide (19:1), 7.5 M Urea และเติม 300 ไมโครลิตร ของ 10 เปอร์เซ็นต์ Ammonium persulfate และ 30 ไมโครลิตร TEMED ต่อสารละลาย 60 มิลลิลิตร.

7. นำอะคริลาไมด์เจลใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกทั้ง 2 แผ่น, ใส่หวีด้านเรียบ, ใช้คลิปหนีบด้านบน, ทิ้งไว้ให้เจลแข็งประมาณ 2-3 ชั่วโมง.

8. นำแผ่นกระจกประกอบเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบตั้ง, เติม 1xTBE (100 mM Tris, 100 mM Boric acid, 2 mM EDTA) เพื่อเป็นบัฟเฟอร์, ต่อสายไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง power supply, ทำ pre-run 30 นาที โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 35 วัตต์ ในชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบตั้ง : Hoefer®SQ3 Sequence Amersham biotech pharmacia รุ่น EPS 3500, และทำ pre-run 30 นาที โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ ที่ 1,000 โวลต์ ในชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบตั้ง : BIO-RAD รุ่น Power PAC 3000.

9. นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ selective amplification (PCR II) 10 ไมโครลิตร ผสมกับ AFLP loading (98 เปอร์เซ็นต์ Formamide, 10 mM EDTA, 0.1 เปอร์เซ็นต์ Bromophenal blue, 0.1 เปอร์เซ็นต์ Xylene cyanol) 5 ไมโครลิตร, บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที, แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที.

10. หยอดดีเอ็นเอจากข้อ 9. ลงในช่องบนแผ่นอะคริลาไมด์เจล, เพื่อใช้แยกขนาดของดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้าคงที่ 35 วัตต์ ในชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบตั้ง : Hoefer®SQ3 Sequence Amersham biotech pharmacia รุ่น EPS 3500 และความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ ที่ 1,000 โวลต์ ในชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบตั้ง : BIO-RAD รุ่น Power PAC 3000 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, จนกระทั่ง Xylene cyanol (แถบสีด้านบน) ซึ่งเป็นสีที่ใช้ติดตามการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจลซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำเจลไปย้อมสี.

2.2.4 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ในเทรต

1. นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาล้างในน้ำกลั่น เขย่านาน 15 นาที.

2. แช่แผ่นเจลในสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที, เขย่าตลอดเวลา.

3. ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงนำแผ่นเจลใส่ในสารละลายกรดแอซิตริกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที, โดยเขย่าตลอดเวลา.

4. ล้างด้วยน้ำกลั่น10 นาที 2 ครั้ง และ 20 นาที 1 ครั้ง.

5. นำแผ่นเจลมาย้อมในสารละลายซิลเวอร์ไนเทรตที่เตรียมใหม่, โดยชั่งซิลเวอร์ไนเทรต 1.5 กรัม, เติมน้ำ 998.5 มิลลิลิตร, และ 37 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde 1.5 มิลลิลิตร, คนให้ละลายแล้วนำไปย้อมเจล, เขย่าอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 30 นาที.

6. นำแผ่นเจลออกมาจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว.

7. ย้ายแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย Developer (3 เปอร์เซ็นต์ sodium carbonate, 0.02 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde, 0.02 เปอร์เซ็นต์ sodium thiosulfate) ที่เตรียมใหม่ ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส, เขย่าอย่างสม่ำเสมอ 5-25 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน.

8. นำแผ่นเจลมาจุ่มในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว.

9. ย้ายแผ่นเจลมาใส่ในกลีเซอรอล ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 30 นาที.

2.2.5 การวิเคราะห์ผล

ใช้โปรแกรม NTSYS pc 2.11x (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) โดยมีขั้นตอนดังนี้ :

1. ทำการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำ AFLP ในพืชสมุนไพรและพืชสายพันธุ์เปรียบเทียบสายพันธุ์ต่างๆ. บันทึกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์แต่ละคู่ และเก็บข้อมูลที่ได้ไว้ในฐานข้อมูลของแต่ละไพรเมอร์.

2. วิเคราะห์ความสัมพันธ์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ต่าง ๆ ครั้งละ 2 พันธุ์ ออกมาในรูปของ Similarity coefficient ระหว่างรูปแบบดีเอ็นเอทั้งสอง ดังนี้ :

2.1 Jaccard coefficient = a/(n-d). (Jaccard 1908)

2.2 SM (Simple Matching) coefficient = a+d/a+b+c+d (Sneath and Sokal 1973)

3. สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree โดยวิธี UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithemetic Mean).

2.2.6 การวัดสี

1. เก็บเหง้าตัวอย่างไพลที่รวบรวมในแปลงรวบรวมหลังจากต้นไพลส่วนเหนือดินยุบตัวแล้ว.

2. คัดแยกส่วนเหง้าไพลในแต่ละตัวอย่างเป็นสองส่วนคือ ส่วนที่เกิดขึ้นข้ามปีและส่วนที่เกิดใหม่ในฤดูปลูกใหม่.

3. ใช้เครื่องวัดสี (chroma meter) วัดค่า L(ค่าความสว่าง), a และ b (ค่าสัมประสิทธิ์สีในปริภูมิสี L*a*b* Color space) ของส่วนเนื้อภายในเหง้าไพลทั้งที่เกิดข้ามปีและไม่ข้ามปี.

4. คำนวณหาค่า metric hue angle (h)และค่า metric chroma (C).

$h = \tan^{-1}[b/a]$

$C = SQRT\{(a)^2+(b)^2\}$

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างไพลเหลืองเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *E*-AAG/ *M* – CTA (B4)

เมื่อนำไพลเหลืองเปรียบเทียบกันทั้งหมดจำนวน 98 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดกาฬสินธุ์ (P26), ไพลเหลืองจังหวัดขอนแก่น (P185), ไพลเหลืองจังหวัดเชียงราย (P157), ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ (P58, P62, P65, P66, P67, P68, P69, P148, P151, P168 และ P169), ไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี (P36, P40 และ P41),ไพลเหลืองจังหวัดตราด (P37,P38, P39, P47, P48 และ P57), ไพลเหลืองจังหวัดตาก (P01, P02, P04, P116, P117, P120, P123, P129, P130 และ P163), ไพลเหลืองจังหวัดนครพนม (P22), ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา (P26, P29, P32, P49, P50, P51, P70, P71, P72, P73, P76, P78, P81, P86, P87, P88, P89, P92, P93 และ P95), ไพลเหลืองจังหวัดนครสวรรค์ (P115), ไพลเหลืองจังหวัดบุรีรัมย์ (P96), ไพลเหลืองจังหวัดปราจีนบุรี (P83), ไพลเหลืองจังหวัดพิษณุโลก (P178), ไพลเหลืองจังหวัดเพชรบูรณ์ (P164, P165 และ P166), ไพลเหลืองจังหวัดแพร่ (P162), ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร (P24, P108 และ P109), ไพลเหลืองจังหวัดแม่ฮ่องสอน (P135, P140, P141 และ P144), ไพลเหลืองจังหวัดร้อยเอ็ด (P106), ไพลเหลืองจังหวัดราชบุรี (P111), ไพลเหลืองจังหวัดลพบุรี (P30), ไพลเหลืองจังหวัดลำปาง (P159, P160 และ P161), ไพลเหลืองจังหวัดสกลนคร (P27, P170 และ P188), ไพลเหลืองจังหวัดสระแก้ว (P42, P43, P98, P99 และ P172), ไพลเหลืองจังหวัดสระบุรี (P31, P52, P55 และ P56),ไพลเหลืองจังหวัดสุโขทัย (P177), ไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย (P12, P13, P14, P15, P17, P18, P20, P167, P171 และ P186) และไพลเหลืองจังหวัดอุบลราชธานี (P107). ตัดโดยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Eco*RI และ *Tru*9I และคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ *E*-AAG/ *M* – CTA (B4), ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจน เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 111 แถบดีเอ็นเอ หรือ 111 AFLP markers.

เมื่อวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์ค่า Genetics similarity และใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Simple Matching, มีค่า cophenetic correlation (r) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าการจัดกลุ่มนั้นยอมรับได้หรือไม่พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.884.

จากการเปรียบเทียบค่า similarity index เมื่อใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Simple Matching พบว่าตัวอย่างไพลที่มีค่าความสัมพันธ์กันมากที่สุด หรือมีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 1.00, สามารถ

จัดเป็นกลุ่มๆ ย่อยที่มีลักษณะทางลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันคือ ไพลเหลืองจังหวัดตราด (P37) และไพลเหลืองจังหวัดสระบุรี (P55), ไพลเหลืองจังหวัดตราด (P38), ไพลเหลืองจังหวัดตราด (P47), ไพลเหลืองจังหวัดตราด (P48) และไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา (P51), ไพลเหลืองจังหวัดตราด (P39), ไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี (P40) และไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี (P41), ไพลเหลืองจังหวัดเพชรบูรณ์ (P164) และไพลเหลืองจังหวัดเพชรบูรณ์ (P166), ไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย (P171) และไพลเหลืองจังหวัดสระแก้ว (P177) และตัวอย่างที่มีค่าความสัมพันธ์กันน้อยที่สุดคือ ไพลเหลืองจังหวัดตราด (P47) และไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ (P66), ไพลเหลืองจังหวัดตราด (P48) และไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ (P66), ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา (P51) และไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ (P66) มีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.27.

จากแถบดีเอ็นเอที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของไพลทั้งหมด 98 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11p (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) โดยคำนวณค่าความเหมือนของไพลทีละคู่, แล้วนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree (ดังแสดงในรูปที่ 2). โดยวิธี UPGMA (Unweighted Method with Arithmetic Mean) สามารถแบ่งกลุ่มตามสัมพันธ์ได้ 5 กลุ่ม ดังนี้ :

กลุ่มที่ 1 จำนวน 17 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดกาฬสินธุ์ หมายเลข P26, ไพลเหลืองจังหวัดตาก หมายเลข P01, P02 และ P04, ไพลเหลืองจังหวัดนครพนม หมายเลข P22, ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา หมายเลข P29 และ P32, ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร หมายเลข P24, ไพลเหลืองจังหวัดลพบุรี หมายเลข P30, ไพลเหลืองจังหวัดสกลนคร หมายเลข P27, ไพลเหลืองจังหวัดสระบุรี หมายเลข P31,ไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย หมายเลข P12, P13, P14, P15, P17 และ P20.

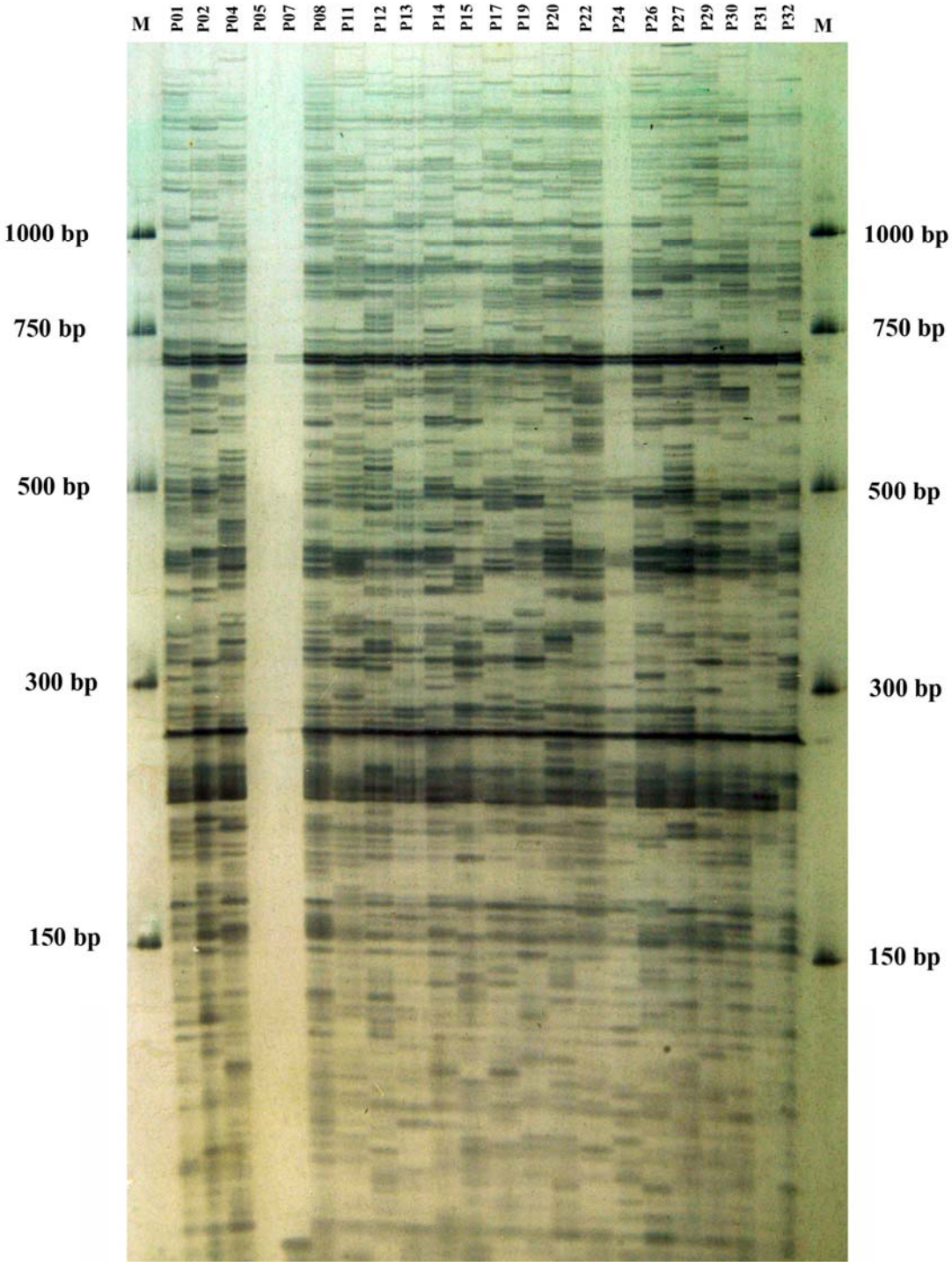
กลุ่มที่ 2 จำนวน 57 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดขอนแก่น หมายเลข P185, ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ หมายเลขP58, P67 และP169, ไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี หมายเลข P40 และ P41, ไพลเหลืองจังหวัดตราด หมายเลข P37, P38, P39, P47, P48 และ P57, ไพลเหลืองจังหวัดตาก หมายเลข P129, ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา หมายเลข P49, P50, P51, P70, P71, P72, P73, P76, P78, P81, P83, P86, P87, P88, P89, P92, P93 และ P95, ไพลเหลืองจังหวัดบุรีรัมย์ หมายเลข P96, ไพลเหลืองจังหวัดปราจีนบุรี หมายเลข P83, ไพลเหลืองจังหวัดพิษณุโลก หมายเลข P178, ไพลเหลืองจังหวัดเพชรบูรณ์ หมายเลข P164, P165 และ P166, ไพลเหลืองจังหวัดแพร่

หมายเลข P162, ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร หมายเลข P108, ไพลเหลืองจังหวัดร้อยเอ็ด หมายเลข P106, ไพลเหลืองจังหวัดลำปาง หมายเลข P161, ไพลเหลืองจังหวัดสกลนคร หมายเลข P170 และ P188, ไพลเหลืองจังหวัดสระแก้ว หมายเลข P42, P43, P98, P99 และ P172, ไพลเหลืองจังหวัดสระบุรี หมายเลข P52, P55 และ P56, ไพลเหลืองจังหวัดสุโขทัย หมายเลข P177, ไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย หมายเลข P18, P167, P171 และ P186, ไพลเหลืองจังหวัดอุบลราชธานี หมายเลข P107.

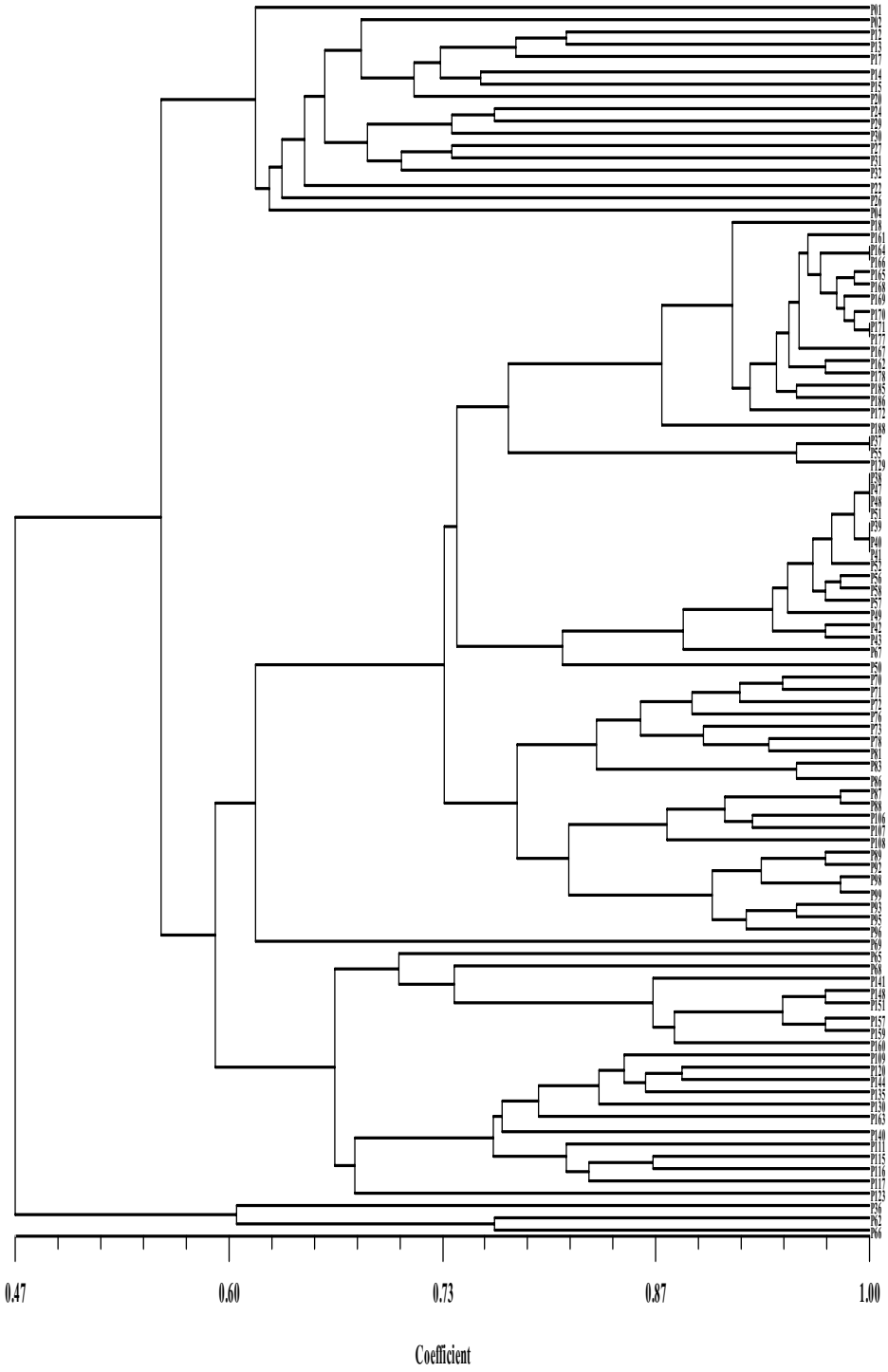
กลุ่มที่ 3 จำนวน 1 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข P69.

กลุ่มที่ 4 จำนวน 20 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดเชียงราย หมายเลข P157, ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข P65, P68, P148, P151, ไพลเหลืองจังหวัดตาก หมายเลข P116, P117, P120, P123, P130 และ P163, ไพลเหลืองจังหวัดนครสวรรค์ หมายเลข P115, ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร หมายเลข P109, ไพลเหลืองจังหวัดแม่ฮ่องสอน หมายเลข P135, P140, P141 และ P144, ไพลเหลืองจังหวัดราชบุรี หมายเลข P111, ไพลเหลืองจังหวัดลำปาง หมายเลข P159 และ P160.

กลุ่มที่ 5 จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข P62 และ P66 และไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี หมายเลข P36.



รูปที่ 1. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพลที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ *E*-AAG/ *M* – CTA (B4) [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน].



รูปที่ 2. Phylogenetic tree ของไพลเหลือง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11 โดยอาศัยข้อมูลเทคนิค AFLP จำนวน 111 AFLP markers จากคู่ไพรเมอร์ *E*-AAG/ *M* – CTA (B4).

ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างไพลเหลืองเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ E-ACC/M-CAG (D6)

เมื่อนำไพลเหลืองเปรียบเทียบกันทั้งหมดจำนวน 100 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดกาฬสินธุ์ (P26), ไพลเหลืองจังหวัดขอนแก่น (P185), ไพลเหลืองจังหวัดเชียงราย (P156 และ P157), ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ (P58, P62, P65, P66, P67, P68, P69, P148, P151, P153, P168 และ P169), ไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี (P36, P40 และ P41),ไพลเหลืองจังหวัดตราด (P37,P38, P39, P47, P48 และ P57), ไพลเหลืองจังหวัดตาก (P01, P02, P04, P116, P117, P120, P123, P129, P130 และ P163), ไพลเหลืองจังหวัดนครพนม (P22), ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา (P29, P49, P50, P51, P70, P71, P72, P73, P76, P78, P81, P86, P87, P88, P89, P92, P93 และ P95), ไพลเหลืองจังหวัดนครสวรรค์ (P115), ไพลเหลืองจังหวัดบุรีรัมย์ (P96), ไพลเหลืองจังหวัดปราจีนบุรี (P83), ไพลเหลืองจังหวัดพิษณุโลก (P178), ไพลเหลืองจังหวัดเพชรบูรณ์ (P164, P165 และ P166), ไพลเหลืองจังหวัดแพร่ (P162), ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร (P24, P108 และ P109), ไพลเหลืองจังหวัดแม่ฮ่องสอน (P135, P140, P141 และ P144), ไพลเหลืองจังหวัดร้อยเอ็ด (P106), ไพลเหลืองจังหวัดราชบุรี (P111, P112 และ P113), ไพลเหลืองจังหวัดลพบุรี (P30), ไพลเหลืองจังหวัดลำปาง (P159, P160 และ P161), ไพลเหลืองจังหวัดสกลนคร (P27, P170 และ P188), ไพลเหลืองจังหวัดสระแก้ว (P42, P43, P98, P99 และ P172), ไพลเหลืองจังหวัดสระบุรี (P52, P55 และ P56),ไพลเหลืองจังหวัดสุโขทัย (P177), ไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย (P12, P13, P14, P15, P17, P18, P20, P167, P171 และ P186) และ ไพลเหลืองจังหวัดอุบลราชธานี (P107), ตัดโดยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Eco*RI และ *Tru*9I และคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ E-ACC/M-CAG (D6) ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจน เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 117 แถบดีเอ็นเอ หรือ 117 AFLP markers.

เมื่อวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์ค่า Genetics similarity โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Simple Matching มีค่า cophenetic correlation (r), ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าการจัดกลุ่มนั้นยอมรับได้หรือไม่พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.875.

เมื่อเปรียบเทียบค่า similarity index โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Simple Matching, พบว่าตัวอย่างไพลที่มีค่าความสัมพันธ์กันมากที่สุด 2 กลุ่มย่อย คือ ไพลเหลืองจังหวัดเพชรบูรณ์ หมายเลขP 164, P165 และ P166 และกลุ่มย่อยไพลเหลืองจังหวัดตราด หมายเลข P47 และ P48, ซึ่งมีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 1.00. สำหรับตัวอย่างที่มีค่าความสัมพันธ์กันน้อยที่สุดคือ ไพลเหลือง

จังหวัดเชียงใหม่ (P66) ที่แตกต่างจากไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี (P41) ไพลเหลืองจังหวัดตราด (P41 และP48) มากที่สุด และมีค่าความสัมพันธ์เพียง 0.333.

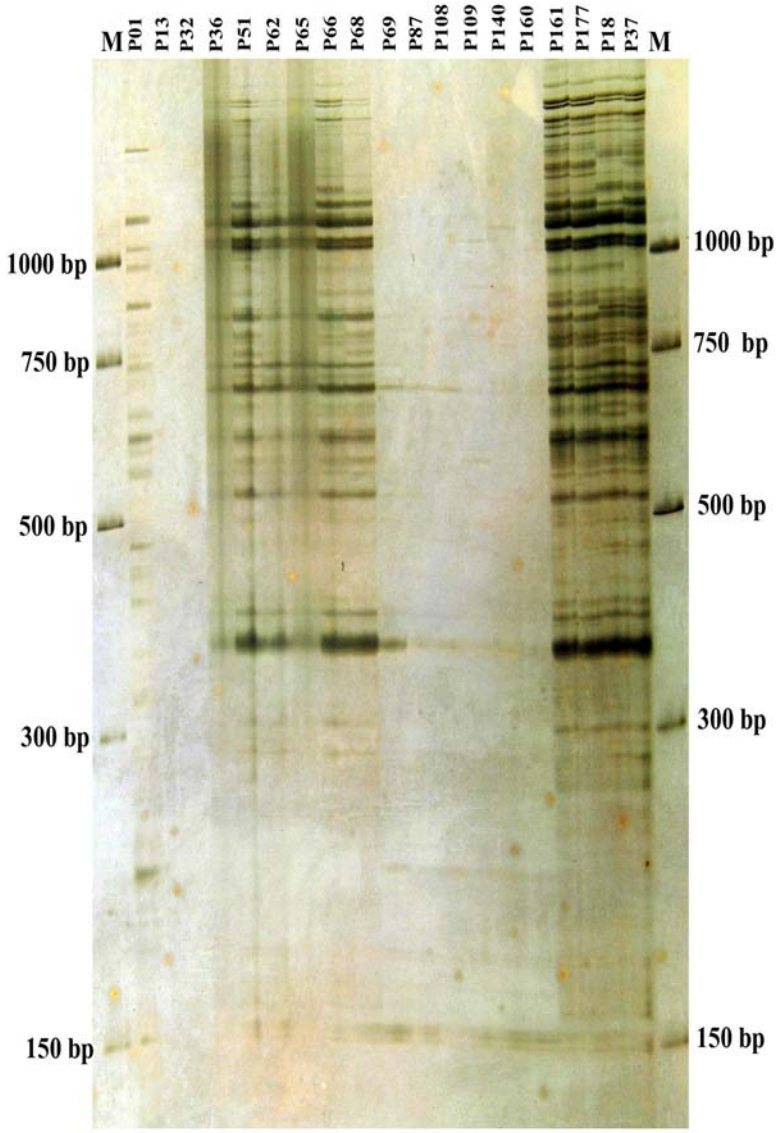
จากแถบดีเอ็นเอที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของไพลทั้งหมด 100 ตัวอย่าง ด้วย โปรแกรม NTSYS pc 2.11p (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), โดยคำนวณค่าความเหมือนของไพลทีละคู่ แล้วนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree (ดังแสดงในรูปที่4.) โดยวิธี UPGMA (Unweighted Method with Arithmetic Mean) สามารถแบ่งกลุ่มตามสัมพันธ์ได้ 4 กลุ่ม ดังนี้.

กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 14 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดกาฬสินธุ์ หมายเลข P26, ไพลเหลืองจังหวัดตาก หมายเลข P01, P02 และ P04, ไพลเหลืองจังหวัดนครพนม หมายเลข P22, ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา หมายเลข P29, ไพลเหลืองจังหวัดลพบุรี หมายเลข P30, ไพลเหลืองจังหวัดสกลนครหมายเลข P27 และไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย หมายเลข P12, P13, P14, P15, P17, และ P20**.**

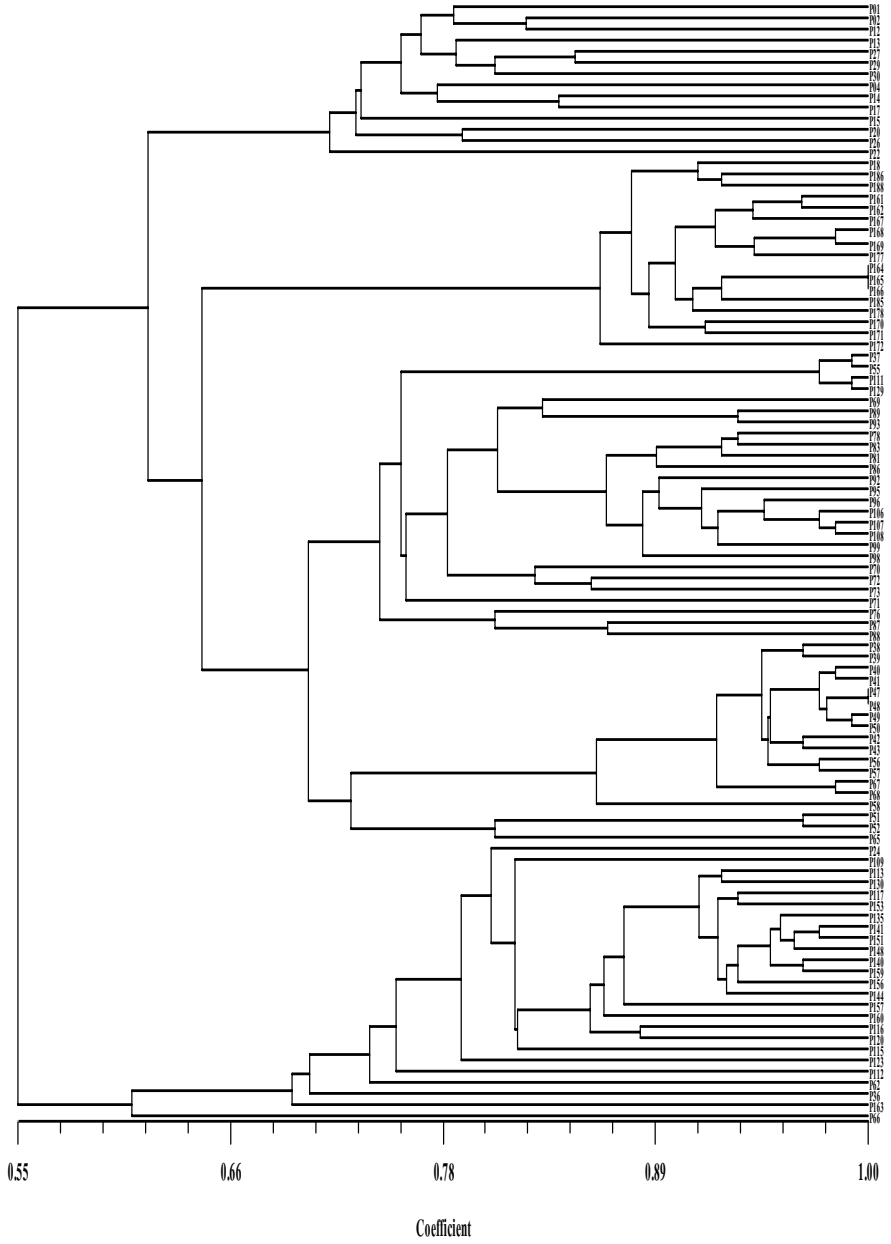
กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 17 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดขอนแก่น หมายเลข P185, ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข P168 และ P169, ไพลเหลืองจังหวัดพิษณุโลก หมายเลข P178, ไพลเหลืองจังหวัดเพชรบูรณ์ หมายเลข P164, P165 และ P166, ไพลเหลืองจังหวัดลำปาง หมายเลข P161 และ P162, ไพลเหลืองจังหวัดสกลนครหมายเลข P170 และ P188, ไพลเหลืองจังหวัดสระแก้ว หมายเลข P172, ไพลเหลืองจังหวัดสุโขทัย หมายเลข P177, ไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย หมายเลข P18, P167, P171 และ P186.

กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 44 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข P58, P65, P67, P68 และ P69, ไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี หมายเลข P40 และ P41,ไพลเหลืองจังหวัดตราด หมายเลข P37,P38, P39, P47 และ P48, ไพลเหลืองจังหวัดตาก หมายเลข P129, ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา หมายเลข P49, P50, P51, P70, P71, P72, P73, P76, P78, P81, P86, P87, P88, P89, P92, P93 และ P95, ไพลเหลืองจังหวัดบุรีรัมย์ หมายเลข P96, ไพลเหลืองจังหวัดปราจีนบุรี หมายเลข P83, ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร หมายเลข P108, ไพลเหลืองจังหวัดร้อยเอ็ด หมายเลข P106, ไพลเหลืองจังหวัดราชบุรี หมายเลข P111, ไพลเหลืองจังหวัดสระแก้ว หมายเลข P42, P43, P98 และ P99, ไพลเหลืองจังหวัดสระบุรี หมายเลข P52, P55, P57 และ P56, ไพลเหลืองจังหวัดอุบลราชธานี หมายเลข P107.

กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 25 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดเชียงราย หมายเลข P156 และ P157, ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข P62, P66, P148, P151 และ P153, ไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี หมายเลข P36, ไพลเหลืองจังหวัดตาก หมายเลข P116, P117, P120, P123, P130 และ P163,ไพลเหลืองจังหวัดนครสวรรค์ หมายเลข P115,ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร หมายเลข P24 และ P109, ไพลเหลืองจังหวัดแม่ฮ่องสอน หมายเลข P135, P140, P141 และ P144, ไพลเหลืองจังหวัดราชบุรี หมายเลข P112 และ P113, ไพลเหลืองจังหวัดลำปาง หมายเลข P159 และ P160.



รูปที่ 3. ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพลเหลืองที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ *E*-ACC/*M*-CAG (D6) [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน].



รูปที่ 4. Phylogenetic tree ของไพลเหลือง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11 โดยอาศัยข้อมูลเทคนิค AFLP จำนวน 117 AFLP markers จากคู่ไพรเมอร์ *E*-ACC/*M*-CAG (D6).

ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างไพลเหลืองเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *E*– ACT/*M*– CAG (F3)

เมื่อนำไพลเหลืองเปรียบเทียบกันทั้งหมดจำนวน 98 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดกาฬสินธุ์ (P26), ไพลเหลืองจังหวัดขอนแก่น (P185), ไพลเหลืองจังหวัดเชียงราย (P156 และ P157), ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ (P58, P62, P65, P66, P67, P68, P69, P148, P151, P153, P168 และ P169), ไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี (P36, P40 และ P41),ไพลเหลืองจังหวัดตราด (P37, P38, P39, P47, P48 และ P57), ไพลเหลืองจังหวัดตาก (P01, P02, P04, P116, P117, P120, P123, P129, P130 และ P163), ไพลเหลืองจังหวัดนครพนม (P22), ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา (P29, P32, P49, P50, P51, P70, P71, P72, P73, P76, P78, P86, P87, P93 และ P95), ไพลเหลืองจังหวัดนครสวรรค์ (P115), ไพลเหลืองจังหวัดบุรีรัมย์ (P96), ไพลเหลืองจังหวัดปราจีนบุรี (P83), ไพลเหลืองจังหวัดพิษณุโลก (P178), ไพลเหลืองจังหวัดพะเยา (P158),ไพลเหลืองจังหวัดเพชรบูรณ์ (P164, P165 และ P166), ไพลเหลืองจังหวัดแพร่ (P162), ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร (P24, P108 และ P109), ไพลเหลืองจังหวัดแม่ฮ่องสอน (P135, P140, P141 และ P144), ไพลเหลืองจังหวัดร้อยเอ็ด (P106), ไพลเหลืองจังหวัดราชบุรี (P111 และ P112), ไพลเหลืองจังหวัดลพบุรี (P30), ไพลเหลืองจังหวัดลำปาง (P159, P160 และ P161), ไพลเหลืองจังหวัดสกลนคร (P27, P170 และ P188), ไพลเหลืองจังหวัดสระแก้ว (P42, P43, P98, P99 และ P172), ไพลเหลืองจังหวัดสระบุรี (P31, P52, P55 และ P56),ไพลเหลืองจังหวัดสุโขทัย (P177), ไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย (P12, P13, P14, P15, P17, P18, P20, P167, P171 และ P186) และไพลเหลืองจังหวัดอุบลราชธานี (P107). ตัดโดยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Eco*RI และ *Tru*9I และคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ *E*– ACT/*M*– CAG (F3) ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจน เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 139 แถบดีเอ็นเอ หรือ 139 AFLP markers.

เมื่อวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์ค่า Genetics similarity โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Simple Matching มีค่า cophenetic correlation (r), ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าการจัดกลุ่มนั้นยอมรับได้หรือไม่พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.860.

จากการเปรียบเทียบค่า similarity index เมื่อใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Simple Matching พบว่าตัวอย่างไพลที่มีค่าความสัมพันธ์กันมากที่สุด คือ ไพลเหลืองจังหวัดตราด หมายเลข P47 และP48, มีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 1.00. ตัวอย่างที่มีค่าความสัมพันธ์กันน้อยที่สุดคือ ไพลเหลืองจังหวัดตาก (P01) และไพลเหลืองจังหวัดสระบุรี (P55). คู่ที่ 2 คือ ไพลเหลืองจังหวัดตาก (P01) และ

ไพลเหลืองจังหวัดพะเยา (P158) และอีกคู่คือไพลเหลืองจังหวัดสกลนคร (P27) และไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย (P186) มีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.51.

จากแถบดีเอ็นเอที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของไพลทั้งหมด 98 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11p (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), โดยคำนวณค่าความเหมือนของไพลทีละคู่ แล้วนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree (ดังแสดงในรูปที่ 6.), โดยวิธี UPGMA (Unweighted Method with Arithmetic Mean) สามารถแบ่งกลุ่มตามสัมพันธ์ได้ 5 กลุ่ม ดังนี้ :

กลุ่มที่ 1 จำนวน 16 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดกาฬสินธุ์ หมายเลข P26, ไพลเหลืองจังหวัดตาก หมายเลข 01, P02 และ P04, ไพลเหลืองจังหวัดนครพนม หมายเลข P22, ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา หมายเลข P29 และ P32, ไพลเหลืองจังหวัดลพบุรี หมายเลข P30,ไพลเหลืองจังหวัดสกลนคร หมายเลข P27, ไพลเหลืองจังหวัดสระบุรี หมายเลข P31,ไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย หมายเลข P12, P13, P14, P15, P17 และ P20.

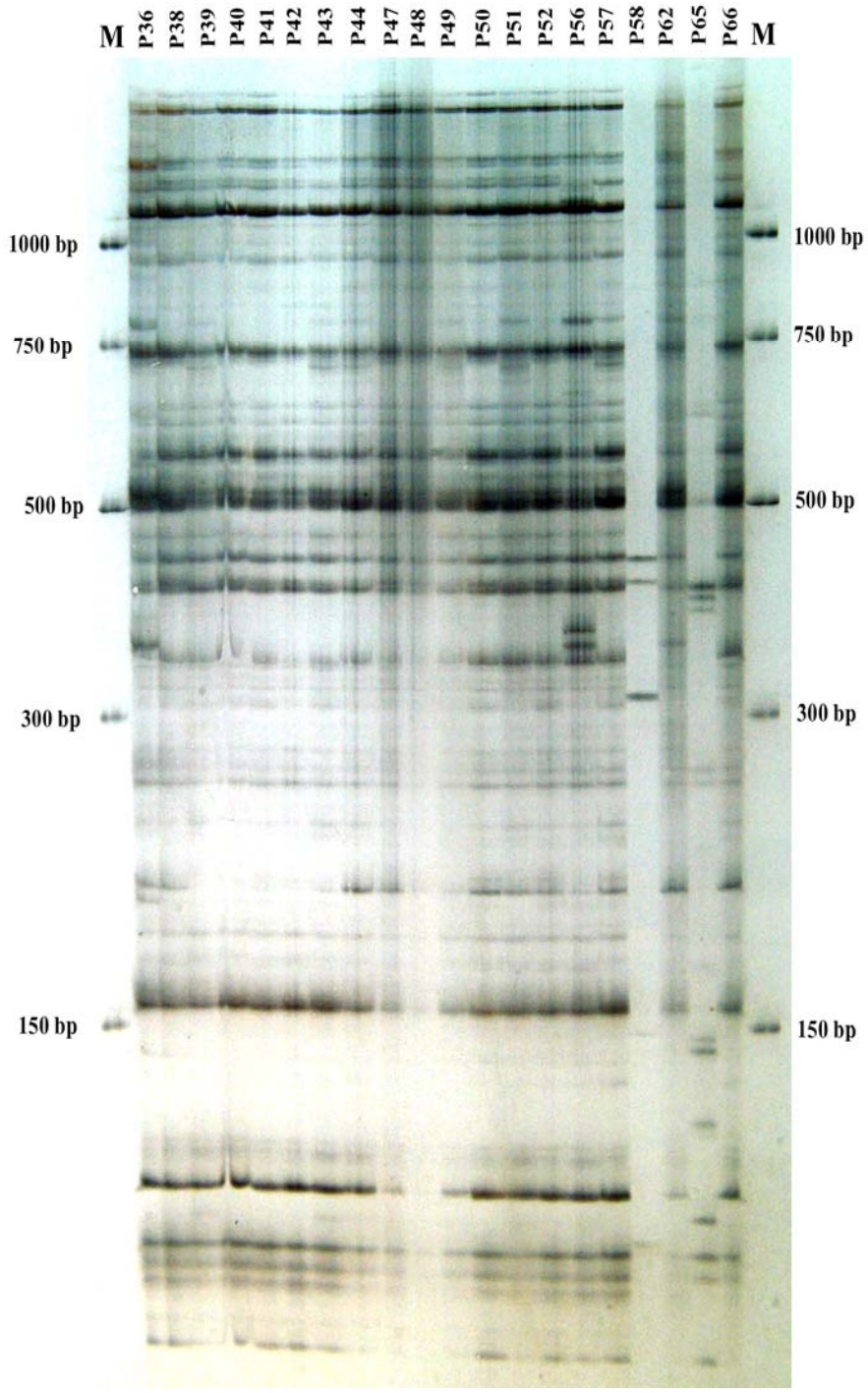
กลุ่มที่ 2 จำนวน 57 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดขอนแก่น หมายเลข P185, ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข P62, P66, P67, P68, P69, P168 และ P169, ไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี หมายเลข P36, P40 และ P41,ไพลเหลืองจังหวัดตราด หมายเลข P37, P38, P39, P47, P48 และ P57, ไพลเหลืองจังหวัดตาก หมายเลข P129, ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา หมายเลข P49, P50, P51, P70, P71, P72, P73, P76, P78, P86, P87, P93 และ P95, ไพลเหลืองจังหวัดปราจีนบุรี หมายเลข P83, ไพลเหลืองจังหวัดพิษณุโลก หมายเลข P178, ไพลเหลืองจังหวัดเพชรบูรณ์ หมายเลข P164, P165 และ P166, ไพลเหลืองจังหวัดแพร่ หมายเลข P162, ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร หมายเลข P24 และ P108, ไพลเหลืองจังหวัดร้อยเอ็ด หมายเลข P106, ไพลเหลืองจังหวัดลำปาง หมายเลข P161, ไพลเหลืองจังหวัดสกลนคร หมายเลข P170 และ P188, ไพลเหลืองจังหวัดสระแก้ว หมายเลข P42, P43, P98, 99 และ P172, ไพลเหลืองจังหวัดสระบุรี หมายเลข P52, P55 และ P56, ไพลเหลืองจังหวัดสุโขทัย หมายเลข P177, ไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย หมายเลข P18, P167, P171 และ P186, ไพลเหลืองจังหวัดอุบลราชธานี หมายเลข P107.

กลุ่มที่ 3 จำนวน 23 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดเชียงราย หมายเลข P156 และ P157, ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข P58, P65, P148, P151 และ P153, ไพลเหลืองจังหวัดตาก

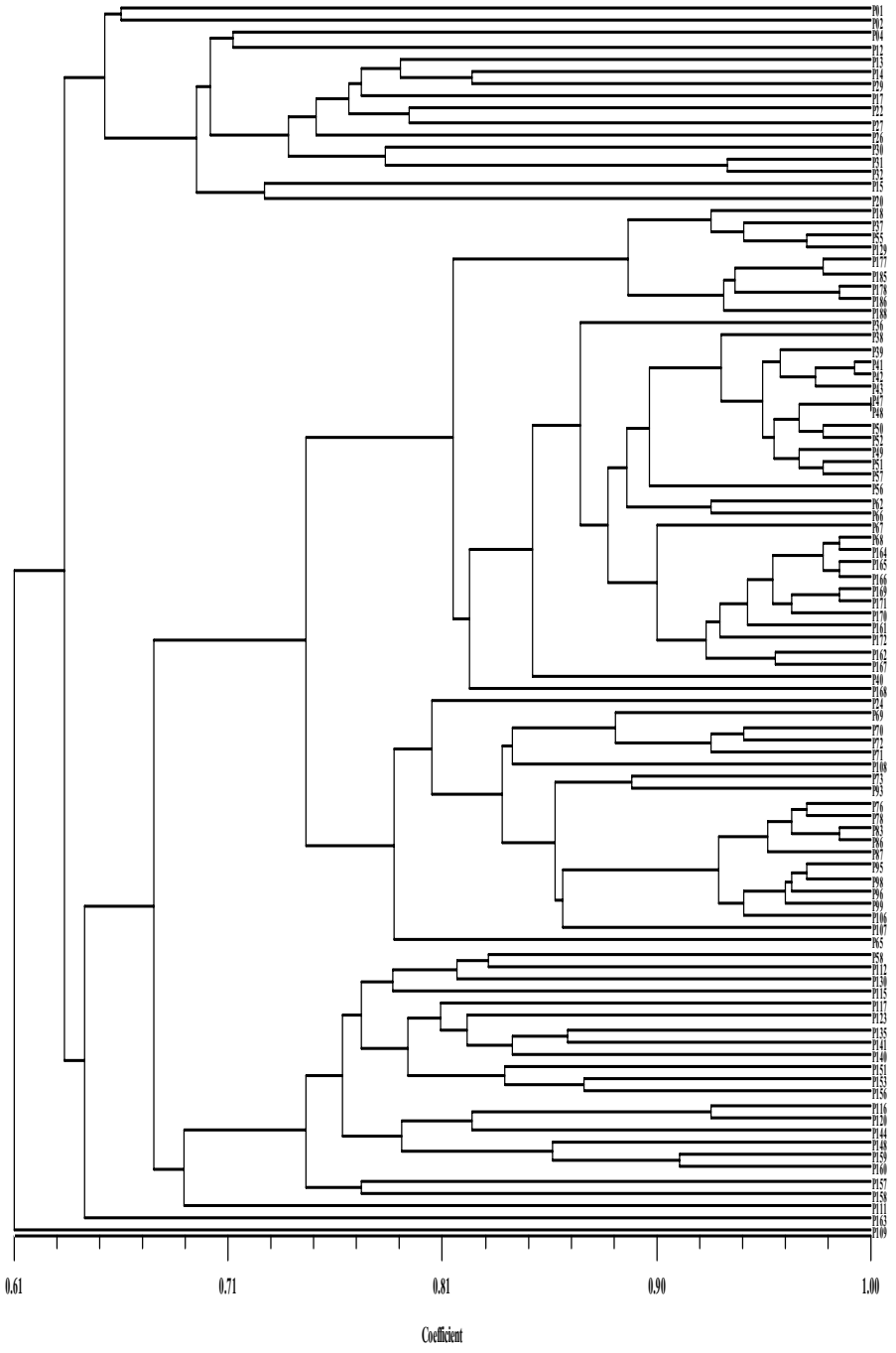
หมายเลข P116, P117, P120, P123, P130, ไพลเหลืองจังหวัดนครสวรรค์ หมายเลข P115, ไพลเหลืองจังหวัดพะเยา หมายเลข P158, ไพลเหลืองจังหวัดแม่ฮ่องสอน หมายเลข P135, P140, P141 และ P144, ไพลเหลืองจังหวัดราชบุรี หมายเลข P111 และ P112, ไพลเหลืองจังหวัดลำปาง หมายเลข P159 และ P160.

กลุ่มที่ 4 จำนวน 1 ตัวอย่างได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดตาก หมายเลข P163

กลุ่มที่ 5 จำนวน 1 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร หมายเลข P109.



รูปที่ 5. ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพลที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ *E*– ACT/*M*– CAG (F3) [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน].



รูปที่ 6. Phylogenetic tree ของไพลเหลืองที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11 โดยอาศัยข้อมูลเทคนิค AFLP จำนวน 139 AFLP markers จากคู่ไพรเมอร์ *E*– ACT/*M*– CAG (F3).

ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างไพลเหลืองเมื่อใช้ไพรเมอร์ 3 คู่

เมื่อนำไพลเหลืองเปรียบเทียบกันทั้งหมดจำนวน 92 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดกาฬสินธุ์ (P26), ไพลเหลืองจังหวัดขอนแก่น (P185), ไพลเหลืองจังหวัดเชียงราย (P157), ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ (P58, P62, P65, P66, P67, P68, P69, P148, P151, P168 และ P169), ไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี (P36, P40 และ P41),ไพลเหลืองจังหวัดตราด (P37, P38, P39, P47, P48 และ P57), ไพลเหลืองจังหวัดตาก (P01, P02, P04, P116, P117, P120, P123, P129, P130 และ P163), ไพลเหลืองจังหวัดนครพนม (P22), ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา (P29, P49, P50, P51, P70, P71, P72, P73, P76, P78, P86, P87, P93 และ P95), ไพลเหลืองจังหวัดนครสวรรค์ (P115), ไพลเหลืองจังหวัดบุรีรัมย์ (P96), ไพลเหลืองจังหวัดปราจีนบุรี (P83), ไพลเหลืองจังหวัดพิษณุโลก (P178), ไพลเหลืองจังหวัดเพชรบูรณ์ (P164, P165 และ P166), ไพลเหลืองจังหวัดแพร่ (P162), ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร (P24, P108 และ P109), ไพลเหลืองจังหวัดแม่ฮ่องสอน (P135, P140, P141 และ P144), ไพลเหลืองจังหวัดร้อยเอ็ด (P106), ไพลเหลืองจังหวัดราชบุรี (P111), ไพลเหลืองจังหวัดลพบุรี (P30), ไพลเหลืองจังหวัดลำปาง (P159, P160 และ P161), ไพลเหลืองจังหวัดสกลนคร (P27, P170 และ P188), ไพลเหลืองจังหวัดสระแก้ว (P42, P43, P98, P99 และ P172), ไพลเหลืองจังหวัดสระบุรี (P52, P55 และ P56),ไพลเหลืองจังหวัดสุโขทัย (P177), ไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย (P12, P13, P14, P15, P17, P18, P20, P167, P171 และ P186) และ ไพลเหลืองจังหวัดอุบลราชธานี (P107). โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Eco*RI และ *Tru*9I และคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจน 3 คู่ไพรเมอร์, เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 369 แถบดีเอ็นเอ หรือ 369 AFLP markers, เฉลี่ยแต่ละคู่ไพรเมอร์สามารถให้แถบดีเอ็นเอ 123 แถบ. แถบดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วง 111-139 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอสูงสุดคือ *E*– ACT/*M*– CAG (F3).

วิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์ค่า Genetics similarity โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ SM มีค่า cophenetic correlation (r) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าการจัดกลุ่มนั้นยอมรับได้หรือไม่พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.932.

เปรียบเทียบค่า similarity index โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Simple Matching พบว่าตัวอย่างไพลที่มีค่าความสัมพันธ์กันมากที่สุด คือ ไพลเหลืองจังหวัดตราด หมายเลข P47 และ P48, ไพลมีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 1.00. ตัวอย่างที่มีค่าความสัมพันธ์กันน้อยที่สุดคือไพลเหลืองจังหวัดสกลนคร หมายเลข P27 และไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี หมายเลข P36 มีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.49.

จากแถบดีเอ็นเอที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของไพลเหลืองทั้ง 92 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11p (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) โดยคำนวณค่าความเหมือนของไพลทีละคู่, แล้วนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree (ดังแสดงในรูปที่ 7.) โดยวิธี UPGMA (Unweighted Method with Arithmetic Mean) สามารถแบ่งกลุ่มตามสัมพันธ์ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ :

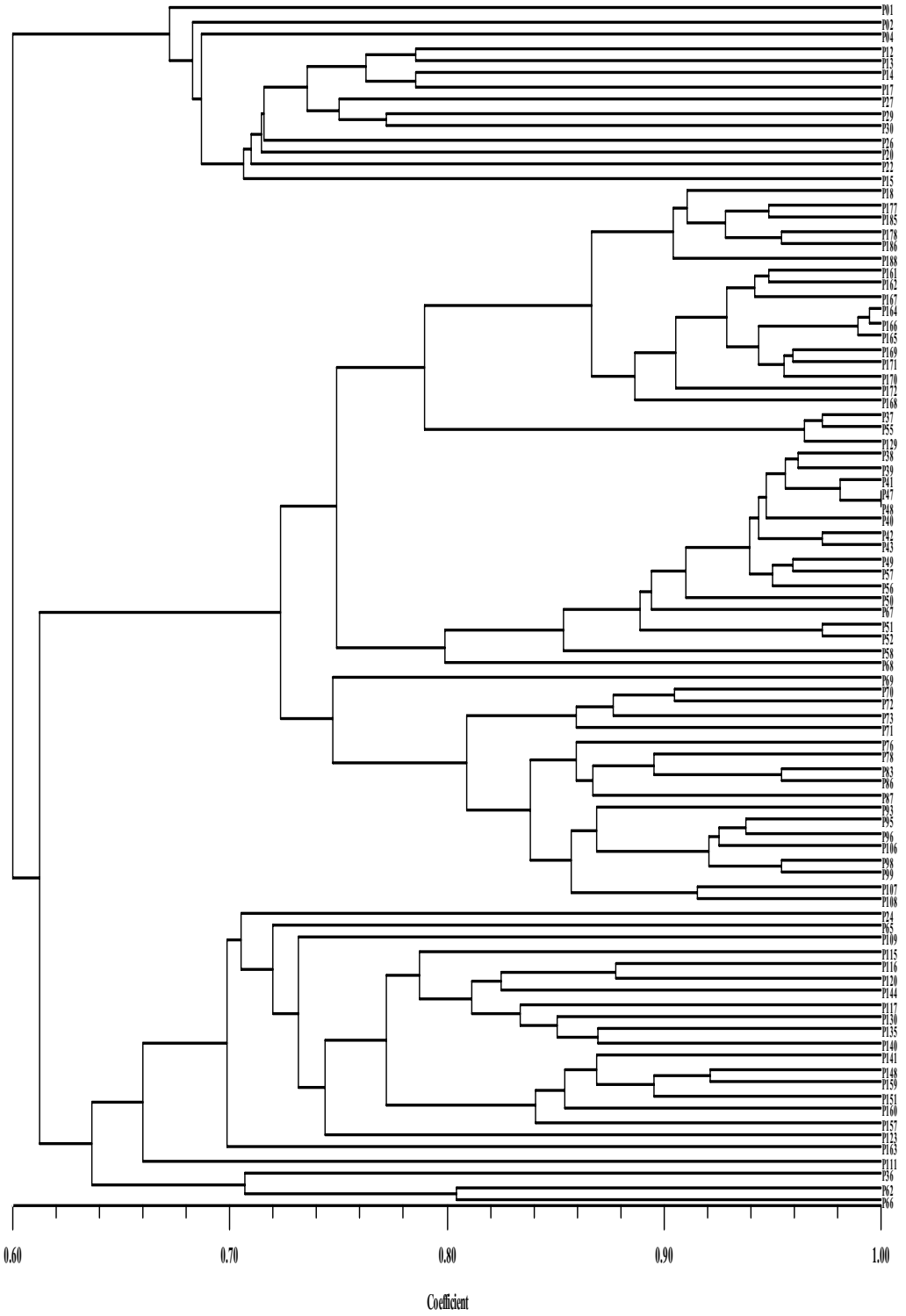
กลุ่มที่ 1 จำนวน 14 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดกาฬสินธุ์ หมายเลข P26, ไพลเหลืองจังหวัดตาก หมายเลข P01, P02 และ P04, ไพลเหลืองจังหวัดนครพนม หมายเลข P22, ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมาหมายเลข P29, ไพลเหลืองจังหวัดลพบุรี หมายเลข P30, ไพลเหลืองจังหวัดสกลนคร หมายเลข P27, ไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย หมายเลข P12, P13, P14, P15, P17 และ P20.

กลุ่มที่ 2 จำนวน 37 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดขอนแก่น หมายเลข P185, ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข P58, P67, P68, P168 และ P169, ไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี หมายเลข P40 และ P41,ไพลเหลืองจังหวัดตราด หมายเลข P37, P38, P39, P47, P48 และ P57, ไพลเหลืองจังหวัดตาก หมายเลข P129, ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา หมายเลข P49, P50 และ P51, ไพลเหลืองจังหวัดพิษณุโลก หมายเลข P178, ไพลเหลืองจังหวัดเพชรบูรณ์ หมายเลข P164, P165 และ P166, ไพลเหลืองจังหวัดลำปาง หมายเลข P161 และ P162, ไพลเหลืองจังหวัดสกลนคร หมายเลข P170 และ P188, ไพลเหลืองจังหวัดสระแก้ว หมายเลข P42, P43 และ P172, ไพลเหลืองจังหวัดสระบุรี หมายเลข P52, P55 และ P56, ไพลเหลืองจังหวัดสุโขทัย หมายเลข P177 และไพลเหลืองจังหวัดหนองคาย หมายเลข P18, P167, P171 และ P186.

กลุ่มที่ 3 จำนวน 18 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข P69, ไพลเหลืองจังหวัดนครราชสีมา หมายเลข P70, P71, P72, P73, P76, P78, P86, P87, P93 และ P95, ไพลเหลืองจังหวัดบุรีรัมย์ หมายเลข P96, ไพลเหลืองจังหวัดปราจีนบุรี หมายเลข P83, ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร หมายเลข P108, ไพลเหลืองจังหวัดร้อยเอ็ด หมายเลข P106, ไพลเหลืองจังหวัดสระแก้ว หมายเลข P98 และP99, ไพลเหลืองจังหวัดอุบลราชธานี หมายเลข P107.

กลุ่มที่ 4 จำนวน 23 ตัวอย่างไพลเหลืองจังหวัดเชียงราย หมายเลข P157, ไพลเหลืองจังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข P62, P65, P66, P148 และ P151,ไพลเหลืองจังหวัดจันทบุรี หมายเลข

P36, ไพลเหลืองจังหวัดตาก หมายเลข P116, P117, P120, P123, P130 และ P163,ไพลเหลืองจังหวัดนครสวรรค์ หมายเลข P115, ไพลเหลืองจังหวัดมุกดาหาร หมายเลข P24 และ P109, ไพลเหลืองจังหวัดแม่ฮ่องสอน หมายเลข P135, P140, P141 และ P144, ไพลเหลืองจังหวัดราชบุรี หมายเลข P111, ไพลเหลืองจังหวัดลำปาง หมายเลข P159, P160 .



รูปที่ 7. Phylogenetic tree ของไพลเหลือง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11 โดยอาศัยข้อมูลเทคนิค AFLP จำนวน 367 AFLP markers.

ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างไพลเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ใช่ไพล

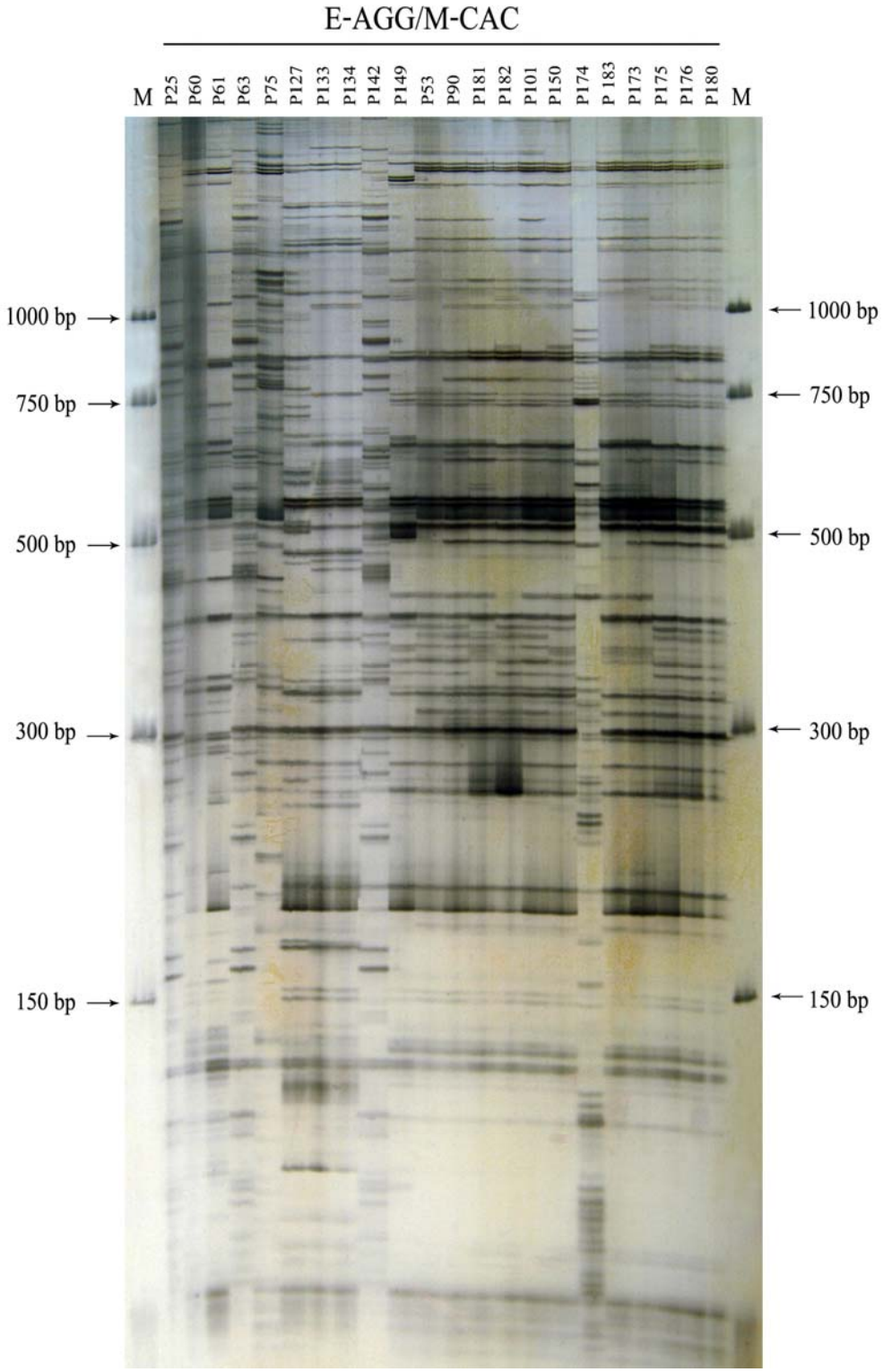
จากการนำไพลมาเปรียบเทียบกันทั้งไพลม่วง, ไพลเสก, ไพลหยวก, ไพลเหลือง และพืชในตระกูลเดียวกันที่ไม่ใช่ไพลด้วยเทคนิค AFLP, จำนวนรวมทั้งหมด 22 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลม่วง 5 ตัวอย่าง คือ ไพลม่วงจังหวัดมุกดาหาร (P25) ไพลม่วงจังหวัดเชียงราย (P60, P63) ไพลม่วงจังหวัดนครราชสีมา (P75) และไพลม่วงจังหวัดแม่ฮ่องสอน (P142), ไพลเสก 4 ตัวอย่าง คือ ไพลเสกจังหวัดสระบุรี (P53) ไพลเสกจังหวัดนครราชสีมา (P90) และไพลเสกจังหวัดสระแก้ว (P101, P183), ไพลหยวก 6 ตัวอย่าง คือ ไพลหยวกจังหวัดกาญจนบุรี (P181, P182) ไพลหยวกจังหวัดนครปฐม (P175, P176) ไพลหยวกจังหวัดนครราชสีมา (P180) และไพลหยวกจังหวัดสระแก้ว (P173), ไพลเหลือง 1 ตัวอย่าง คือไพลเหลืองจังหวัดสระแก้ว (P174) และพืชในตระกูลเดียวกันที่ไม่ใช่ไพล จำนวน 6 ตัวอย่าง คือ จากจังหวัดเชียงราย (P61) จากจังหวัดตาก (P127, P133, P134) จากจังหวัดเชียงราย (P149 และ P150). โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Tru*9I และคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจน 3 คู่ไพรเมอร์, เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 678 แถบดีเอ็นเอ หรือ 678 AFLP markers, เฉลี่ยแต่ละคู่ไพรเมอร์สามารถให้แถบดีเอ็นเอ 226 แถบ, แถบดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วง 207-254 แถบต่อคู่ไพรเมอร์, คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอสูงสุด คือ *E*-ACC/*M*-CAG (D6).

วิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์ค่า Genetics similarity โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Jaccard มีค่า cophenetic correlation (r) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าการจัดกลุ่มนั้นยอมรับได้หรือไม่พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.992.

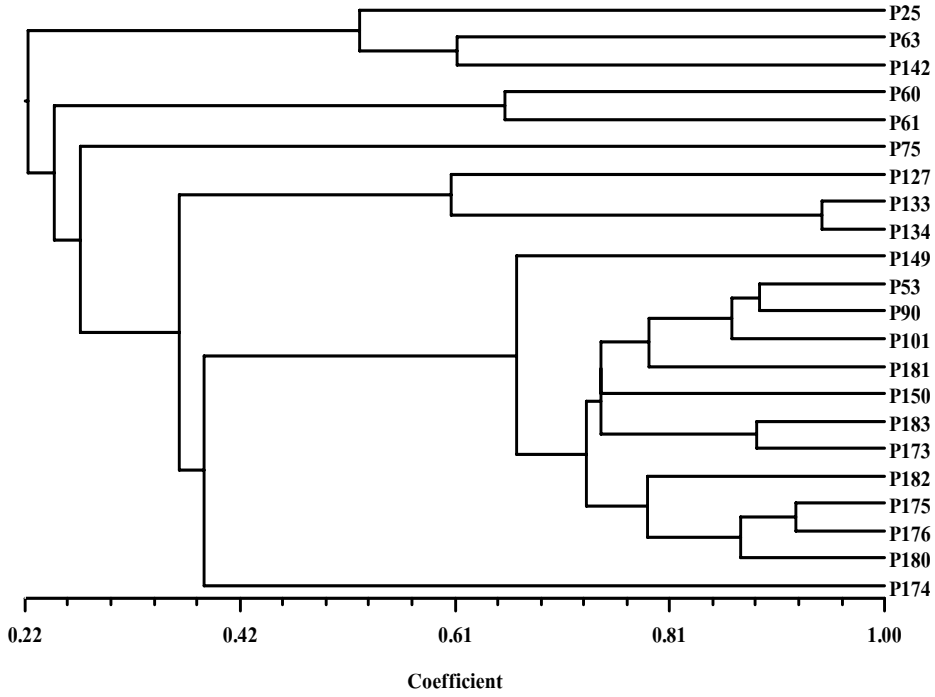
เปรียบเทียบค่า similarity index เมื่อใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard พบว่าตัวอย่างไพลที่มีค่าความสัมพันธ์กันมากที่สุด คือ พวกที่ไม่ใช่ไพลจังหวัดตาก หมายเลข P133 และ P134 มีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.943, ตัวอย่างที่มีค่าความสัมพันธ์กันน้อยที่สุด คือ ไพลม่วงจังหวัดมุกดาหาร (P25) และตัวอย่างที่ไม่ใช่ไพลจังหวัดเชียงราย (P61) มีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.150.

จากแถบดีเอ็นเอที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของไพลทั้ง 22 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11p (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) โดยคำนวณค่าความเหมือนของไพลทีละคู่ แล้วนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree (ดังแสดงในรูปที่ 9.) โดยวิธี UPGMA (Unweighted Method with Arithmetic Mean), สามารถแบ่งกลุ่มตามสัมพันธ์ได้ดังนี้ : กลุ่มที่ 1 มี 3 ตัวอย่าง คือ

ไพลม่วงมุกดาหาร (P25), ไพลม่วงเชียงราย (P 63) และไพลม่วงแม่ฮ่องสอน (P142). กลุ่มที่ 2 มี 2 ตัวอย่าง คือ ไพลม่วงเชียงราย (P60) และ ไม่ใช่ไพลเชียงราย (P61). กลุ่มที่ 3 มีเพียง 1 ตัวอย่าง คือ ไพลนครราชสีมา (P75). กลุ่มที่ 4 เป็นพวกที่ไม่ใช่ไพล 3 ตัวอย่าง จากจังหวัดตาก (P127, P133, P134). กลุ่มที่ 5 มี 12 ตัวอย่าง ซึ่งมีทั้งที่ไม่ใช่ไพล ไพลเสก และไพลหยวก ได้แก่ ไม่ใช่ไพลเชียงราย 2 ตัวอย่าง (P149 และ P150) ไพลเสกสระบุรี (P53) ไพลเสกนครราชสีมา (P90) ไพลเสกสระแก้ว 2 ตัวอย่าง (P101, P183) ไพลหยวกกาญจนบุรี 2 ตัวอย่าง (P181, P182) ไพลหยวกนครปฐม 2 ตัวอย่าง (P175, 176) ไพลหยวกนครราชสีมา (P180) และไพลหยวกสระแก้ว (P173) และ กลุ่มที่ 6 คือ ไพลเหลืองสระแก้ว (P174).



รูปที่ 8. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตัวอย่างไพลและที่ไม่ใช่ไพลจากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ *E*-AGG/*M*-CAC (H2) [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน].



รูปที่ 9. Phylogenetic tree ของไพลชนิดต่าง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11 โดยอาศัยข้อมูลเทคนิค AFLP จำนวน 678 AFLP markers.

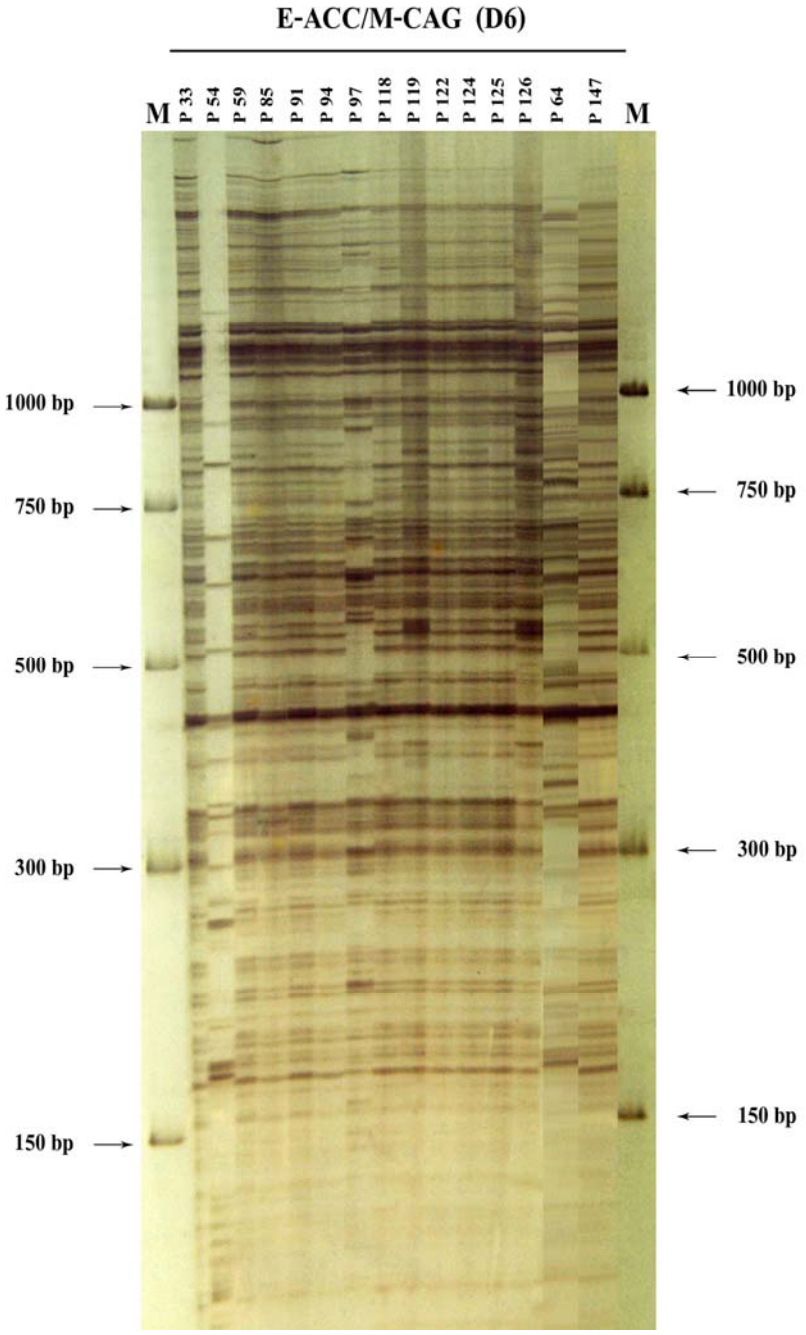
ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างไพลม่วง

นำไพลม่วงและไพลดำมาเปรียบเทียบกันทั้งหมดจำนวน 15 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลม่วงจังหวัดเชียงใหม่ (P59, P147), ไพลม่วงจังหวัดตาก (P118, P119, P122, P124, P125 และ P126), ไพลม่วงจังหวัดนครราชสีมา (P33, P85, P91 และ P94), ไพลม่วงจังหวัดสระแก้ว (P97), ไพลม่วงจังหวัดสระบุรี (P54) และไพลดำจังหวัดเชียงใหม่ (P64). โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Tru*9I และคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจน 3 คู่ไพรเมอร์, เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 506 แถบดีเอ็นเอ หรือ 506 AFLP markers, เฉลี่ยแต่ละคู่ไพรเมอร์สามารถให้แถบดีเอ็นเอ 169 แถบ, แถบดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วง 129-210 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอสูงสุด คือ *E*-ACC/*M*-CAG (D6).

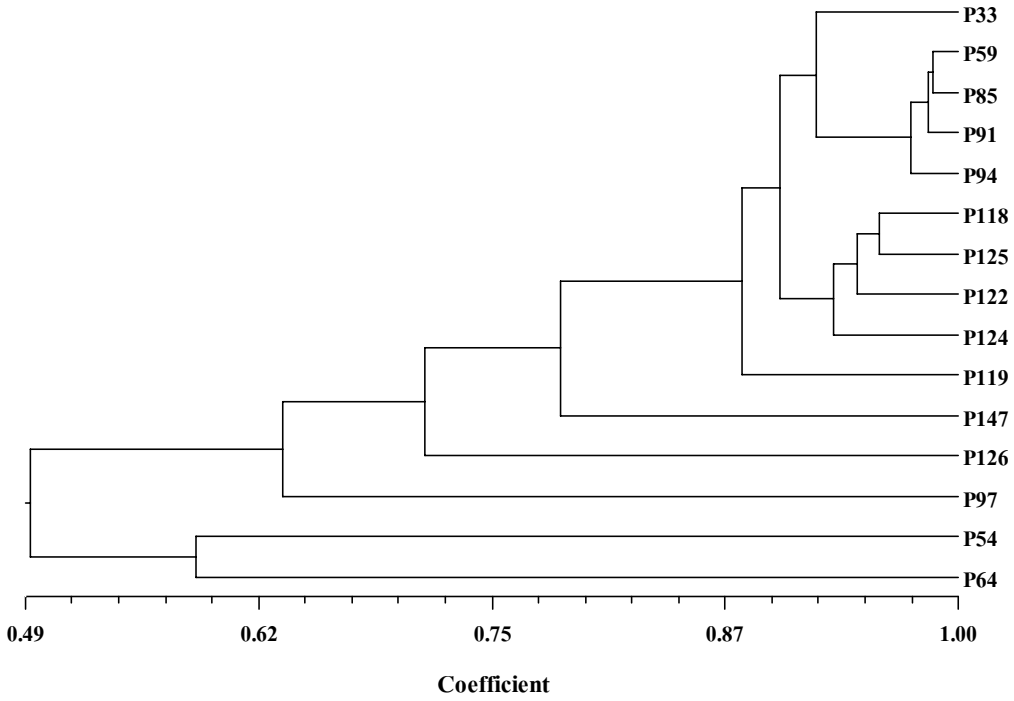
วิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์ค่า Genetics similarity โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Simple Matching มีค่า cophenetic correlation (r) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าการจัดกลุ่มนั้นยอมรับได้หรือไม่พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.985.

เมื่อเปรียบเทียบค่า similarity index โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Simple Matching พบว่า ตัวอย่างไพลที่มีค่าความสัมพันธ์กันมากที่สุดคือ ไพลม่วงจังหวัดเชียงใหม่ (P59) และไพลม่วง จังหวัดนครราชสีมา (P85), มีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.982. ตัวอย่างที่มีค่าความสัมพันธ์กัน น้อยที่สุดคือ ไพลม่วงจังหวัดตาก (P119) และไพลดำจังหวัดเชียงใหม่ (P64), มีค่าความสัมพันธ์ เท่ากับ 0.421.

จากแถบดีเอ็นเอที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของไพลทั้ง 15 ตัวอย่าง ด้วย โปรแกรม NTSYS pc 2.11p (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) โดย คำนวณค่าความเหมือนของไพลทีละคู่ แล้วนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใน รูปแบบ phylogenetic tree (ดังแสดงในรูปที่ 11.) โดยวิธี UPGMA (Unweighted Method with Arithmetic Mean), สามารถแบ่งกลุ่มตามสัมพันธ์ได้ 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 13 ตัวอย่าง ได้แก่ไพลม่วงจังหวัดเชียงใหม่ (P59) ไพลม่วงจังหวัดนครราชสีมา (P33, P85, P91 และ P94) ไพลม่วงจังหวัดตาก (P118, P119, P122, P124 และ P125) ไพลม่วงจังหวัดเชียงใหม่ (P147) ไพล ม่วงจังหวัดตาก (P126) ไพลม่วงจังหวัดสระแก้ว (P97) และกลุ่มที่ 2 จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพล ม่วงจังหวัดสระบุรี (P54) และไพลดำจังหวัดเชียงใหม่ (P64).



รูปที่ 10. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพลม่วงที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ *E*-ACC/*M*-CAG (D6) [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน].



รูปที่ 11. Phylogenetic tree ของไพลม่วง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.11 โดยอาศัยข้อมูลเทคนิค AFLP จำนวน 508 AFLP markers.

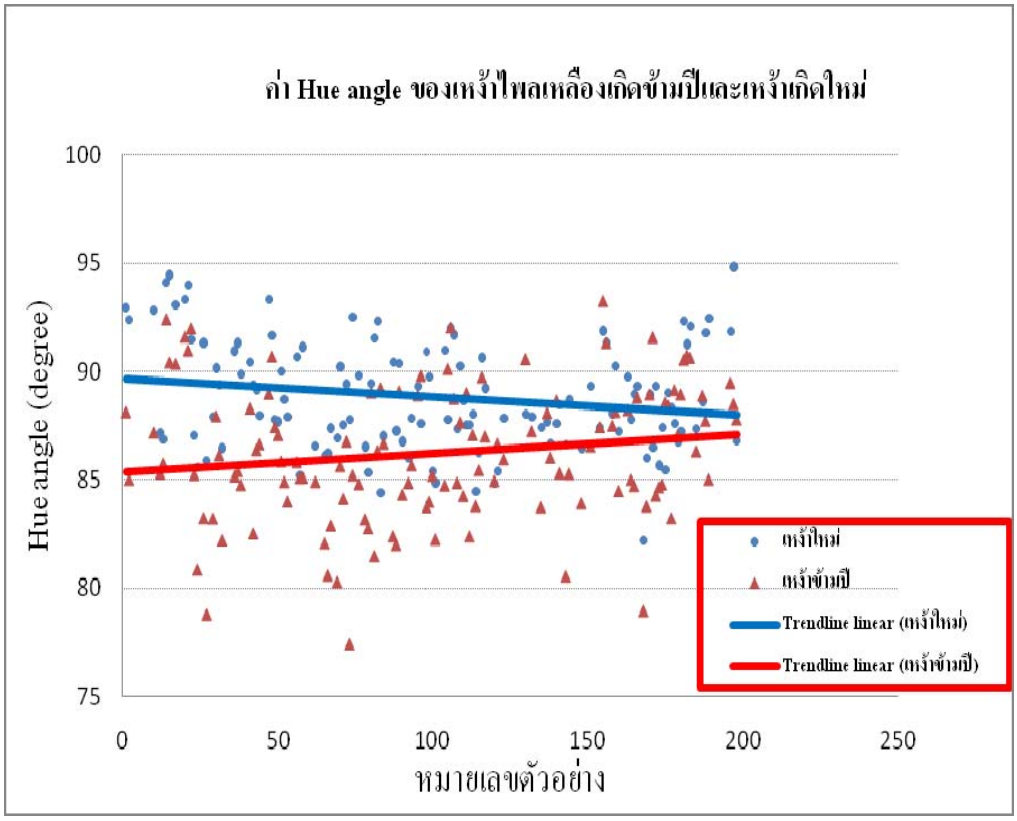
ผลการศึกษาสีของตัวอย่างเหง้าไพลเหลือง

การศึกษาสีของของตัวอย่างเหง้าไพลเหลืองจำนวน 127 สายพันธุ์ ทั้งที่เกิดข้ามปีเปรียบเทียบกับเหง้าไพลที่เกิดขึ้นใหม่เมื่อถึงช่วงการเก็บเกี่ยวในแปลงรวบรวมสายพันธุ์, โดยใช้เครื่องวัดสี (chroma meter) วัดค่า L, a และ b แล้วคำนวณออกมาเป็นค่าสีสัน (Hue angle), ค่าความอิ่มตัวของสี (chroma) และค่าความสว่างของสี (Lightness). ในภาพรวมแล้ว พบว่าในเหง้าของไพลเหลืองที่เกิดขึ้นข้ามปีจะมีสีเหลืองที่เข้มกว่าโดยมีค่าเฉลี่ยสีสันกับ 86.24, ในขณะที่เหง้าไพลเกิดใหม่มีค่าเฉลี่ยสีสันเท่ากับ 88.82 หรือจะมีสีออกไปทางเหลืองอ่อนมากกว่า.

เมื่อพิจารณาถึงความอิ่มตัวของสี (Chroma) จะพบว่า, ในกลุ่มไพลเหลือง เหง้าที่เกิดข้ามปีจะมีค่าความอิ่มตัวของสีเฉลี่ยเท่ากับ 48.53 ซึ่งจะมีความอิ่มตัวของสีน้อยกว่าเหง้าที่เกิดใหม่ เฉลี่ยเท่ากับค่าเท่ากับ 54.11 และเมื่อดูค่าความสว่างของเหง้าที่เกิดทั้งสองช่วงอายุแล้ว, จะพบว่าเหง้าไพลที่เกิดใหม่จะมีค่าความสว่างของสี มากกว่าเหง้าไพลที่เกิดข้ามปี โดยมีค่าความสว่างเท่ากับ 71.44 และ 66.98 ตามลำดับ.

ตารางที่ 7. ค่าเฉลี่ยของค่าสีสัน (hue angle) ค่าความอิ่มตัวของสี (chroma) และค่าความสว่าง (lightlness) ของเหง้าไพลเหลืองจำนวน 127 ตัวอย่าง ที่เกิดข้ามปีเปรียบเทียบกับเหง้าไพลที่เกิดใหม่

ค่าวัดสี	เหง้าเกิดใหม่			เหง้าเกิดข้ามปี		
	Lightness	Hue	Chroma	Lightness	Hue	Chroma
Average	71.44	88.82	54.11	66.98	86.24	48.53
SD	2.65	2.49	6.76	4.30	3.08	7.37
SE	1.53	1.44	3.90	2.48	1.78	4.25



รูปที่ 12. การกระจายตัวและแนวโน้มในภาพรวมของค่าสีสัน (Hue angle) ของตัวอย่างเหง้าไพลต่างๆ ที่เกิดใหม่และเกิดข้ามปี.

4. สรุปผลการทดลอง

สรุปผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างไพลเหลือง

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างไพลเหลืองที่เก็บรวบรวมมาทั้งหมดจำนวน 92 ตัวอย่าง, สามารถแบ่งกลุ่มตามสัมพันธ์ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ :

กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 14 ตัวอย่าง ได้แก่ P01, P02, P04, P12, P13, P14, P15, P17, P20, P22, P26, P27, P29 และ P30.

กลุ่มที่ 2 จำนวน 37 ตัวอย่าง ได้แก่ P18, P37, P38, P39, P40, P41, P42, P43, P47, P48, P49, P50, P51, P52, P55, P56, P57, P58, P67, P68, P129, P161, P162, P164, P165, P166, P167, P168, P169, P170, P171, P172, P177, P178, P185, P186 และ P188.

กลุ่มที่ 3 จำนวน 18 ตัวอย่าง ได้แก่ P69 P70, P71, P72, P73, P76, P78, P86, P87, P93, P95, P96, P83, P108, P106, P98, P99 และ P107.

กลุ่มที่ 4 จำนวน 23 ตัวอย่างคือ P24, P62, P65, P66, P36, P109, P111, P115, P116, P117, P120, P123, P130, P135, P140, P141, P144, P148, P151, P157, P159, P160 และ P163.

จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นการยืนยันได้ว่าตัวอย่างสายพันธุ์ไพลที่สำรวจและรวบรวมได้จากแหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศไทย, มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมอย่างแน่นอนและสามารถจัดแบ่งกลุ่มออกได้เป็น 4 กลุ่ม และตัวอย่างในแต่ละกลุ่มก็ยังมีความแตกต่างกันออกไปอีก. ทั้งนี้อาจเนื่องจากการกลายพันธุ์โดยธรรมชาติ หรือเกิดการกระจายของสายพันธุ์กันเองมาจากผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์และเกิดเป็นเมล็ด, ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ไพลต่อๆ มา (อึ้งวิเชียร และคณะ 2552).

สรุปผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างไพลและพวกที่ไม่ใช่ไพล

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตัวอย่างสายพันธุ์ไพลทั้งที่เป็นไพลเหลือง และที่มีความใกล้ชิดกับไพลเหลือง คือ ไพลม่วง ไพลเสก ไพลหยวก และพืชในตระกูลเดียวกันที่ไม่ใช่ไพล รวมจำนวน 22 ตัวอย่าง, ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตามสัมพันธ์ได้ 6 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 มี 3 ตัวอย่าง ไพลม่วงมุกดาหาร (P25) ไพลม่วงเชียงราย (P63) และไพลม่วงแม่ฮ่องสอน (P142), กลุ่มที่ 2 มี 2 ตัวอย่าง คือ ไพลม่วงเชียงราย (P60) และ ไม่ใช่ไพลเชียงราย (P61), กลุ่มที่ 3 มีเพียง 1 ตัวอย่าง คือ ไพลม่วงนครราชสีมา (P75), กลุ่มที่ 4 เป็นพวกที่ไม่ใช่ไพล 3 ตัวอย่างจากจังหวัดตาก (P127, P133 และ P134), กลุ่มที่ 5 มี 12 ตัวอย่าง ซึ่งมีทั้งที่ไม่ใช่ไพล, ไพลเสก และไพลหยวก

ได้แก่ ไม่ใช่ไพลเชียงราย 2 ตัวอย่าง (P149 และ P150) ไพลเสกสระบุรี (P53) ไพลเสกนครราชสีมา (P90) ไพลเสกสระแก้ว 2 ตัวอย่าง (P101 และ P183) ไพลหยวกกาญจนบุรี 2 ตัวอย่าง (P181 และ P182) ไพลหยวกนครปฐม 2 ตัวอย่าง (P175 และ P176) ไพลหยวกนครราชสีมา (P180) และไพลหยวกสระแก้ว (P173) และกลุ่มที่ 6 คือไพลเหลืองสระแก้ว (P174). ซึ่งจะเห็นว่าการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะสามารถแยกกลุ่มของไพลเหลืองออกจากไพลชนิดอื่นได้อย่างชัดเจน.

สรุปผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างกลุ่มไพลม่วง

จากการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกลุ่มไพลม่วงและไพลดำทั้งหมดจำนวน 15 ตัวอย่าง, สามารถแบ่งกลุ่มตามสัมพันธ์ได้ 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 จำนวน 13 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลม่วงจังหวัดเชียงใหม่ (P59) ไพลม่วงจังหวัดนครราชสีมา (P33, P85, P91, P94) ไพลม่วงจังหวัดตาก (P118, P119, P122, P124 และ P125) ไพลม่วงจังหวัดเชียงใหม่ (P147) ไพลม่วงจังหวัดตาก (P126) ไพลม่วงจังหวัดสระแก้ว (P97) และกลุ่มที่ 2 จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพลม่วงจังหวัดสระบุรี (P54) และไพลดำจังหวัดเชียงใหม่ (P64).

สรุปผลการวัดสีของตัวอย่างเหง้าไพลเหลือง

จากค่าเฉลี่ยสีที่วัดได้จากตัวอย่างไพลเหลืองจำนวน 127 สายพันธุ์ พบว่าโดยภาพรวมแล้วสีของเนื้อในเหง้าไพลที่เกิดข้ามปีจะมีสีเข้มกว่าเหง้าไพลที่เกิดใหม่, ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการที่เหง้าไพลที่เกิดข้ามปีจะมีองค์ประกอบของน้ำมัน และสารสำคัญแตกต่างจากเหง้าไพลที่เกิดใหม่.

5. ข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจและรวบรวมสายพันธุ์ไพลที่มีกระจายตามแหล่งต่างๆ ทั่วประเทศและเมื่อมีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอนเอ, พบว่าตัวอย่างสายพันธุ์ที่รวบรวมได้มีความแตกต่างในด้านพันธุกรรมค่อนข้างมาก, ซึ่งประเด็นของความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้เองอาจจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่มีคุณค่าไม่ว่าจะเป็นทางด้านความสามารถในการให้ปริมาณผลผลิตที่สูง, การให้ผลผลิตที่มีทั้งปริมาณและคุณภาพของน้ำมันไพลที่สูง หรืออาจรวมไปถึงลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความต้านทานต่อโรคและแมลง. ดังนั้นลักษณะทางพันธุกรรมนั้นๆ จะเป็นประโยชน์อย่างดียิ่งในด้านทรัพยากรทางพันธุกรรมที่ควรจะอนุรักษ์และทำการศึกษาต่อไป. โดยเฉพาะงานวิจัยและพัฒนาเพื่อการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ไพลให้เป็นสายพันธุ์มีคุณภาพทั้งทางด้านปริมาณผลผลิตและคุณภาพของน้ำมันที่สูงขึ้น, ซึ่งหากสำเร็จตามที่คาดหวังก็จะแก้ปัญหาของเกษตรกรผู้ปลูกและแก้ปัญหาน้ำมันไพลที่มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน และสุดท้ายก็จะเป็นผลกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อมในทางเศรษฐกิจและสังคมของภาคการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตรที่เกี่ยวข้องต่อไปอย่างชัดเจน.

6. เอกสารอ้างอิง

ตั้งเปรมศรี, วันทนา. 2541. การจำแนกข้าวฟ่างโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 36. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. หน้า 297.

ปิยะโชคณากุล, สุรินทร์. 2542. การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เทคนิค AFLP แบบปลอดรังสี Nonradiocative AFLP Techniques. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

อัตถทิพพหลคุณ, วัชรี และอัตถทิพพหลคุณ, มนตรี. 2536. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology. คณะแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.หน้า 208.

อึ้งวิเชียร, อิทธิฤทธิ์; สมศรี, ทรงพล และ ชัยดรุณ, สมนึก. 2552. การศึกษาการกระจายทางพันธุกรรมของไพลที่ขยายพันธุ์จากเมล็ด. โครงการวิจัยที่ 3. *ใน:* รายงานการวิจัยการปรับปรุงพันธุ์และการเขตกรรมสมุนไพร. งบประมาณแผนงานสนับสนุนการวิจัยเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืนประจำปีงบประมาณ 2551. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 234.

Bua-in, Saoaluck and Paisooksantivatana., 2009. Study of clonally propagated cassummunar ginger (Zingiber montanum (Koeing) Link ex Dietr.) and its relation of wild Zingiber species from Thailand revealed by RAPD markers. *Genet. Resour. Crop Evol.*, **57**(3), pp. 405-414.

Chaoa, C.C.T. *et . al.*, 2005. AFLP analysis of genetic relationships among Calathea species and cultivars. *Plant Genetic Resources.* **4**, pp. 181-187.

Chavan, P. *et. al.*, 2008. Development of SCAR (sequence-characterized amplified region) markers as a complementary tool for identification of ginger (Zingiber officinale Roscoe) from crude drugs and multicomponent formulations. *Biotechnol Appl. Biochem.*, **1**, pp : 61-69.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1), pp : 13-15.

Jaccard, P., 1908. Nouvelles rescherches sur la distribution florale. *Bull.Soc.Sci.Nat.*, 44, pp : 223-270.

Jones, M. *et .al.* 2006. Genetic diversity of litchi germplasm assessed by AFLP marker. Animal and Microbe Genome Conference XIV., pp : 223.

Khampila, J. *et. al.*, 2005. Genetic variation of the genus *Zingiber* (ZINGIBERACEAE) in Thailand detected by RAPD Markers. 31st Congress of Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology.

Lin. J.J. *et. al*., 1996. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Molecular Biology Reporter*, **14**(1), pp : 156-169.

Ott, J., 1991. Analysis of Human Genetic Linkage. Revised edu. Johns Hopkins University Press. U.S.A : Battimore.

Rout, G.R. *et. al.*, 1998. Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39, pp. 23-27.

Singh, M.S. *et. al.*, 1999. Assessment of genetic diversity in Azadirachta indica using AFLP. Theor. Appl. Genet. 99(1-2), pp. 272-279.

Sneath, P.H.A. and Sokal, R. R., 1973. Numeri cal Taxonomy. San Francisco : Freeman. pp. 573.

Williams, J.G.K. *et .al*., 1990. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res*. **18**, pp. 6531-6535.

Zabeau, M. and P. Vos., 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application No. 0534858 A 1. Paris : European Patent Office.