



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ้ในประเทศไทย

DNA fingerprint analysis of *Pluchea indica* (L.) Less. in Thailand

โดย

นสภ.กรวิชญ์	ช่องดารากุล	55210034
นสภ.ธนวัฒน์	บรรณวัฒน์	55210049
นสภ.ธัญชนิต	คุ้มฮั่น	55210050

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2559

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ้ในประเทศไทย

DNA fingerprint analysis of *Pluchea indica* (L.) Less. in Thailand

โดย

นสภ.กรวิษฐ์	ช่องดารากุล	55210034
นสภ.ธนวัฒน์	บรรณวัฒน์	55210049
นสภ.ธัญชนิต	คุ้มฮั่น	55210050

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2559

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

ขลุ่ยอยู่ในวงศ์ Asteraceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pluchea indica* เป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย ปัจจุบันได้มีการศึกษาหาสารสำคัญของขลุ่ยอย่างกว้างขวางเพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาได้ แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดถึงจำนวนสายพันธุ์รวมถึงความแตกต่างทางพันธุกรรม ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ระบุชนิดและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สำหรับงานวิจัยฉบับนี้ผู้ทำวิจัยคาดหวังว่าเป็นแนวทางแก่ผู้ที่มีความสนใจที่จะศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ่ยในประเทศไทย

คณะวิจัย

นสภ.กรวิชญ์	ช่องดารากุล	55210034
นสภ.ธนวัฒน์	บรรณวัฒน์	55210049
นสภ.ธัญชนิต	คุ้มฮั่น	55210050

14 ธันวาคม 2559

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2559

เรื่อง การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุในประเทศไทย

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. กรวิชัย ช่องดารากุล รหัส 55210034
2. นสภ. ธนวัฒน์ บรรณวัฒน์ รหัส 55210049
3. นสภ. ธัญชนิต คุ่มฮิ้น รหัส 55210050

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภก.ผศ.ดร. บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์
2. อ.ดร. ศศิภาวรรณ มาชะนา
3. อ.ดร. สุนันต์ ใจสมุทร

บทคัดย่อ

ขลุ *Pluchea indica* (L.) Less. วงศ์ Asteraceae สามารถพบได้ในหลายพื้นที่ของประเทศไทย โดยผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างขลุจาก 15 จังหวัดเพื่อทำการศึกษา โดยวัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequence) ของขลุในตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) และเพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของขลุโดยใช้เทคนิค ISSR วิธีการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS จะใช้ primers จำนวน 2 ชนิดคือ 18sF และ 26sR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และวิธีการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค ISSR ได้คัดเลือก primer จำนวน 3 ชนิด ซึ่งผลการทดลองพบว่าลำดับดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS ของขลุทั้ง 15 จังหวัดเป็นสายพันธุ์เดียวกันทั้งหมด และการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค ISSR จาก primer 3 ชนิดให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นพหุสัญญาณ ทั้งสิ้น 23 แถบ ดังนั้นการใช้เทคนิค ISSR จึงสามารถนำมาใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุได้ เมื่อคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) และระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) แล้วนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) โดยใช้วิธี UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มทางพันธุกรรมออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ในอนาคตควรมีการศึกษาโดยเพิ่มจำนวน primer ให้มากขึ้นซึ่งคาดว่าจะสามารถแยกความหลากหลายทางสายพันธุ์ของขลุได้อย่างแม่นยำมากขึ้น และควรมีการสกัดปริมาณสารสำคัญจากใบขลุเพื่อนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญกับพื้นที่

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2016

: DNA fingerprint analysis of *Pluchea indica* (L.) Less. in Thailand

By

- | | | |
|-------------------|--------------|-------------|
| 1. Mr. Korawich | Chongdarakul | ID 55210034 |
| 2. Mr. Thanawat | Bunnawat | ID 55210049 |
| 3. Mr. Thunchanit | Koomhin | ID 55210050 |

Advisor:

- | | | |
|-------------------------------|----------|------|
| 1. Assist.Prof.Dr. Boonyadist | Vongsak | Ph.D |
| 2. Dr. Sasipawan | Machana | Ph.D |
| 3. Dr. Sunan | Jaisamut | Ph.D |

ABSTRACT

Pluchea indica (L.) Less. is a member of the family Asteraceae. It is found in a wide variety of habitats in Thailand. Fifteen samples from various habitats of *P. indica* were utilized for investigation. The purposes of this study were to analyze DNA sequences of internal transcribe spacer (ITS) region and DNA fingerprint of *P. indica* evaluation by inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. ITS regions were amplified by specific *P. indica* primers, 18sF and 26sR. The result showed that, all samples were *P. indica* subspecies indica. For analysis of ISSR, Three primers were chosen because of clear band pattern. These primers amplified 23 polymorphic bands, so ISSR technique could be use for DNA fingerprint analysis of *P. indica*. The similarity index and dendrogram were evaluated using unweighted pair group method arithmetic mean. The result showed that *P. indica* could be divided in to two major groups. In further study, the number of primers should be increased and the correlation between secondary metabolite and genetic information of *P. indica* from different habitats should be investigated

Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเรื่อง “การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ่ยในประเทศไทย” สำเร็จลงได้ด้วยคำแนะนำคำปรึกษาและความช่วยเหลือจาก ภก.ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อ.ดร. ศศิภาวรรณ มาชะนา อ.ดร. สุนันต์ ใจสมุทร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และ คุณกนกพร ก้อนทรัพย์ ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย คำแนะนำและคำปรึกษา การเก็บตัวอย่างพืชและสารเคมีที่ใช้ในการทำงานวิจัย ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

นอกจากนี้ทางคณะผู้จัดทำต้องขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทางเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องสถานที่ อุปกรณ์ และการจัดเตรียมสารเคมี เป็นผลให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะวิจัย

นสภ.กรวิชญ์	ช่องดารากุล	55210034
นสภ.ธนวัฒน์	บรรณวัฒน์	55210049
นสภ.ธัญชนิต	คุ้มฮิ้น	55210050

14 ธันวาคม 2559

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	๗
บทคัดย่อ	๘
กิตติกรรมประกาศ	๑๑
สารบัญ	๑๓
บทที่ 1 บทนำ	1
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์	3
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
- กรอบแนวคิดและกรอบการทำงาน	3
- นิยามคำศัพท์	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	20
- วัสดุอุปกรณ์	20
- สารเคมี	20
- ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	21
- การสกัดดีเอ็นเอ	23
- การตรวจสอบคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ	25
โดยใช้ Gel electrophoresis	
- การพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ่ยที่ตำแหน่ง ITS	26
โดยใช้เทคนิค PCR	
- การวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของขลุ่ย	27
ด้วยเทคนิค ISSR	
บทที่ 4 ผลการวิจัย	28

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	41
เอกสารอ้างอิง	50
ภาคผนวก	55

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1. ISSR primer ในการวิเคราะห์ความใกล้เคียงกันของสายพันธุ์ใน <i>Jurinea</i> species วงศ์ Asteraceae	17
ตารางที่ 2. ตัวอย่างขลุ่ยที่ใช้ในการทดลอง	22
ตารางที่ 3. ปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอของขลุ่ยจาก 15 จังหวัด	29
ตารางที่ 4. ตำแหน่งดีเอ็นเอของ 18sF, ITS1, 5.8S, ITS2 และ 26sR ที่บันทึกข้อมูลลงสู่ genbank	31
ตารางที่ 5. จำนวนแถบดีเอ็นเอ monomorphic, polymorphic ของตัวอย่างขลุ่ย 15 จังหวัดโดยใช้เทคนิค ISSR จาก 5 primer	36
ตารางที่ 6. ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (Similarity Index) จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้โปรแกรมบนเว็บไซต์ http://genomes.urv.cat/UPGMA/	38

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1. กรอบแนวคิด	3
รูปที่ 2. กรอบการทำงาน	4
รูปที่ 3. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของขลุ่	6
รูปที่ 4. Ribosomal DNA	8
รูปที่ 5. ดีเอ็นเอบริเวณ ITS	9
รูปที่ 6. Gene matK	10
รูปที่ 7. Polymerase chain reaction	13
รูปที่ 8. Agarose gel electrophoresis of DNA	18
รูปที่ 9. ผลการทดสอบของดีเอ็นเอขลุ่ที่สกัดได้; 0 = DNA Ladder, 1= นนทบุรี การชะครั้งที่ 1, 2=นนทบุรี การชะครั้งที่ 2, 3= ประจวบคีรีขันธ์การชะครั้งที่1, 4= ประจวบคีรีขันธ์ การชะครั้งที่ 2, 5=ราชบุรี การชะครั้งที่ 1, 6=ราชบุรี การชะครั้งที่2, 7= เพชรบุรี การชะครั้งที่ 1, 8= เพชรบุรี การชะครั้งที่ 2, 9=สมุทรสาคร การชะครั้งที่1, 10= สมุทรสาคร การชะครั้งที่ 2	28
รูปที่ 10. ผลการทดสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้; 0 = DNA Ladder, 1= ระยอง การชะครั้งที่ 1, 2= ระยอง การชะครั้งที่ 2, 3= สมุทรสงคราม การชะครั้งที่ 1, 4= สมุทรสงคราม การชะครั้งที่ 2, 5= ฉะเชิงเทรา การชะครั้งที่ 1, 6= ฉะเชิงเทรา การชะครั้งที่ 2, 7= ราชบุรี การชะครั้งที่ 1, 8= ราชบุรี การชะครั้งที่ 2, 9=จันทบุรี การชะครั้งที่ 1, 10= จันทบุรี การชะครั้งที่ 2	28

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

หน้า

รูปที่ 11. ผลการทดสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้; 0=DNA Ladder, 1= สุราษฎร์ธานี การชะครั้งที่ 1, 2= สุราษฎร์ธานี การชะครั้งที่ 2, 3= อุตรดิตถ์ การชะครั้งที่ 1, 4= อุตรดิตถ์ การชะครั้งที่ 2, 5= ภูเก็ต การชะครั้งที่ 1, 6= ภูเก็ต การชะครั้งที่ 2, 7= นครราชสีมา การชะครั้งที่ 1, 8= นครราชสีมา การชะครั้งที่ 2	29
รูปที่ 12. ผลการทดสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้; 0=DNA Ladder, 1= สงขลา การชะครั้งที่ 1, 2= สงขลา การชะครั้งที่ 2, 3= ชลบุรี การชะครั้งที่ 1, 4= ชลบุรี การชะครั้งที่ 2	29
รูปที่ 13. แถบดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS ของ <i>P. indica</i>	31
รูปที่ 14. การเปรียบเทียบลำดับเบสดีเอ็นเอของตัวอย่าง <i>P. indica</i> ทั้ง 15 จังหวัด	33
รูปที่ 15. แถบดีเอ็นเอของ <i>P. indica</i> จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR โดยการใช้ primer ISSR3	34
รูปที่ 16. แถบดีเอ็นเอของ <i>P. indica</i> จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR โดยการใช้ primer ISSR4	34
รูปที่ 17. แถบดีเอ็นเอของ <i>P. indica</i> จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR โดยการใช้ primer ISSR8	35
รูปที่ 18. ISSR ของพังกาดอกช่อ (<i>Bruguiera hainesii</i>)	35
รูปที่ 19. แผนภาพเดนโดรแกรม (Dendrogram) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของขลุ่ ทั้ง 15 จังหวัดและพังกาดอกช่อ	39

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหานวิจัย

ในอดีตพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดถูกบริษัทยาต่างชาตินำไปศึกษาต่อยอดและจดสิทธิบัตรเป็นยารักษาโรคตัวอย่างเช่น เปิ้ล้าน้อย และ กระเทียม ซึ่งส่งผลให้ประเทศไทยจะต้องสูญเสียงบประมาณเพื่อซื้อผลิตภัณฑ์จากบริษัทยาต่างชาติ อีกทั้งส่งผลให้ลดโอกาสการพัฒนาจากพืชสมุนไพรที่ถูกจดสิทธิบัตร ซึ่งถือเป็นการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรชีวภาพของประเทศไทยและภูมิปัญญาท้องถิ่นของประเทศไทย (1) จึงส่งผลให้ประเทศไทยลงนามเป็นสมาชิก “พิธีสารนาโงยา” ว่าด้วยการเข้าถึงทรัพยากรพันธุกรรมและการแบ่งปันผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการใช้ประโยชน์ทรัพยากรพันธุกรรมอย่างเท่าเทียมและยุติธรรม(2) เพื่อให้ลดการเอาเปรียบจากต่างชาติ ซึ่งประเทศไทยยังมีพืชสมุนไพรจำนวนมากที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ที่เสี่ยงต่อการสูญเสียองค์ความรู้และภูมิปัญญาไทยให้กับต่างชาติ ซึ่งผู้วิจัยได้สนใจที่จะศึกษาพืช เนื่องจากในประเทศไทยยังมีการศึกษาเกี่ยวกับพืชสมุนไพรจำนวนน้อย ผู้วิจัยจึงต้องการยืนยันและเผยแพร่ผลการค้นพบและศึกษาพืชจากประเทศไทย

ขลุ่ (*Pluchea indica* (L.) Less.) เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยามากมาย ตัวอย่างเช่น เป็นยาขับปัสสาวะ ฝาดสมาน แก้แผลอักเสบ แก้เบาหวาน ขับนิ่ว(3) หรือทำเป็นชาขงใบขลุ่(4) อีกทั้งใบขลุ่สามารถนำมาประกอบอาหารได้อีกด้วย (5) นอกจากนี้ ขลุ่มีสาร secondary metabolite ที่มีคุณประโยชน์หลายชนิด เช่น phenolic compound, flavonoids, anthocyanins, β -carotene, carotenoids (6, 7) จากงานวิจัยที่เคยรายงานไว้พบว่า ขลุ่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงและมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็ง (8, 9) และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ เช่น anti-amoebic (10), anti-inflammatory (11, 12), antihyperglycemic (13), hepatoprotective (14), cobra venom neutralization (15)

อีกหนึ่งงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของขลุ่ในประเทศอินโดนีเซีย จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญต่อภูมิภาคที่มีสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน(16) นอกจากนี้ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมแล้ว พันธุกรรมอาจเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน

ในประเทศไทยได้มีการทำการศึกษาความแตกต่างของปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพรที่ปลูกในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ซึ่งได้มีงานวิจัยชิ้นหนึ่งที่ทำการศึกษาปริมาณสาร *plauental* ที่สกัดได้จากต้นเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) จากแหล่งที่แตกต่างกันในหลายพื้นที่พบว่า มีปริมาณ *plauental* ที่แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับแหล่งที่เก็บตัวอย่างอีกทั้งยังพบว่าต้นเปล้าน้อยที่เก็บจากต่างพื้นที่นี้สามารถนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มโดยใช้เทคนิค *inter simple sequence repeat (ISSR)* ซึ่งถือว่าเป็นวิธีการทดลองที่ใช้ค้นหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสปีชีส์ ไม่ว่าจะเป็นในสปีชีส์เดียวกันหรือต่างสปีชีส์กัน(17) ต่อมาได้มีรายงานวิจัยที่ศึกษาการนำลำดับเบสตำแหน่ง *internal transcribed spacer (ITS)* มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ 5 สปีชีส์ในสกุล *Guizotia* ที่อยู่ในวงศ์ *asteraceae* ด้วยการนำ *cluster analysis* จนได้เป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ออกมา (18) ซึ่งลำดับเบสตำแหน่ง *ITS* นั้นเป็นลำดับเบสอนุกรมวิธานที่มีความยาวและลำดับเบสที่ไม่เหมือนกันขึ้นกับชนิดของพืช จึงเป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชอย่างกว้างขวาง (19) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาว่าขลุในประเทศไทยมีสายพันธุ์ที่แตกต่างกันหรือไม่ ซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญได้ โดยการนำเอาแนวคิดเกี่ยวกับเทคนิค *ISSR* และ ลำดับเบสตำแหน่ง *ITS* มาใช้ร่วมด้วย

โดยสรุปโครงงานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาการวิเคราะห์หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและลำดับดีเอ็นเอของขลุ 15 จังหวัดได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ ชลบุรี นนทบุรี ภูเก็ต ราชบุรี ระยอง สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สงขลา จันทบุรี นครราชสีมา เพชรบุรี สุราษฎร์ธานี ฉะเชิงเทราและอุดรดิตถ์ โดยใช้เทคนิค *ISSR* เพื่อใช้ระบุชนิดและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของขลุ

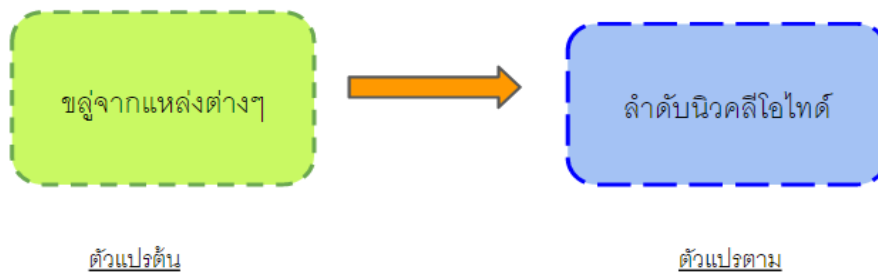
วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ของขลุ่ย ในตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS)
2. เพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของขลุ่ยโดยใช้เทคนิค ISSR

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบว่าตัวอย่างขลุ่ยจาก 15 จังหวัดในประเทศไทยมีกี่ซับสปีชีส์ (subspecies) และสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ่ยจากเทคนิค ISSR ได้

กรอบแนวคิด

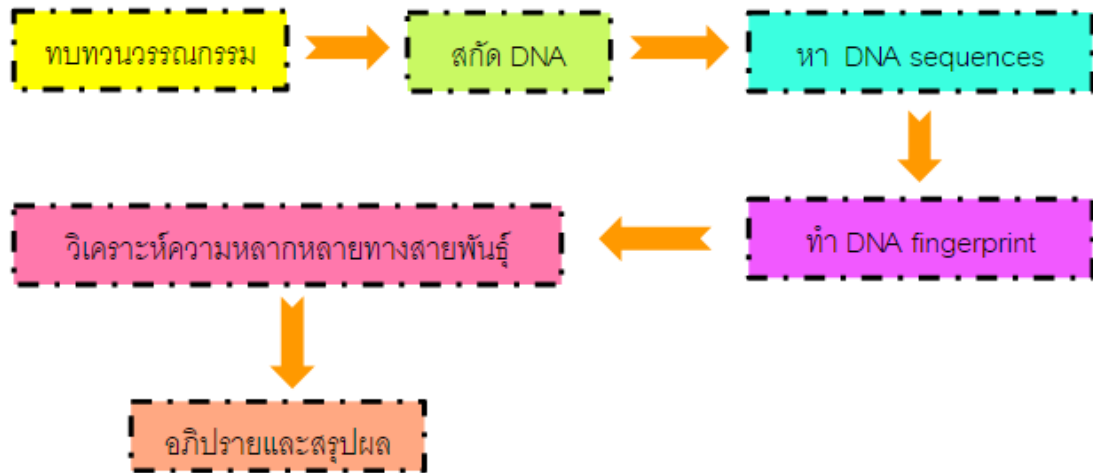


รูปที่ 1. กรอบแนวคิด

สมมติฐาน

ขลุ่ยในประเทศไทยมีมากกว่า 1 ซับสปีชีส์ (subspecies)

กรอบการทำงาน



รูปที่ 2. กรอบการทำงาน

นิยามศัพท์

1. สายพันธุ์ (Cultivar)(20)

คือ ลำดับที่ใช้เรียกพืชที่ได้มาจากการผสมหรือคัดเลือกพันธุ์เพื่อการเพาะปลูก

2. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting)

คือ แบบแผนของดีเอ็นเอที่ใช้บ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต เปรียบเสมือนลายนิ้วมือของแต่ละบุคคล

3. ITS (Internal transcribed spacer)

คือ spacer DNA มีลำดับเบสสั้นๆ ที่ไม่ซ้ำกัน สามารถถอดรหัสได้แต่ไม่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเป็นส่วนที่นิยมใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช เนื่องจากมีส่วนอนุรักษ์และสามารถใช้ universal primers จับได้ ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับ subspecies ได้

4. Microsatellite

ลำดับเบสที่เรียงตัวกันอย่างมีรูปแบบซ้ำๆ อย่างต่อเนื่องซึ่งในแต่ละชุดซ้ำอาจประกอบไปด้วยเบสตั้งแต่ 1-6 เบส ซึ่งลำดับเบสแบบ microsatellite นี้สามารถพบได้ทั่วทั้งจีโนมดีเอ็นเอ สามารถเรียกลำดับเบสแบบ microsatellite ว่า simple sequence repeat (SSR)

5. ISSR technique (Inter simple sequence repeat)

เป็นวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์วิธีหนึ่ง ซึ่งใช้เทคนิค PCR เป็นพื้นฐาน ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ทบทวนวรรณกรรม

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ขลุ่ (*Pluchea indica* (L.) Less.) เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae หรือ Compositae ขลุ่สามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมป่าชายเลน หรือบริเวณพื้นที่ดินเค็ม พบได้ในหลายประเทศ เช่น ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย จีน ออสเตรเลีย ใต้หวัน ญี่ปุ่น สิงคโปร์ อินเดีย(21) เป็นต้น ขลุ่จัดอยู่ในประเภทไม้พุ่ม เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ลักษณะใบของขลุ่ ก้านใบสั้น ผิวใบเรียบมีขนอ่อนๆปกคลุมรูปไข่กลับหัว ขอบใบหยัก และปลายใบมนกว้าง 1-5 เซนติเมตร ยาว 2.5-10 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อ สีขาวนวลหรือสีม่วง กลีบดอกแบ่งเป็นวงนอกและวงใน กลีบดอกวงนอกยาวประมาณ 3-3.5 มิลลิเมตร กลีบดอกวงในยาวประมาณ 4-6 มิลลิเมตร (3, 21)



รูปที่ 3. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของขลุ่

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. Autopipettes (บริษัท Thermo Fisher Scientific Inc; USA)
2. Centrifuge รุ่น MPW-260R (บริษัท MPW; USA)
3. Convenient Weighing รุ่น Quintix[®] (บริษัท Sartorius; Germany)
4. DNeasy[®] Plant Mini Kit (บริษัท QIAGEN; Germany)
5. Dry bath incubator รุ่น TT-100-DHC (บริษัท Hercuvan; USA)
6. Ice box
7. Intelligent Electrophoresis System for Nucleic Acid Applications (บริษัท Cosmo Bio; USA)
8. Microcentrifuge tubes 1.5 ml (บริษัท Thermo Fisher Scientific Inc; USA)
9. MultiGene Thermal Cycler รุ่น TC9610-230 (บริษัท Meditop; Hungary)
10. Thermal Cycler MultiGene™ OptiMax รุ่น 115V model (บริษัท Labnet; USA)
11. TissueRuptor (บริษัท QIAGEN; Germany)
12. Qubit assay Kits (บริษัท Thermo Fisher Scientific Inc; USA)

1.2 สารเคมี

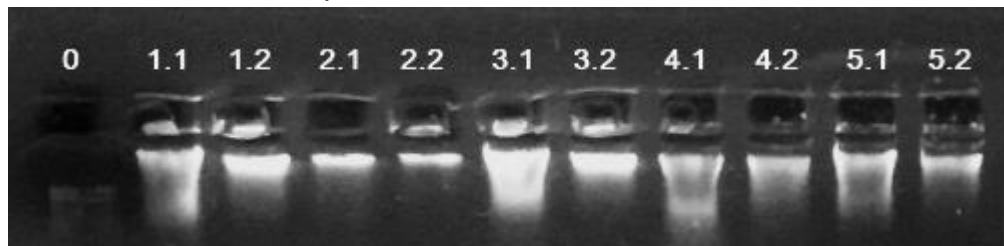
1. Agarose molecular grade (บริษัท Invitrogen; USA)
2. Deionize water
3. DNeasy[®] Plant Mini Kit (บริษัท QIAGEN; Germany)
4. Ethanol absolute (บริษัท Scharlau; Spain)
5. Forward primer (18sF) = 5'-GAA CCT TAT CGT TTA GAG GAA GG-3'
6. GeneDireX[®] Novel Juice (บริษัท Genedirex; Taiwan)
7. GeneDireX[®] OneMARK B (บริษัท Genedirex; Taiwan)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

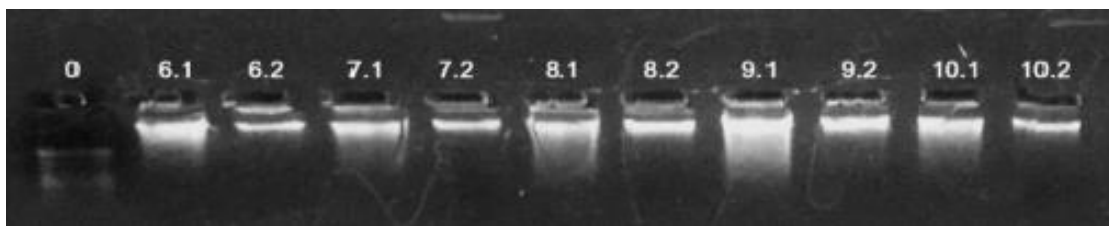
1. การสกัดดีเอ็นเอ

1.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยชุดเครื่องมือ DNeasy® Plant Mini Kit



รูปที่ 9. ผลการทดสอบของดีเอ็นเอพืชที่สกัดได้

0=DNA Ladder, 1.1= นนทบุรี การชะครั้งที่ 1, 1.2= นนทบุรี การชะครั้งที่ 2,
 2.1= ประจวบคีรีขันธ์ การชะครั้งที่ 1, 2.2= ประจวบคีรีขันธ์ การชะครั้งที่ 2,
 3.1= ราชบุรี การชะครั้งที่ 1, 3.2= ราชบุรี การชะครั้งที่ 2,
 4.1= เพชรบุรี การชะครั้งที่ 1, 4.2= เพชรบุรี การชะครั้งที่ 2,
 5.1= สมุทรสาคร การชะครั้งที่ 1, 5.2= สมุทรสาคร การชะครั้งที่ 2



รูปที่ 10. ผลการทดสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้

0=DNA Ladder, 6.1= ระยอง การชะครั้งที่ 1, 6.2= ระยอง การชะครั้งที่ 2,
 7.1= สมุทรสงคราม การชะครั้งที่ 1, 7.2= สมุทรสงคราม การชะครั้งที่ 2,
 8.1= ฉะเชิงเทรา การชะครั้งที่ 1, 8.2= ฉะเชิงเทรา การชะครั้งที่ 2,
 9.1= ชลบุรี การชะครั้งที่ 1, 9.2= ชลบุรี การชะครั้งที่ 2,
 10.1= จันทบุรี การชะครั้งที่ 1, 10.2= จันทบุรี การชะครั้งที่ 2

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

1. การสกัดดีเอ็นเอ

1.1 การเก็บรักษาตัวอย่าง

ตัวอย่างพืชที่เก็บมานั้น ควรเก็บตัวอย่างสด เช่น ใบอ่อน ดอกอ่อน ซึ่งจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอในปริมาณที่สูง และข้อดีของการเก็บใบอ่อนคือจะได้ polysaccharides และ polyphenolics ในปริมาณน้อย จึงทำให้ง่ายในกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ การใช้ตัวอย่างแห้งที่ผ่านความร้อนจะได้คุณภาพของดีเอ็นเอที่ต่ำลง แต่อย่างไรก็ตาม หากเนื้อเยื่อพืชยังไม่ถูกนำไปใช้ในทันที ควรเก็บตัวอย่างสดที่ไม่เปียกน้ำ ไว้ที่อุณหภูมิ -30°C องศาเซลเซียส เพื่อรักษาความสดของตัวอย่างไว้สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดเครื่องมือ DNeasy Plant Mini Kit® และการวัดความเข้มข้นของ DNA ด้วยชุด Qubit assays

ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตโดยสรุปหน้าที่ของสารแต่ละชนิดได้ดังนี้ การเติม AP1 ซึ่งประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1% Sodium dodecyl sulfate(SDS), 0.1M NaCl, 1X PVP(polyvinylpyrrolidone), 10mM DTT(Dithiothreitol) ซึ่ง EDTA ทำหน้าที่ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nuclease ที่มีอยู่ในเซลล์พืช และ PVP ทำหน้าที่ดูดซับสารกลุ่มพอลิฟีนอล ซึ่งสามารถรบกวนการทำงานของเอนไซม์ polymerase และ DTT ทำหน้าที่กำจัดสารกลุ่มพอลิฟีนอลและการเติม RNase A เพื่อกำจัด RNA ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพสูง เนื่องจากในขั้นตอน PCR หากใช้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์(DNA template) ที่ไม่บริสุทธิ์กล่าวคือมี RNA ในปริมาณมาก RNA จะสามารถจับกับ Mg^{2+} ส่งผลให้ปริมาณ Mg^{2+} ลดลง ซึ่ง Mg^{2+} นั้นทำหน้าที่เป็น co-factor ที่จำเป็นสำหรับการทำงานของและความถูกต้อง(fidelity) ของ polymerase รวมถึงมีผลต่อ primer annealing, ความจำเพาะของการทำ PCR และการเกิด primer-dimer ทำให้ส่งผลถึงประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR ลดลง(30) นำสารผสมไปบ่ม (Incubate) เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 65°C องศาเซลเซียส เพื่อให้ RNase A ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ P3 ซึ่งบัฟเฟอร์ P3 คือ 3.0 M potassium acetate, pH 5.5 โดย potassium acetate จะเกิดการแลกเปลี่ยนประจุกับ SDS ได้เป็น potassium dodecyl

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

Herbarium specimen



JAM-004

Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University

ชื่อพฤกษศาสตร์ *Pluchea indica* (L.) Less. ชื่อวงศ์ Asteraceae

ชื่อท้องถิ่น หนวดวัว หนวดวัว หนวดวัว (อุดรธานี) เพี้ยฟาน (ตะวันออกเฉียงเหนือ) ชล. คล. (ใต้) ขี้ป่าน (แม่ฮ่องสอน)

สถานที่เก็บ ต.ปากน้ำปรานอ.ปรานบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ วัน เดือน ปี ที่เก็บ 29/07/59

ลักษณะเพิ่มเติม ไม้พุ่มขนาดเล็กสูง 1-2 เมตร ลำต้นกลมสีน้ำตาลแดงใบเดี่ยว ออกแบบสลับรูปไข่กลับ กว้าง 1-5

เซนติเมตร ยาว 2.5-10 เซนติเมตร ปลายใบมน โดยรอบมีขนขาวๆปกคลุม ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอดหรือตามซอกใบ

รูปกลม หลากๆ ซ่อมารวมกัน

ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง กรวิษฐ์ ช่างดาภากุล

รูปที่ 1. *Pluchea indica* จังหวัดประจวบคีรีขันธ์



JAM-005

Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University

ชื่อพฤกษศาสตร์ *Pluchea indica* (L.) Less ชื่อวงศ์ Asteraceae

ชื่อท้องถิ่น หนวดงัว หนวดงัว หนวดงัว (อุตรธานี) เพี้ยฟาน (ตะวันออกเฉียงเหนือ) ชลฺ คุลฺ (ใต้) ขี้ป่าน (แม่ฮ่องสอน)

สถานที่เก็บ 1016 ต. ปีกเตียน อ. ท่าช้าง จ. เพชรบุรี วัน เดือน ปี ที่เก็บ 29/07/59

ลักษณะเพิ่มเติม ไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-2 เมตร ลำต้นกลม สีน้ำตาลแดง ใบเดี่ยว ออกแบบสลับ รูปไข่กลับ กว้าง 1-5

เซนติเมตร ยาว 2.5-10 เซนติเมตร ปลายใบมน โคนใบสอบ มีขนขาวๆ ปกคลุม ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด หรือตามซอกใบ รูปกลม หลากหลายสีรวมกัน

ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง กรวิญญ์ ช้องดารากุล

รูปที่ 2. *Pluchea indica* จังหวัดเพชรบุรี



JAM-006

Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University

ชื่อพฤกษศาสตร์: *Pluchea indica* (L.) Less. ชื่อวงศ์: Asteraceae

ชื่อท้องถิ่น: หนวดงัว, หนวดงัว, หนวดงัว (อุตรดิตถ์), เพี้ยฟาน (สระบุรี), หนวดงัว (เชียงใหม่), ชล. คล. ได้, ขึ้นบ้าน (แม่ฮ่องสอน)

สถานที่เก็บ: ต. บางกระสัง อ. เมือง จ. นนทบุรี วันที่เก็บ: 07/08/59

ลักษณะเพิ่มเติม: ไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-2 เมตร ลำต้นกลมสีน้ำตาลแดง ใบเดี่ยว ออกแบบสลับรูปไข่กลับ กว้าง 1-5 เซนติเมตร ยาว 2.5-10 เซนติเมตร ปลายใบมน โดยรอบมีขนขาวๆ ปกคลุม ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด หรือตามซอกใบ รูปกลม หลวมๆ ซ่อมารวมกัน

ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง: ธนวัฒน์ บรรณวัฒน์

รูปที่ 3. *Pluchea indica* จังหวัดนนทบุรี



JAM-007

Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University

ชื่อพฤกษศาสตร์ *Pluchea indica* (L.) Less. ชื่อวงศ์ Asteraceae

ชื่อท้องถิ่น หนวดจ้าว หนวดจ้าว หนวดจ้าว (อุตรธานี) เพี้ยฟาน (ตะวันออกเฉียงเหนือ) ชล. คล. ได้. ขี้ปวน (แม่ฮ่องสอน)

สถานที่เก็บ ทางหลวงสายเอเชียหมายเลข 2 ต.ดอนทราย อ.ปากท่อ จ.ราชบุรี วันที่เก็บ 30/07/59

ลักษณะเพิ่มเติม ไม้พุ่มขนาดเล็กสูง 1-2 เมตร ลำต้นกลมสีน้ำตาลแดงในเดี่ยว ออกแบบสลับรูปไข่กลับ กว้าง 1-5 เซนติเมตร ยาว 2.5-10 เซนติเมตร ปลายใบมน โดยรอบมีขนขาวๆปกคลุม ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด หรือตามซอกใบ รูปกลม หลากหลายมารวมกัน

ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง กรวิทย์ ช้องดารากุล

รูปที่ 4. *Pluchea indica* จังหวัดราชบุรี



JAM-009

Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University

ชื่อพฤกษศาสตร์ *Pluchea indica* (L.) Less. ชื่อวงศ์ Asteraceae

ชื่อท้องถิ่น หนวดวัว หนวดวัว (อุดรธานี) เพี้ยฟาน (ตะวันออกเฉียงเหนือ) ชล. คล. ได้. ขี้ปวน (แม่ฮ่องสอน)

สถานที่เก็บ อ.สุขุมวิท ต.ท่าข้าม อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา วันที่เก็บ 06/08/59

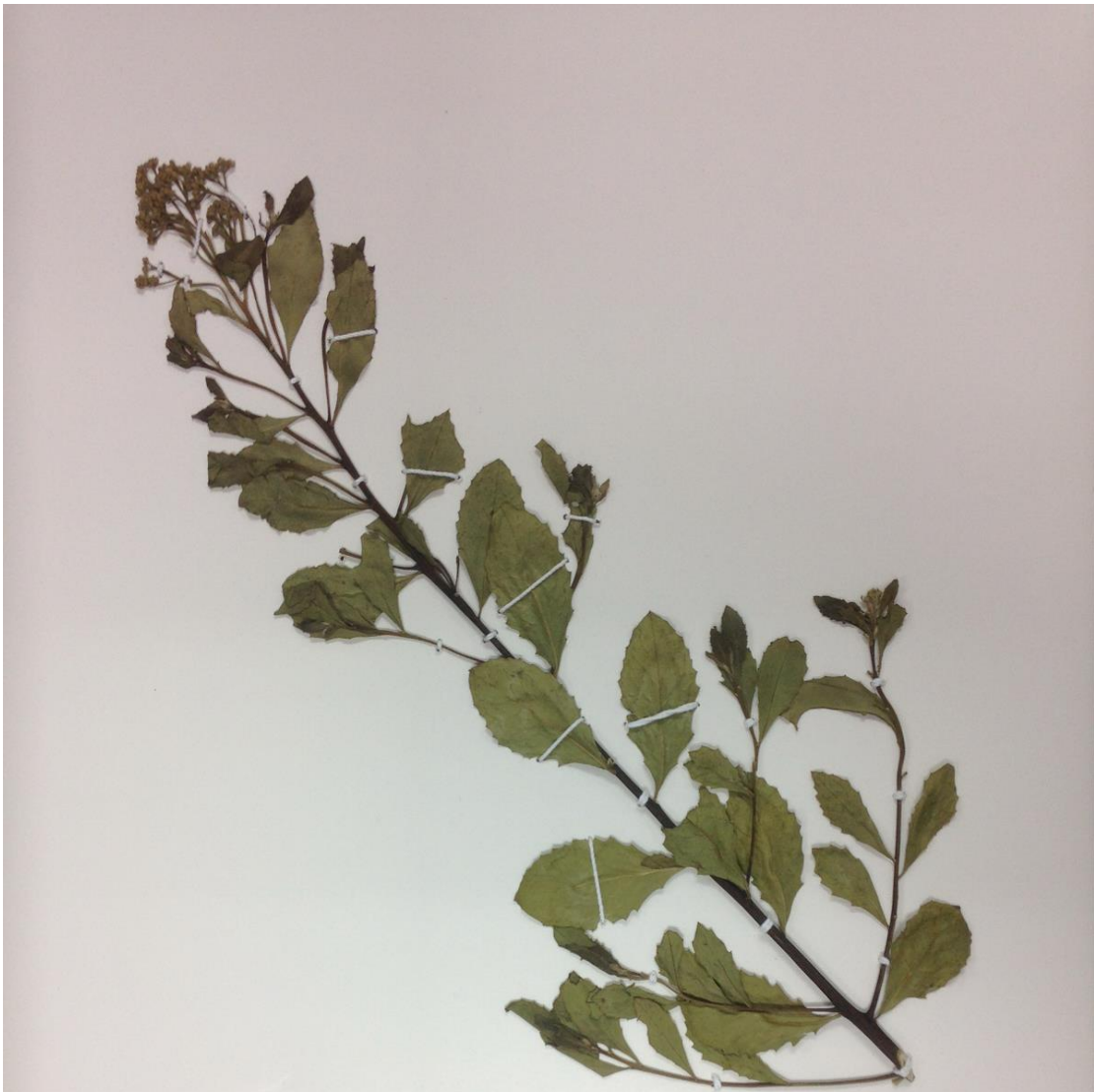
ลักษณะเพิ่มเติม ไม้พุ่มขนาดเล็กสูง 1-2 เมตร ลำต้นกลมสีน้ำตาลแดงในเดี่ยว ออกแบบสลับรูปไข่กลับ กว้าง 1-5 เซนติเมตร ยาว 2.5-10 เซนติเมตร ปลายใบมน โดยรอบมีขนขาวๆปกคลุม ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด หรือตามซอกใบ รูปกลม หลวมๆ ร่มรวมกัน

ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ธีรชนิต คุ้มฮั่น

รูปที่ 5. *Pluchea indica* จังหวัดฉะเชิงเทรา



รูปที่ 6. *Pluchea indica* จังหวัดจันทบุรี



JAM-011

Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University

ชื่อพฤกษศาสตร์ *Pluchea indica* (L.) Less. ชื่อวงศ์ Asteraceae

ชื่อท้องถิ่น หนวดงัว หนวดงัว หนวดงัว (อุตรธานี) เพี้ยพาน (ตะวันออกเฉียงเหนือ) ชลฺ คุลฺ (ใต้) ขี้ป่าน (แม่ฮ่องสอน)

สถานที่เก็บ ถ.ข้าวหลาม ต.บ้านปึก อ.เมืองชลบุรี จ.ชลบุรี วัน เดือน ปี ที่เก็บ 08/08/59

ลักษณะเพิ่มเติม ไม้พุ่มขนาดเล็กสูง 1-2 เมตร ลำต้นกลมสีน้ำตาลแดง ใบเดี่ยว ออกแบบสลับรูปไข่กลับ กว้าง 1-5

เซนติเมตร ยาว 2.5-10 เซนติเมตร ปลายใบมน โดยรอบมีขนขาวๆปกคลุม ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด หรือตามซอกใบ รูปกลม หลากๆ ซ่อมารวมกัน

ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ธนวัฒน์ บรรณวัฒน์

รูปที่ 7. *Pluchea indica* จังหวัดชลบุรี



JAM-013

Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University

ชื่อพฤกษศาสตร์ *Pluchea indica* (L.) Less. ชื่อวงศ์ Asteraceae

ชื่อท้องถิ่น หนวดงัว หนวดงัว หนวดงัว (อุตรธานี) เพี้ยพาน (ตะวันออกเฉียงเหนือ) ชล. คล. (ใต้) ขี้ป่าน (แม่ฮ่องสอน)

สถานที่เก็บ ถ.สายธนูบุรี ปากท่อ ต.บางกระเจ้า อ.เมือง จ.สมุทรสาคร วัน เดือน ปี ที่เก็บ 29/07/59

ลักษณะเพิ่มเติม ไม้พุ่มขนาดเล็กสูง 1-2 เมตร ลำต้นกลมสีน้ำตาลแดง ใบเดี่ยว ออกแบบสลับรูปไข่กลับ กว้าง 1-5 เซนติเมตร ยาว 2.5-10 เซนติเมตร ปลายใบมน โดยรอบมีขนขาวๆ ปกคลุม ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด หรือตามซอกใบ รูปกลม หลายๆ ช่อมารวมกัน

ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ธีรชนิต คุ่มฮั่น

รูปที่ 8. *Pluchea indica* จังหวัดสมุทรสาคร



รูปที่ 9. *Pluchea indica* จังหวัดระยอง

ภาคผนวก ข

การบันทึกข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ *Pluchea indica* ลงบนฐานข้อมูล
ของ Genbank DDBJ

1. *Pluchea indica* : จันทบุรี

ACCESSION LC194195

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..569
	/country="Thailand: Samutsakorn"
	/db_xref="taxon:175518"
	/isolate="Samutsakorn"
	/mol_type="genomic DNA"
	/organism="Pluchea indica"
rRNA	<1
	/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA	2..256
	/note="internal transcribed spacer 1"
rRNA	257..420
	/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA	421..>569
	/note="internal transcribed spacer 2"

ORIGIN

```

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgtgattt gccatccacg gttcccttg
121 gggctcctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccccg gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaagggtt tatgccatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcacgatg
301 aagaacgtag caaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 ttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg

```

421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggagg ggcggatatt
481 ggtctcccg tcttatgga tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtggagg tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgt ttagccgtg aggaaggca
601 acacaaaaa ccacaacgtg tcgtcttg acgatgctt gaccgacg ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagtt aagcatatca ataag

//

2. *Pluchea indica* : ฟ้าลั่น

ACCESSION LC194196

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..695

 /country="Thailand: Chonburi"

 /db_xref="taxon:175518"

 /isolate="Chonburi"

 /mol_type="genomic DNA"

 /organism="Pluchea indica"

rRNA <1

 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 2..256

 /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA 257..420

 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 421..644

 /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA 645..>695

 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg

61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggggcc ttgttgattt gccatccacg gttcccttg

121 gggtctcctg ggcgtaaat caacacaaca acaaaccgac gcacggcatg tgccaaggag

181 aacttaactt aagaagggtt tatgcatgc caccacgttc gcatggtgtg gcatgacatg

241 tggcttcttt gtaacaaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggtcga cgcatcgatg

301 aagaacgtag caaaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtaga ccatcgagtt

361 ttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg

421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcctt tacggggata cacggggtgg ggcggatatt

481 gggtcccggt tcttatggtg tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

541 aagtgggtgtg tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg aggaaggca

601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtctgtg acgatgctc gaccgacacc ccaggtcagg

661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

//

3. *Pluchea indica* : นครราชสีมา

ACCESSION LC194197

FEATURES Location/Qualifiers

```

source          1..695
                /country="Thailand: Nakhonratchasima"
                /db_xref="taxon:175518"
                /isolate="Nakhonratchasima"
                /mol_type="genomic DNA"
                /organism="Pluchea indica"

rRNA            <1
                /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA        2..256
                /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA            257..420
                /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA        421..644
                /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA            645..>695
                /product="26S ribosomal RNA"

```

ORIGIN

```

1  gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61  gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttcccttgg
121 gggtctcctg ggcgtaaata caacacaaca acaaaccgag gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt agaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatgggtgt gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggtcca cgcatcgatg
301 aagaacgtag caaaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 ttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacgggggtg ggcggatatt
481 ggctcccggt tcttatggtg tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

```

541 aagtgggtgtg tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg aggaaggca

601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtctgtg acgatgctc gaccgacacc ccaggcagg

661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

//

4. *Pluchea indica* : นนทบุรี

ACCESSION LC194198

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..695

 /country="Thailand: Nonthaburi"

 /db_xref="taxon:175518"

 /isolate="Nonthaburi"

 /mol_type="genomic DNA"

 /organism="Pluchea indica"

rRNA <1

 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 2..256

 /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA 257..420

 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 421..644

 /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA 645..>695

 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg

61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttcccttgg

121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccctg gcacggcatg tgccaaggag

181 aacttaactt agaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg

241 tggctctttt gtaacaaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggtca cgcatcgatg

301 aagaacgtag caaaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt

361 ttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg

421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcggatatt

481 ggtctccgt tcttatggtg tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

541 aagtgggtgtg tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg aggaaggca

601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttggt acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg

661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

//

5. *Pluchea indica* : เพชรบุรี

ACCESSION LC194199

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..695
 /country="Thailand: Petchaburi"
 /db_xref="taxon:175518"
 /isolate="Petchaburi"
 /mol_type="genomic DNA"
 /organism="Pluchea indica"

rRNA <1
 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 2..256
 /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA 257..420
 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 421..644
 /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA 645..>695
 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
 61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgtgattt gccatccacg gttcccttg
 121 gggtctcctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccgac gcacggcatg tgccaaggag
 181 aacttaactt agaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
 241 tggctcttt gtaacaaaa acgactctg gcaacggata tctcggtca cgcacgatg
 301 aagaacgtag caaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtaga ccatcgagtt
 361 ttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct ggcggtcacg
 421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcgatatt
 481 ggtctccgt tctatggtg tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

541 aagtgggtgtg tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg aggaaggca

601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtctgtg acgatgctc gaccgacacc ccaggcagg

661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

//

6. *Pluchea indica* : ญี่เก็ด

ACCESSION LC194200

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..695
 /country="Thailand: Phuket"
 /db_xref="taxon:175518"
 /isolate="Phuket"
 /mol_type="genomic DNA"
 /organism="Pluchea indica"

rRNA <1
 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 2..256
 /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA 257..420
 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 421..644
 /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA 645..>695
 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
 61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttcccttg
 121 gggtctcctg ggcgtaaat caacacaaca acaaaccgac gcacggcatg tgccaaggag
 181 aacttaactt agaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
 241 tggctcttt gtaacaaaa acgactctg gcaacggata tctcggtca cgcacgatg
 301 aagaacgtag caaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtaa ccatcgagtt
 361 ttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
 421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcgatatt
 481 gggtcccggt tctatggtg tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

541 aagtgggtgt tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg aggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttggt acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

//

7. *Pluchea indica* : ประจวบคีรีขันธ์

ACCESSION LC194201

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..695
 /country="Thailand: Prajuabkeereekhan"
 /db_xref="taxon:175518"
 /isolate="Prajuabkeereekhan"
 /mol_type="genomic DNA"
 /organism="Pluchea indica"

rRNA <1
 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 2..256
 /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA 257..420
 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 421..644
 /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA 645..>695
 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
 61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgtgattt gccatccacg gttcccttg
 121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccgac gcacggcatg tgccaaggag
 181 aacttaactt agaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
 241 tggctcttt gtaacaaaa acgactctg gcaacggata tctcggtca cgcatcgatg
 301 aagaacgtag caaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtaga ccatcgagtt
 361 ttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
 421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcgatatt
 481 ggtctccgt tctatggtg tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

541 aagtgggtgt tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg aggaaggca

601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttggt acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg

661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

//

8. *Pluchea indica* : ราชบุรี

ACCESSION LC194202

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..695

 /country="Thailand: Ratchaburi"

 /db_xref="taxon:175518"

 /isolate="Ratchaburi"

 /mol_type="genomic DNA"

 /organism="Pluchea indica"

rRNA <1

 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 2..256

 /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA 257..420

 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 421..644

 /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA 645..>695

 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg

61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg

121 gggtctcctg ggcgtaaata caacacaaca acaaaccgag gcacggcatg tgccaaggag

181 aacttaactt agaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg

241 tggcttcttt gtaacaaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggtcga cgcatcgatg

301 aagaacgtag caaaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt

361 ttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg

421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcggatatt

481 gggtcccggt tcttatggtg tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

541 aagtgggtggg tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg aggaaggca

601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttggt acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg

661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

//

9. *Pluchea indica* : ฝรั่ง

ACCESSION LC194203

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..695

 /country="Thailand: Rayong"

 /db_xref="taxon:175518"

 /isolate="Rayong"

 /mol_type="genomic DNA"

 /organism="Pluchea indica"

rRNA <1

 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 2..256

 /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA 257..420

 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 421..644

 /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA 645..>695

 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg

61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttcccttg

121 gggtctcctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccccg gcacggcatg tgccaaggag

181 aacttaactt agaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg

241 tggcttctt gtaacaaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggtca cgcacgatg

301 aagaacgtag caaaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtaga ccatcgagtt

361 ttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct ggcggtcacg

421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcgatatt

481 ggtctccgt tcttatgga tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

541 aagtgggtgtg tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg agggaaggca

601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttggt acgatgcttc gaccgcgacc ccaggtcagg

661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

//

10. *Pluchea indica* : สมุนไพรสาคร

ACCESSION LC194204

FEATURES Location/Qualifiers

```

source          1..569
                /country="Thailand: Samutsakorn"
                /db_xref="taxon:175518"
                /isolate="Samutsakorn"
                /mol_type="genomic DNA"
                /organism="Pluchea indica"

rRNA            <1
                /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA        2..256
                /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA            257..420
                /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA        421..>569
                /note="internal transcribed spacer 2"

```

ORIGIN

```

1  gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61  gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgttgatt gccatccacg gttcccttg
121 gggtctcctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccccg gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaagggct tatgccatgc caccacgttc gcgatgggtg gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcacgatg
301 aagaacgtag caaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 ttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcggatatt
481 ggctccccgt tcttatgga tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtgt tgactaaacc ttgtctcg

```

//

11. *Pluchea indica* : สมุนไพรสงคราม

ACCESSION LC194205

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..647
 /country="Thailand: Samutsongkhram"
 /db_xref="taxon:175518"
 /isolate="Samutsongkhram"
 /mol_type="genomic DNA"
 /organism="Pluchea indica"

rRNA <1
 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 2..256
 /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA 257..420
 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 421..644
 /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA 645..>647
 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
 61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttcccttg
 121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccgac gcacggcatg tgccaaggag
 181 aacttaactt agaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
 241 tggcttctt gtaacaaaa acgactctg gcaacggata tctcggtca cgcacgatg
 301 aagaacgtg caaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
 361 ttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
 421 tattgcgtc cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtg ggcgatatt
 481 ggtctccgt tctatgga tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

541 aagtgggtgt tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg agggaaggca

601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgtg acgatgcttc gaccgcg

//

12. *Pluchea indica* : ผักคันทลิง

ACCESSION LC194206

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..695
 /country="Thailand: Songkla"
 /db_xref="taxon:175518"
 /isolate="Songkhla"
 /mol_type="genomic DNA"
 /organism="Pluchea indica"

rRNA <1
 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 2..256
 /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA 257..420
 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 421..644
 /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA 645..>695
 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
 61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
 121 gggtctcctg ggcgtaaata caacacaaca acaaaccgac gcacggcatg tgccaaggag
 181 aacttaactt aagaagggtt tatgcatgc caccacgttc gcatggtgtg gcatgacatg
 241 tggcttcttt gtaacaaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggtcca cgcatcgatg
 301 aagaacgtag caaaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
 361 ttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
 421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcctt tacggggata cacggggtgg ggcggatatt
 481 ggctcccggt tcttatggtg tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

541 aagtgggtgtg tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg aggaaggca

601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtctgtg acgatgctc gaccgacacc ccaggcagg

661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

//

13. *Pluchea indica* : ผักขมไทย

ACCESSION LC194207

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..695

 /country="Thailand: Suratthani"

 /db_xref="taxon:175518"

 /isolate="Suratthani"

 /mol_type="genomic DNA"

 /organism="Pluchea indica"

rRNA <1

 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 2..256

 /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA 257..420

 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 421..644

 /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA 645..>695

 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg

61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttcccttg

121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccccg gcacggcatg tgccaaggag

181 aacttaactt agaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg

241 tggctctttt gtaacaaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggtca cgcatcgatg

301 aagaacgtag caaaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt

361 ttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg

421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcgatatt

481 ggtctccgt tcttatgga tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

541 aagtgggtgt tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg aggaaggca

601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttggt acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg

661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

//

14. *Pluchea indica* : ตะไคร้ไทย

ACCESSION LC196166

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..695

 /country="Thailand"

 /db_xref="taxon:175518"

 /isolate="Chachoengsao"

 /mol_type="genomic DNA"

 /organism="Pluchea indica"

rRNA <1

 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 2..256

 /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA 257..420

 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 421..644

 /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA 645..>695

 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg

61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtgggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg

121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccccg gcacggcatg tgccaaggag

181 aacttaactt agaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg

241 tggcttcttt gtaacaaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggtca cgcacgatg

301 aagaacgtag caaaatgcga tacttgggtg gaattgcaga atcccgtaga ccatcgagtt

361 ttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg

421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcggatatt

481 ggtctccgt tcttatgga tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

541 aagtgggtgtg tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg aggaaggca

601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtctgtg acgatgctc gaccgacacc ccaggcagg

661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

//

15. *Pluchea indica* : ชูตรวัดดิษฐ์

ACCESSION LC196167

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..695
 /country="Thailand"
 /db_xref="taxon:175518"
 /isolate="Uttaradit"
 /mol_type="genomic DNA"
 /organism="Pluchea indica"

rRNA <1
 /product="18S ribosomal RNA"

misc_RNA 2..256
 /note="internal transcribed spacer 1"

rRNA 257..420
 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc_RNA 421..644
 /note="internal transcribed spacer 2"

rRNA 645..>695
 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

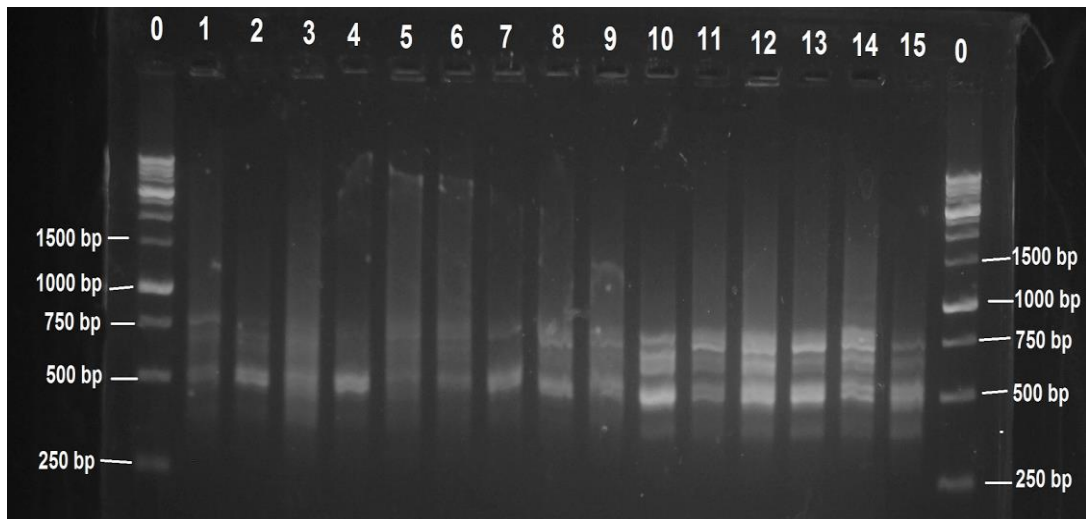
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
 61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtgggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
 121 gggtctcctg ggcgtaaata caacacaaca acaaaccctg gcacggcatg tgccaaggag
 181 aacttaactt agaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
 241 tggctctttt gtaacaaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggtca cgcacgatg
 301 aagaacgtag caaaatgcga tacttgggtg gaattgcaga atcccgtaga ccatcgagtt
 361 ttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
 421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcctt tacggggata cacgggggtg ggcggatatt
 481 gggtccctgt tcttatggtg tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac

541 aagtgggtgtg tgactaaacc ttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg aggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgat acgatgcttc gaccgacacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

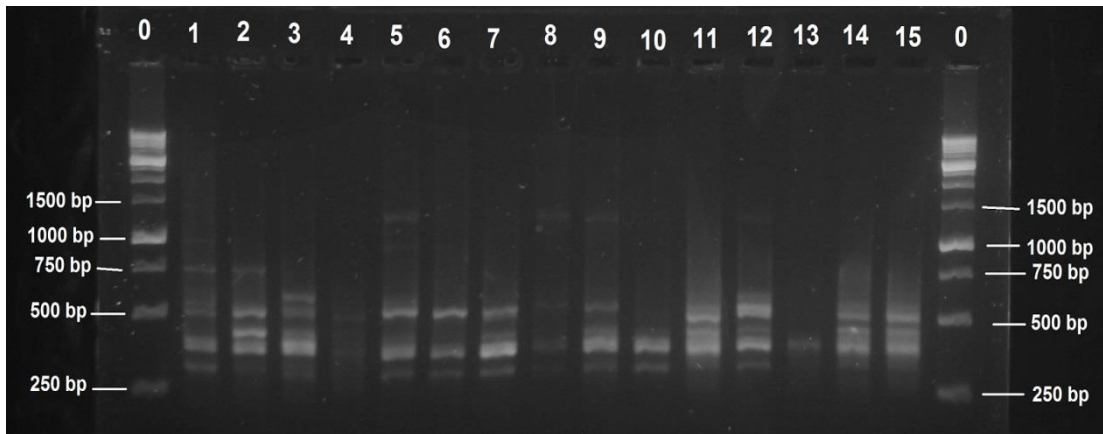
//

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของ *Pluchea indica* ด้วยเทคนิค ISSR



รูปที่ 1. แถบดีเอ็นเอของ *Pluchea indica* จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR โดยการใช้ primer ISSR1; แถบที่ 0=DNA Ladder, 1= ภูเก็ต 2= สุราษฎร์ธานี 3= นครราชสีมา 4= ประจวบคีรีขันธ์ 5=เพชรบุรี 6= นนทบุรี 7= ราชบุรี 8= สงขลา 9= ฉะเชิงเทรา 10= จันทบุรี 11= ชลบุรี 12= สมุทรสงคราม 13= สมุทรสาคร 14= ระยอง 15= อุตรดิตถ์



รูปที่ 2. แถบดีเอ็นเอของ *Pluchea indica* จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ primer ISSR2 ; แถบที่ 0=DNA Ladder, 1= ภูเก็ต 2= สุราษฎร์ธานี 3= นครราชสีมา 4= ประจวบคีรีขันธ์ 5=เพชรบุรี 6= นนทบุรี 7= ราชบุรี 8= สงขลา 9= ฉะเชิงเทรา 10= จันทบุรี 11= ชลบุรี 12= สมุทรสงคราม 13= สมุทรสาคร 14= ระยอง 15= อุตรดิตถ์

ตารางที่ 1 การนับแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR ของกลุ่มและฟังก์ชันดอกซอกที่เพิ่มปริมาณด้วย primer ISSR3

แถบที่	JAM-001	JAM-002	JAM-003	JAM-004	JAM-005	JAM-006	JAM-007	JAM-008	JAM-009	JAM-010	JAM-011	JAM-012	JAM-013	JAM-014	JAM-015	JAM-016
1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
7	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
8	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 2 การนับแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR ของกลุ่มและฟังก์ชันดอกซอกที่เพิ่มปริมาณด้วย primer ISSR4

แถบที่	JAM-001	JAM-002	JAM-003	JAM-004	JAM-005	JAM-006	JAM-007	JAM-008	JAM-009	JAM-010	JAM-011	JAM-012	JAM-013	JAM-014	JAM-015	JAM-016
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
5	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
6	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
7	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 3 การนับแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR ของขลุ่ยและพังกาดอกช่อที่เพิ่มปริมาณด้วย primer ISSR8

แถบที่	JAM-001	JAM-002	JAM-003	JAM-004	JAM-005	JAM-006	JAM-007	JAM-008	JAM-009	JAM-010	JAM-011	JAM-012	JAM-013	JAM-014	JAM-015	JAM-016
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
3	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

sulfate(ไม่ละลายน้ำ) ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกับโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งไม่ละลายน้ำแล้ว ตกตะกอนออกมา(28) และการเติมบัฟเฟอร์ AW1 ซึ่งก็คือ guanidine hydrochloride ทำหน้าที่ในการสลายโปรตีน หลังจากเติมบัฟเฟอร์ AW1 อาจมีตะกอนเกิดขึ้นได้ แต่ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อขั้นตอนแต่อย่างใด และการเติม AW2 ซึ่งก็คือสารละลาย 70% ethanol ซึ่งทำหน้าที่กำจัดเกลือ(salting out) และ purified DNA และในขั้นสุดท้ายการเติม AE buffer ซึ่งประกอบด้วย 10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA; pH 9.0 การใส่ AE buffer เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ค้างอยู่บน membrane ให้ชะออกมาได้อย่างหมดจดมากขึ้น เมื่อนำสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากขลุ่ทั้ง 15 จังหวัด มาวัดหาปริมาณความเข้มข้นดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 จะพบว่าสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้ออกมาจากการชะในครั้งที่ 1 มีแนวโน้มของความเข้มข้นสูงกว่าสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้ออกมาจากการชะในครั้งที่ 2 ทั้งนี้การชะในครั้งที่ 2 นั้นเป็นการทำเพื่อให้ดีเอ็นเอที่อาจหลงเหลืออยู่บน membrane ชะออกมาให้หมด ดังนั้นจึงพิจารณานำสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้ออกมาจากการชะในครั้งที่ 1 ไปทำการศึกษาต่อไป และยังพบอีกว่าความเข้มข้นของสารสกัดดีเอ็นเอของขลุ่ในจังหวัดอุดรดิตถ์มีปริมาณความเข้มข้นต่ำที่สุดจากในสารสกัดดีเอ็นเอของขลุ่ทั้ง 15 จังหวัด สาเหตุอันเนื่องมาจากตัวอย่างที่นำมาสกัดนั้นเป็นตัวอย่างแห้ง ซึ่งจะมีปริมาณของดีเอ็นเอหลงเหลืออยู่น้อยกว่าหากเทียบกับตัวอย่างสด เพราะดีเอ็นเอที่อยู่ในตัวอย่างแห้งจะถูกทำลายไปหลังจากผ่านความร้อนของกระบวนการทำให้แห้ง และเอนไซม์ที่มาจากเซลล์เนื้อเยื่อของพืชเอง นอกจากนี้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาสกัดดีเอ็นเอยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ซึ่งชิ้นส่วนที่นำมาสกัดนั้นเป็นส่วนของดอกอ่อนและยอดอ่อนเป็นหลัก เนื่องจากเป็นส่วนที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอของพืชมากที่สุด เพราะเป็นส่วนที่มีกิจกรรมหลักคือการเจริญเติบโตสร้างเนื้อเยื่อและยังไม่มีกระบวนการอาหารต่างๆ เก็บไว้ในเซลล์ ทำให้นิวเคลียสที่บรรจุดีเอ็นเอของพืชยังคงมีขนาดใหญ่อยู่ ทำให้มีปริมาณของดีเอ็นเออยู่ในเซลล์ค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยของ Ng W.L. ในปี 2015 ได้แนะนำว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำ ISSR อยู่ในช่วง 10-50 ng/μl(32) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการเพิ่มปริมาณแม่แบบในตัวอย่างบางจังหวัดที่มีปริมาณความเข้มข้นต่ำๆ เพื่อให้ได้ผลผลิต PCR เกิดขึ้น

2. การตรวจสอบคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Gel electrophoresis

ความเข้มข้นทั่วไปของอะกาโรสที่นิยมใช้คือ 0.8-2% ขึ้นกับขนาดของแถบดีเอ็นเอใส่บัฟเฟอร์ลงไปเพื่อช่วยให้ไอออนสนับสนุนในการนำไฟฟ้า ไม่ใช่แค่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง หากใช้น้ำแทนบัฟเฟอร์จะไม่มีเกลือที่ของดีเอ็นเอไปในเจล โดยพื้นฐานการใส่บัฟเฟอร์ที่เข้มข้น

จนเกินไปก็ไม่เป็นผลดี เพราะจะทำให้บัฟเฟอร์เกิดความร้อนได้ง่ายขึ้น(38) เมื่อนำผงอะกาโรสในสารละลายบัฟเฟอร์ไปอุ่นในเครื่องไมโครเวฟ จนผงอะกาโรสละลายจนหมดและได้สารละลายที่ใส หากสารละลายไม่ใส่ยังมีลักษณะเป็นก้อนเจลจะรบกวนการเคลื่อนที่ของ DNA ได้ และเมื่อเติมสี SYBR ซึ่ง SYBR เป็นสารเรืองแสงที่สามารถจับกับดีเอ็นเอและจะถูกกระตุ้นได้ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต(excitation) และจะปล่อยพลังงานออกมา(emission) ในรูปของแสง ดังนั้นการย้อมเจลด้วยสารเรืองแสงในลักษณะนี้ จะทำให้สังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนมากขึ้น(28) ระวังการเกิดฟองอากาศ เพราะอาจเกิดฟองอากาศ โดยฟองอากาศที่เกิดขึ้นสามารถรบกวนการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอได้ ในขั้นตอนการนำสารละลายดีเอ็นเอมาผสมสี novel juice DNA สีที่ใช้ย้อมสารละลาย ดีเอ็นเอเป็น fluorescent compound ซึ่งจะจับกับ double stranded โดยแทรกตัวอยู่ระหว่าง base pair เมื่อฉายแสง UV จะเรืองแสงทำให้มองเห็นเป็น band ของดีเอ็นเอได้ชัดเจนขึ้นและการกำหนดกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ หากใช้ความต่างศักย์สูง จะทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่เร็วขึ้นแต่แยกแถบดีเอ็นเอได้ไม่ชัดเจน และเจลจะมีความร้อนมากเกินไป ทำให้ดีเอ็นเอมีการสลายได้แต่หากกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ต่ำเกินไป ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้า แยกแถบดีเอ็นเอได้ดี แต่จะเกิดการแพร่ของดีเอ็นเอส่งผลให้แถบที่ได้ไม่ชัดเจน(28)

ผลการทดลองจากรูปที่ 9-12 จะเห็นได้ว่า การชะครั้งที่ 1 กับ 2 ของแต่ละจังหวัดนั้นมีลักษณะแถบดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกันทุกจังหวัดโดยการชะครั้งที่ 1 นั้นมีลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้เข้มกว่าแต่จะมี tail ส่วนการชะครั้งที่ 2 นั้นมีลักษณะแถบดีเอ็นเอเข้มน้อยกว่า แต่คมชัดมากกว่า ซึ่งเกิดจากการสกัดดีเอ็นเอนั้นจะได้จำนวนดีเอ็นเอที่มากกว่าแต่สายดีเอ็นเอบางส่วนขาดทำให้เป็นเศษดีเอ็นเอเล็กๆ เมื่อทำการชะครั้งแรกทำให้เศษดีเอ็นเอเล็กๆ ถูกชะออกมาด้วยทำให้แถบของการชะครั้งแรกมีลักษณะเป็น tail ส่วนการชะครั้งที่ 2 นั้นจะคมชัดมากกว่าเพราะเศษดีเอ็นเอเล็กๆ ถูกชะออกมาพร้อมกับการชะครั้งแรกจนหมดแล้วจึงเหลือดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันจึงเห็นแถบดีเอ็นเอที่คมชัด และพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดมาจากจังหวัดอุดรดิตถ์ จะมีแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มน้อยที่สุดเนื่องมาจากตัวอย่างที่ใช้สกัดเป็นตัวอย่างอบแห้ง ซึ่งส่งผลให้คุณภาพดีเอ็นเอต่ำ จึงเห็นแถบดีเอ็นเอจางซึ่งแตกต่างจากแถบอื่นๆ ที่ใช้ตัวอย่างสดในการสกัด และการใช้ความต่างศักย์ 35 โวลต์นาน 20 นาที เนื่องจากในขั้นตอนนี้ทำเพื่อตรวจสอบเชิงคุณภาพว่าได้สารสกัดดีเอ็นเอหรือไม่ ซึ่งไม่มีความจำเป็นจะต้องใช้เวลานานมากเพราะวัตถุประสงค์ของขั้นตอนนี้ไม่ต้องการแยกแถบดีเอ็นเอและไม่จำเป็นจะต้องใช้ความต่างศักย์สูงเพื่อให้แถบดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้รวดเร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในขั้นตอนนี้สามารถใช้ระยะเวลาสั้นกว่านี้ได้เพื่อให้เห็นแถบที่ใกล้ขึ้น และสามารถใช้ความต่างศักย์ที่สูงกว่านี้ได้เพื่อให้แถบดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น

3. การพิสูจน์สายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ่ยที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้เทคนิค PCR

3.1 การทำปฏิกิริยา PCR

Initial denaturation คือขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอ โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิประมาณ 92-95 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาโดยทั่วไปประมาณ 2-5 นาที ซึ่งในขั้นตอนนี้จะต้องแน่ใจว่า double-stranded DNA จะสามารถแยกเป็น single strands ได้อย่างสมบูรณ์ หากแยกได้ไม่สมบูรณ์จะส่งผลในการเข้าจับของ primer(40) ขั้น denaturation ใช้หลักการเดียวกับ Initial denaturation เพื่อให้เกิดการแยกสายดีเอ็นเอ โดยทั่วไปสามารถใช้เวลาอย่างน้อย 20 วินาที จะมีประสิทธิภาพในการแยกสายดีเอ็นเอ แต่สามารถเพิ่มระยะเวลาได้ตามความเหมาะสม ของอุปกรณ์ และสายของดีเอ็นเอแม่แบบ(30) ขั้น annealing ระยะเวลาที่ใช้โดยทั่วไป 30 วินาที ถึง 1 นาที และอุณหภูมิที่ใช้โดยทั่วไปคือ 45-60 องศาเซลเซียส(40) ขั้นตอนนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพและความจำเพาะในการทำ PCR โดยปัจจัยที่สำคัญคืออุณหภูมิและระยะเวลา จะต้องมีความเหมาะสม การใช้อุณหภูมิต่ำเกินไป ทำให้ความจำเพาะในการจับระหว่าง primer กับสายดีเอ็นเอแม่แบบนั้นลดลง ในขณะที่ถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้ primer จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบได้น้อยหรืออาจจะไม่จับเลย(30) ขั้น extension เป็นขั้นตอนที่ Taq DNA polymerase ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปอัตราการทำต่อสายดีเอ็นเอ ประมาณ 1 กิโลเบส/นาที(40) และในขั้นตอนสุดท้าย final extension เป็นการบ่มครั้งสุดท้ายหลัง ทำ PCR โดยทั่วไปในรอบสุดท้ายของ PCR มักใช้เวลา 5-15 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้การสร้างสาย PCR product เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จุดประสงค์หลักของขั้นตอนนี้คือ reannealing ของ PCR product กลายเป็น double-stranded DNA

3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอของขลุ่ยที่ตำแหน่ง ITS

จากงานวิจัยของ Endashaw Bekele ในปี 2007 ศึกษาลำดับเบสในตำแหน่ง ITS เพื่อใช้อธิบายความสัมพันธ์ของพืชจำนวน 5 species ในสกุล *Guizotia* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับขลุ่ย โดยใช้ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS ที่แตกต่างกันยืนยันสปีชีส์ของพืชที่เก็บมาและยังสามารถระบุได้ถึงระดับซัปสปีชีส์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS ที่แตกต่างกัน จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้(18) เมื่อทำการเพิ่มปริมาณลำดับเบสดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ด้วยเทคนิค PCR gel electrophoresis แล้ว จากรูปที่ 13 พบว่าแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างขลุ่ยที่เก็บมาทั้งหมด 15 จังหวัดนั้นขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกันทั้งหมด ที่ขนาด 750-1,000 bp เมื่อเทียบกับ marker นั้นหมายความว่าสารสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างขลุ่ยที่เก็บมาทั้ง 15 จังหวัดนั้น มีแนวโน้มว่าจะเป็นขลุ่ยเหมือนกันทั้งหมด จากการ ใช้ Forward primer (18sF) และ Reverse primer (26sR) ที่มี

ความจำเพาะในการเข้าจับกับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ซึ่งเป็น primer ที่ได้อ้างอิงมาจาก Genbank ที่มี Accession number LN607524(41) โดยนำมาอ้างอิงจากฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรมของ DNA Data Bank of Japan (DDBJ) จากนั้นจึงส่งสารไปทำ Capillary electrophoresis (CE) เพื่อหาสายลำดับเบสดีเอ็นเอที่แสดงการเรียงของเบสแต่ละตัวออกมาของแต่ละจังหวัด ซึ่งประกอบไปด้วยสายของ Forward primer 1 สาย และสายของ Reverse primer 1 สาย ดังนั้นเพื่อเป็นหลักฐานยืนยันถึงตัวอย่างพืชที่เก็บมาว่าเป็นขลุ่ยจริง จึงนำสายลำดับเบสดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ที่ตำแหน่ง 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 และ 26S ด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.2 และทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสดีเอ็นเอของขลุ่ยที่มีเลข Accession number AF429876(41) จากรูปที่ 13 เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบว่า สายลำดับเบสดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ของตัวอย่างขลุ่ยที่เก็บมาทั้ง 15 จังหวัดมีความเหมือนกันกับสายลำดับเบสที่นำมาอ้างอิงจาก Genbank ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าตัวอย่างขลุ่ยทั้ง 15 จังหวัดนั้น เป็นขลุ่ยจริงและเป็นขลุ่ยที่อยู่ใน subspecies เดียวกัน และสามารถระบุตำแหน่งต่างๆ ของลำดับเบสดีเอ็นเอได้ดังตารางที่ 4 ซึ่งในระหว่างการวิเคราะห์นั้น พบว่าสายลำดับเบสดีเอ็นเอที่มีปัญหา คือ ตัวอย่างขลุ่ยจากจังหวัดสมุทรสาคร ฉะเชิงเทรา และอุดรดิตถ์ ซึ่งสายลำดับเบสดีเอ็นเอของจังหวัดสมุทรสาครนั้น ไม่สามารถรวมสาย Forward primer และ Reverse primer ได้อย่างสมบูรณ์ เพราะมีลำดับเบสดีเอ็นเอบางส่วนในตำแหน่ง ITS2 ไม่น่าเชื่อถือทำให้ต้องตัดลำดับเบสดีเอ็นเอบางส่วนนั้นออกไป ส่วนตัวอย่างขลุ่ยจากจังหวัดฉะเชิงเทราและอุดรดิตถ์นั้นพบปัญหาที่คล้ายคลึงกันคือ ลำดับเบสดีเอ็นเอที่สาย Forward primer จะมีบางส่วนในตำแหน่ง ITS2 ที่ไม่น่าเชื่อถือเมื่อเทียบกับลำดับเบสดีเอ็นเอที่นำมาอ้างอิง แต่เมื่อมาดูลำดับเบสดีเอ็นเอที่สาย Reverse primer แล้วพบว่ามีความน่าเชื่อถือเมื่อเทียบกับลำดับเบสดีเอ็นเอที่นำมาอ้างอิง จึงสามารถแก้ไขและรวมสายลำดับเบสเข้ากันได้ โดยเมื่อนำไปเทียบรวมกับจังหวัดอื่นๆ ก็พบว่า มีลำดับเบสดีเอ็นเอที่เหมือนกันช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือได้มากขึ้นทั้งลำดับเบสในตำแหน่ง 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 และ 26S ทำให้สามารถรวมสายลำดับเบสดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์

3.3 ลำดับดีเอ็นเอของขลุ่ยที่ตำแหน่ง ITS ที่บันทึกข้อมูลลงสู่ Genbank

เมื่อสามารถยืนยันได้แล้วว่าตัวอย่างขลุ่ยทั้ง 15 จังหวัดนั้นเป็นขลุ่ยจริง และเป็นขลุ่ยที่อยู่ใน subspecies เดียวกัน พร้อมทั้งสามารถระบุตำแหน่งลำดับเบสของ 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 และ 26S ได้แล้วดังตารางที่ 4 จึงนำลำดับเบสดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ของขลุ่ยทั้ง 15 จังหวัดไปฝากไว้บน Genbank ของ DDBJ เพื่อเป็นหลักฐานแสดงยืนยันถึงการศึกษาได้ว่า ในประเทศไทยมีพืชชนิดนี้ อยู่ คือ *Pluchea indica* ซึ่งลำดับเบสดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ของตัวอย่างขลุ่ยแต่ละจังหวัดนั้น เมื่อ

ได้รับการอนุมัติจาก Genbank ให้ฝากข้อมูลได้แล้ว จะได้รับเลข Accession number กลับมาเป็นของแต่ละจังหวัด ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 4

4. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของขลุ่ยด้วยเทคนิค ISSR

4.1 การทำปฏิกิริยา PCR-ISSR

ขั้นตอนการกำหนดสภาวะที่เหมาะสมนั้นใช้หลักการเดียวกับ PCR ทั่วไป ซึ่งสามารถดูรายละเอียดได้ในการอธิบายผลการทดลองที่ 2.1 การทำปฏิกิริยา PCR ส่วนที่แตกต่างกันคือขั้น annealing โดย melting temperature (T_m) ของ primer เป็นค่าที่ควรทราบเพื่อใช้กำหนดอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้น annealing ซึ่ง T_m ของ ISSR 1 = 63.8 องศาเซลเซียส และ ISSR 2, 3, 4, 8 = 57.3 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าค่า T_m ได้เล็กน้อย และด้วยข้อจำกัดของเครื่อง thermal cycler ที่ไม่สามารถกำหนดให้ช่วงอุณหภูมิต่างกันได้เกิน 4 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับ ISSR 1 และใช้อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส สำหรับ ISSR 2, 3, 4, 8 การใช้อุณหภูมิต่ำเกินไป ทำให้การ annealing อย่างไม่จำเพาะในขณะที่ถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไป การ annealing จะเกิดขึ้นน้อยหรือไม่เกิดเลย(30)

จากงานวิจัยของ ยศินทร์ กิตติจันทโรภาส ในปี 2550 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราจำนวน 13 สายพันธุ์ซึ่งมี 6 สายพันธุ์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจเนื่องจากต้นยางแต่ละสายพันธุ์นั้นจะให้น้ำยางปริมาณที่แตกต่างกันและการปรับปรุงพันธุ์ต้องใช้ระยะเวลาหลายปีจึงมีการใช้เทคนิค ISSR มาแยกสายพันธุ์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ โดยการศึกษาที่ใช้ primers จำนวน 20 ชนิดซึ่งสามารถคัดเลือก primers เพียง 5 ชนิด สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากยางพาราทั้ง 13 สายพันธุ์ ได้จำนวน 1,112 แถบ โดยเป็น polymorphic จำนวน 789 แถบ สามารถแบ่งสายพันธุ์ยางพาราทั้ง 13 สายพันธุ์ ออกจากกันได้ และแยกพันธุ์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจออกเป็น 3 กลุ่ม(42)

จากงานวิจัยของ นภาพร แก้วดวงดี ในปี 2555 ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์มะพร้าวจำนวน 4 สายพันธุ์โดยสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR ใช้ primers 33 ชนิดซึ่งสามารถคัดเลือกไพรเมอร์เพียง 16 ชนิด ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 381 แถบ จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอมาสร้างเดนโดรแกรม พบว่าสามารถแยกมะพร้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ออกจากกันได้(43)

จากงานวิจัยของ สุทวัฒน์ สินธีรโรจน์ ในปี 2557 ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ 32 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค ISSR ใช้ primers จำนวน 57 ชนิด ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 612 แถบ เมื่อนำข้อมูลไปสร้างเป็นเดนโดรแกรม สามารถจำแนกมะละกอ 32 สายพันธุ์ออกเป็น 3 กลุ่มหลักสอดคล้องกับแหล่งกำเนิด(43)

จากการทำปฏิกิริยา ISSR-PCR ของตัวอย่างขลุ้ทั้ง 15 จังหวัดโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 ชนิดได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 25 แถบโดยไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอสูงที่สุดคือ ISSR3 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic 9 แถบ และไพรเมอร์ ISSR3 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic 8 แถบและ monomorphic 1 แถบ และไพรเมอร์ ISSR8 ซึ่งได้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic 6 แถบและ monomorphic 1 แถบ ซึ่งจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้พบว่ามี ความแตกต่างจากงานวิจัยของ Dogan Bekir ในปี 2007 ซึ่งมีการใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกันโดยศึกษาพืช *Jurinea species* ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับขลุ้(34) และเนื่องจากไพรเมอร์ ISSR1 และ ISSR2 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนจึงไม่สามารถนำมานับแถบดีเอ็นเอได้คาดว่าไพรเมอร์ ISSR1 และ ISSR2 ไม่มีความจำเพาะกับขลุ้

การทำ PCR-ISSR gel electrophoresis นั้น ได้ทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวนอย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อเป็นการทดสอบดูว่าหากทำการทดลองซ้ำแบบเดิมแล้วจะยังคงได้ผลการทดลองที่เหมือนเดิมอยู่ (reproducibility) ซึ่งจากผลของการทำ PCR-ISSR gel electrophoresis ของขลุ้จนเห็นเป็นภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอออกมาจาก primer 3 ชนิดและเมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของ primer ชนิดเดียวกันนั้น พบว่าตัวอย่างขลุ้แต่ละจังหวัดมีแถบแบนของดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นไม่เหมือนกัน นั้นแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดเดียวกัน

4.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของขลุ้โดยใช้โปรแกรมบนเว็บไซต์ <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>

หลังจากที่นับแถบดีเอ็นเอแล้วจึงวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของขลุ้โดยใช้โปรแกรมบนเว็บไซต์ genomes.urv.cat โดยค่าดัชนีความเหมือนสามารถคำนวณได้จากสูตรของ Dice(28) โดย similarity index (S.I.) = $2N_{ab}/(N_a+N_b)$ เมื่อ N_{ab} แทนจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ซ้ำกันของตัวอย่าง a และ b ส่วน N_a และ N_b แทนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดของ ตัวอย่าง a และ b ตามลำดับ และเมื่อได้ค่าดัชนีความเหมือนแล้วจึงนำไปคำนวณหาค่า distance ได้จากสูตร distance (D) = 1 - S.I. แล้วจึงนำไปสร้างเดนโดแกรม (dendrogram) พบว่าหากมีค่าดัชนีความเหมือนมากสามารถแปลผลได้ว่าขลุ้ทั้ง 2 จังหวัดนั้นมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกันมาก หากมีค่าดัชนีความเหมือนมีค่าน้อยสามารถแปลผลได้ว่าขลุ้ทั้ง 2 จังหวัดนั้นมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกันน้อย ขลุ้จากจังหวัดนครราชสีมา กับบ่อนทพูนัน มีค่าดัชนีความเหมือนสูงที่สุดคือ 0.952 และจังหวัดเพชรบุรีกับอุดรดิตถ์ที่สุดคือ 0.333 จากการคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและทำแผนภาพเดนโดแกรมพบว่าสามารถแบ่งขลุ้ทั้ง 15 จังหวัดได้เป็น 2 กลุ่มหลัก กลุ่มที่ 1 ประกอบ ด้วยจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สมุทรสาครและอุดรดิตถ์ และกลุ่มที่ 2 คือ ระยอง สงขลา เพชรบุรี จันทบุรี สมุทรสงคราม

จะเชิงเทรา สุราษฎร์ธานี ราชบุรี ชลบุรี ภูเก็ต นครราชสีมาและนนทบุรีนอกจากนี้ผู้ทำวิจัยได้นำ พังกาดอกช่อ (*Bruguiera hainesii*) มาทำ ISSR เทียบกับขลุ้เพื่อให้เห็นว่าเทคนิค ISSR สามารถแยกพืชที่ต่างชนิดกันได้ โดยผลการทดลองพบว่าค่าดัชนีความเหมือนอยู่ในช่วง 0.333-0.556 เมื่อเทียบกับขลุ้ทุกจังหวัด จากค่าดัชนีความเหมือนและแผนภาพเดนโดรแกรมแสดงให้เห็นว่าทั้งขลุ้และพังกาดอกช่อนั้นมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกันน้อย และผลการแบ่งกลุ่มทางพันธุกรรมออกเป็นสองกลุ่มซึ่งไม่สอดคล้องกับพื้นที่การเก็บตัวอย่าง ซึ่งคาดว่า การสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) จัดกลุ่มทางพันธุกรรมยังไม่น่าเชื่อถือเพียงพอ เนื่องจากมีการใช้จำนวนไพรเมอร์เพียงแค่ 3 ชนิด และได้จำนวนแถบดีเอ็นเอเพียง 25 แถบซึ่งน้อยเกินไป ซึ่งควรมีการเพิ่มจำนวนไพรเมอร์เพื่อให้เพิ่มผลความน่าเชื่อถือของการสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram)

สรุปผลการทดลอง

1. จากการทำ PCR ขลุ้ที่ตำแหน่ง ITS ที่ใช้ primer 18sF และ 26sR วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม BioEdit สามารถบอกได้ว่าขลุ้ทั้ง 15 ตัวอย่าง นั้นเป็น *Pluchea indica* ที่เป็น subspecies indica ทั้งหมด เพราะมีลำดับเบสของดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS1 5.8S และ ITS2 ตรงกับสายอ้างอิงจาก genbank จึงสามารถสรุปได้ว่าขลุ้ทั้ง 15 ตัวอย่างจาก 15 จังหวัด เป็นขลุ้สายพันธุ์เดียวคือ *Pluchea indica* subspecies indica ทั้งหมด

2. จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ้ในประเทศไทยทั้ง 15 จังหวัดด้วยเทคนิค ISSR

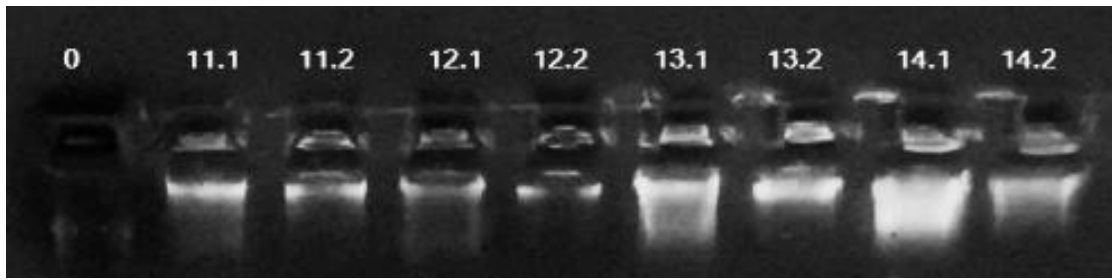
พบว่า สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ้ด้วยเทคนิค ISSR ได้ ซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ้และสามารถดูความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของขลุ้ได้ โดยข้อดีของวิธีนี้คือไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับจีโนมิกส์ดีเอ็นเอขลุ้ ทำให้ประหยัดต้นทุนในการทำวิจัย

3. จากการวิจัยพบว่าขลุ้จากจังหวัดนนทบุรีกับนครราชสีมามีค่าดัชนีความเหมือนสูงสุดคือ 0.952 หมายความว่าขลุ้ทั้ง 2 ตัวอย่างนั้นมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันในระดับสายพันธุ์ (cultivar) กันสูงสุด และจังหวัดเพชรบุรีกับอุดรธานีมีค่าดัชนีความเหมือนต่ำที่สุดคือ 0.333 หมายความว่าขลุ้ทั้ง 2 จังหวัดนั้นมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันทางสายพันธุ์กันน้อยที่สุด นอกจากนี้การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR สามารถแยกความแตกต่างของพืชต่างชนิดกันได้อีกด้วยดังตารางที่ 6 และรูปที่ 19 แสดงให้เห็นว่าพังกาและขลุ้นั้นมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแตกต่างกันอย่างชัดเจน

ข้อเสนอแนะ

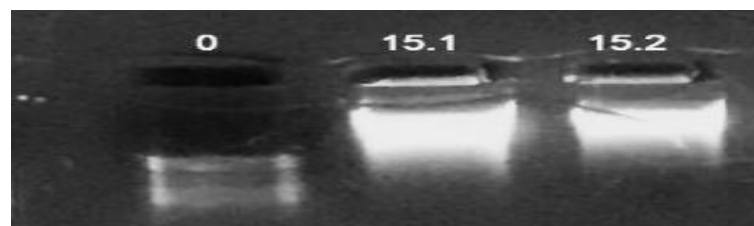
จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของตัวอย่างขลุ้ทั้ง 15 จังหวัดด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ primer จำนวน 5 ชนิด ซึ่งควรมีการศึกษาโดยเพิ่มจำนวน primer ให้มากขึ้น เพื่อเพิ่มจำนวนแถบดีเอ็นเอซึ่งคาดว่าจะสามารถแยกความหลากหลายทางสายพันธุ์ของขลุ้ได้อย่างแม่นยำมากขึ้น

เพื่อให้ครอบคลุมการศึกษาควรมีการสกัดปริมาณสารสำคัญจากใบขลุ้เพื่อนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญกับพื้นที่ เพื่อใช้ในการคัดเลือกและเพิ่มคุณค่าในการเป็นพืชเศรษฐกิจต่อไป



รูปที่ 11. ผลการทดสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้

0=DNA Ladder, 11.1= สุราษฎร์ธานี การชะครั้งที่ 1, 11.2= สุราษฎร์ธานี การชะครั้งที่ 2,
 12.1= อุดรดิตถ์ การชะครั้งที่ 1, 12.2= อุดรดิตถ์ การชะครั้งที่ 2,
 13.1= ภูเก็ต การชะครั้งที่ 1, 13.2= ภูเก็ต การชะครั้งที่ 2,
 14.1= นครราชสีมา การชะครั้งที่ 1, 14.2=นครราชสีมา การชะครั้งที่ 2



รูปที่ 12. ผลการทดสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้;

0=DNA Ladder, 15.1= สงขลา การชะครั้งที่ 1, 15.2= สงขลา การชะครั้งที่ 2,

1.2 การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยชุด Qubit® assays

ตารางที่ 3. ปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอของขลุ่จาก 15 จังหวัด

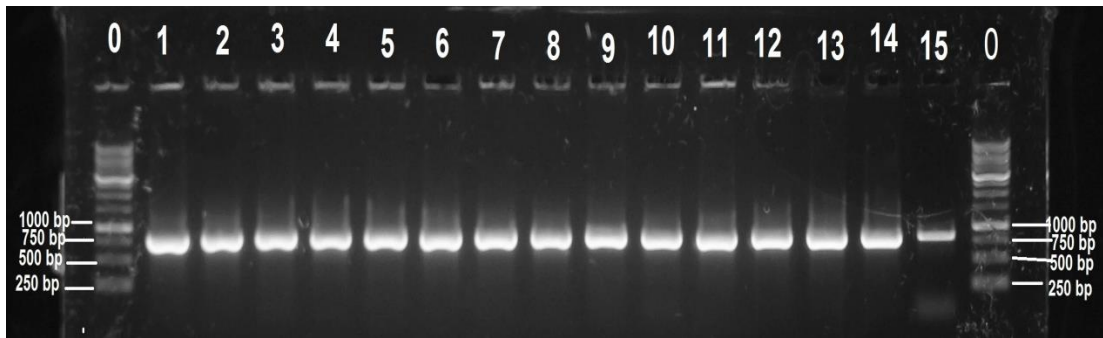
ลำดับ	จังหวัด	ปริมาณดีเอ็นเอ(μg/ml)	
		การชะครั้งที่ 1	การชะครั้งที่ 2
1	ประจวบคีรีขันธ์	18.4	14.0
2	ชลบุรี	25.1	4.29
3	นนทบุรี	25.8	23.3
4	ภูเก็ต	40.9	30.2

ลำดับ	จังหวัด	ปริมาณดีเอ็นเอ(µg/ml)	
		การชะครั้งที่ 1	การชะครั้งที่ 2
5	ราชบุรี	26.3	8.08
6	ระยอง	43.8	39.1
7	สมุทรสาคร	39.3	32.9
8	สมุทรสงคราม	24.2	14.7
9	สงขลา	25.5	19.8
10	จันทบุรี	25.4	21.1
11	นครราชสีมา	27.0	30.0
12	เพชรบุรี	45.8	39.6
13	สุราษฎร์ธานี	19.0	6.69
14	ฉะเชิงเทรา	22.0	21.4
15	อุตรดิตถ์	4.05	0.313

จากการทดสอบตัวอย่างจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (genomics DNA) ที่สกัดได้จากขลุ่ทั้ง 15 จังหวัด ซึ่งมีตัวอย่างจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ 13 จังหวัด มาจากส่วนของดอกสดและยอดอ่อนสดมาสกัด คือ ประจวบคีรีขันธ์ ชลบุรี นนทบุรี ภูเก็ต ราชบุรี ระยอง สงขลา จันทบุรี นครราชสีมา เพชรบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรสงคราม และสมุทรสาคร ส่วนอีก 2 จังหวัดนั้น คือ อุตรดิตถ์ และสุราษฎร์ธานี ใช้ส่วนของดอกแห้งและใบแห้งมาสกัดดีเอ็นเอ เมื่อนำไปวัดหาความเข้มข้นดีเอ็นเอโดยใช้ Fluorometric assay จากการทดลองพบว่า ตัวอย่างจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากแต่ละจังหวัดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.313-45.8 ng/µl แต่มีแนวโน้มว่าความเข้มข้นจากการชะครั้งที่ 1 (ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 4.05-45.8 ng/µl) จะมีความเข้มข้นสูงกว่าการ

ครั้งที่ 2 (ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.313-39.6 ng/μl) และจังหวัดที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ อุดรดิตถ์ และสุราษฎร์ธานี เนื่องจากเป็นตัวอย่างแห้ง

2. การพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ่ยที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้เทคนิค PCR



รูปที่ 13. แถบดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS ของ *Pluchea indica*

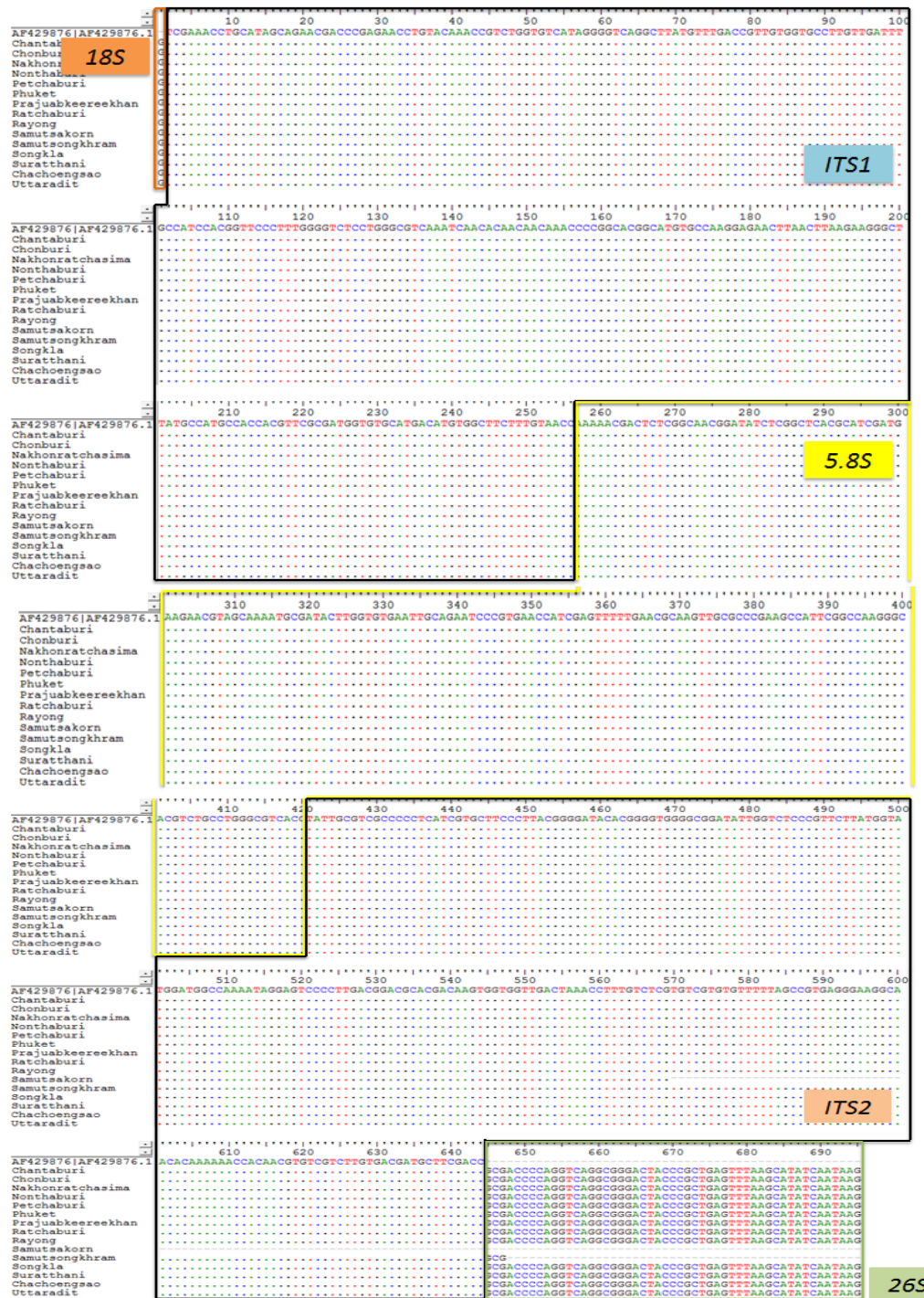
0= DNA Ladder, 1= ภูเก็ต 2= สุราษฎร์ธานี 3= นครราชสีมา
 4= ประจวบคีรีขันธ์ 5= เพชรบุรี 6= นนทบุรี 7= ราชบุรี
 8= สงขลา 9= ฉะเชิงเทรา 10= จันทบุรี 11= ชลบุรี
 12= สมุทรสงคราม 13= สมุทรสาคร 14= ระยอง 15= อุดรดิตถ์

ตารางที่ 4. ตำแหน่งดีเอ็นเอของ 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 และ 26S ที่บันทึกข้อมูลลงสู่ genbank

ลำดับ ที่	จังหวัด	ตำแหน่ง					Accession No.
		18S	ITS1	5.8S	ITS2	26S	
1	ประจวบคีรีขันธ์	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC194201
2	ชลบุรี	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC194196
3	นนทบุรี	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC194198
4	ภูเก็ต	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC194200
5	ราชบุรี	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC194202

ลำดับ ที่	จังหวัด	ตำแหน่ง					Accession No.
		18S	ITS1	5.8S	ITS2	26S	
6	ระยอง	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC194203
7	สมุทรสาคร	<1	2-256	257-420	421-569	-	LC194204
8	สมุทรสงคราม	<1	2-256	257-420	421-644	645->647	LC194205
9	สงขลา	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC194206
10	จันทบุรี	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC194195
11	นครราชสีมา	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC194197
12	เพชรบุรี	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC194199
13	สุราษฎร์ธานี	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC194207
14	ฉะเชิงเทรา	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC196166
15	อุตรดิตถ์	<1	2-256	257-420	421-644	645->695	LC196167

ผลการเพิ่มปริมาณลำดับเบสในตำแหน่ง ITS พบว่าลำดับดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS1 อยู่ในช่วงที่ 2-256 และตำแหน่ง ITS2 อยู่ในช่วงที่ 421-644 ในการทดลองครั้งนี้สามารถเพิ่มปริมาณลำดับเบสได้นอกเหนือจาก ITS ด้วย เนื่องจากมีการใช้ primer ที่จะเข้าจับบริเวณ 18S และ 26S จึงทำให้สามารถเพิ่มปริมาณลำดับเบสบริเวณ 18S และ 26S ได้บางส่วนโดยสามารถเพิ่มลำดับเบสบริเวณ 18S คือ ลำดับเบสในตำแหน่งที่ 1 และเพิ่มปริมาณลำดับเบสบริเวณ 26S ได้ 50 ลำดับเบสคือ ช่วงที่ 645-695 แต่มีตัวอย่างขลุ่จากจังหวัดสมุทรสาครที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณลำดับเบสในตำแหน่ง ITS2 ได้ครบถ้วนและตัวอย่างขลุ่จากจังหวัดสมุทรสงครามก็ไม่สามารถเพิ่มปริมาณลำดับเบสบริเวณ 26S ได้เช่นเดียวกัน

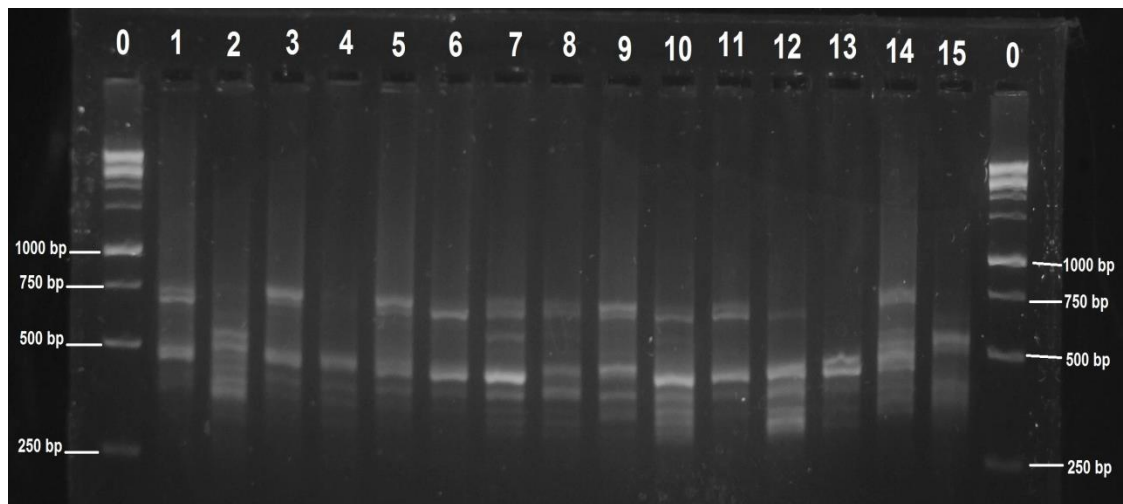


รูปที่ 14 การเปรียบเทียบลำดับเบสดีเอ็นเอของตัวอย่าง *Pluchea indica* ทั้ง 15 จังหวัด

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอของชุดที่ตำแหน่ง ITS ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.2 แสดงให้เห็นว่าลำดับเบสดีเอ็นเอของชุดทั้ง 15 จังหวัดนั้นเหมือนกันทั้งหมดทั้งตำแหน่ง ITS1 และ ITS2 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสดีเอ็นเอของชุดที่นำมาอ้างอิงจาก

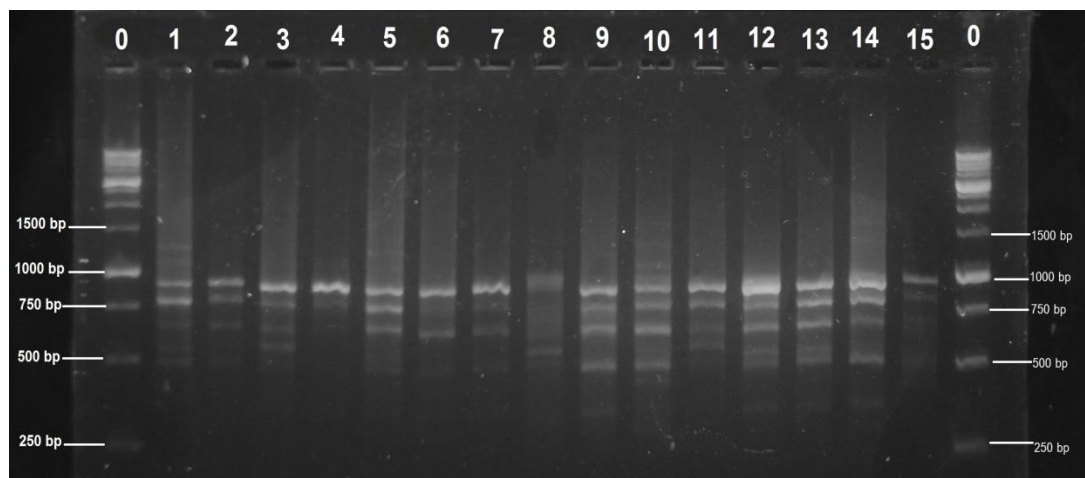
ฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรมของ DNA Data Bank of Japan (DDBJ) แต่อย่างไรก็ตามลำดับเบสดีเอ็นเอของจังหวัดสมุทรสาครนั้นไม่สามารถสังเคราะห์ได้ครบสมบูรณ์ของลำดับเบสดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS2

3. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของขลุ่ยด้วยเทคนิค ISSR



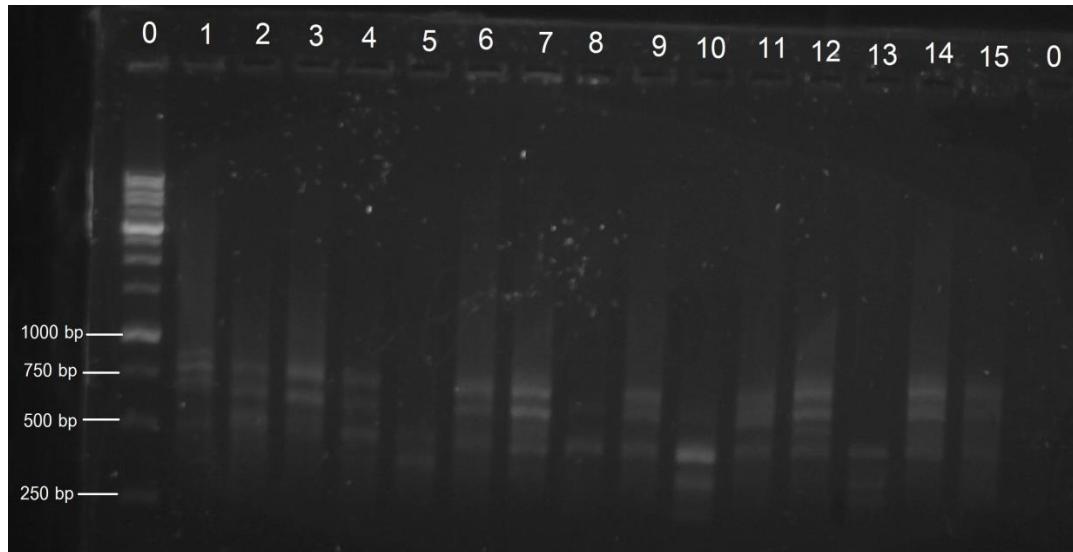
รูปที่ 15. แถบดีเอ็นเอของ *P. indica* ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ primer ISSR3

0= DNA Ladder,	1= ภูเก็ต	2= สุราษฎร์ธานี	3= นครราชสีมา
4= ประจวบคีรีขันธ์	5= เพชรบุรี	6= นนทบุรี	7= ราชบุรี
8= สงขลา	9= ฉะเชิงเทรา	10= จันทบุรี	11= ชลบุรี
12= สมุทรสงคราม	13= สมุทรสาคร	14= ระยอง	15= อุดรดิตถ์



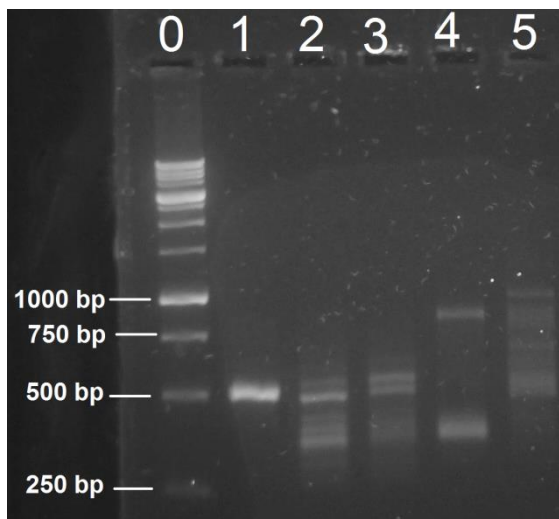
รูปที่ 16. แถบดีเอ็นเอของ *P. indica* ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ primer ISSR4

0= DNA Ladder,	1= ภูเก็ต	2= สุราษฎร์ธานี	3= นครราชสีมา
4= ประจวบคีรีขันธ์	5= เพชรบุรี	6= นนทบุรี	7= ราชบุรี
8= สงขลา	9= ฉะเชิงเทรา	10= จันทบุรี	11= ชลบุรี
12= สมุทรสงคราม	13= สมุทรสาคร	14= ระยอง	15= อุดรดิตถ์



รูปที่ 17. แถบดีเอ็นเอของ *P. indica* ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ primer ISSR8

0= DNA Ladder,	1= ภูเก็ต	2= สุราษฎร์ธานี	3= นครราชสีมา
4= ประจวบคีรีขันธ์	5= เพชรบุรี	6= นนทบุรี	7= ราชบุรี
8= สงขลา	9= ฉะเชิงเทรา	10= จันทบุรี	11= ชลบุรี
12= สมุทรสงคราม	13= สมุทรสาคร	14= ระยอง	15= อุดรดิตถ์



รูปที่ 18. ISSR ของฟังกาดอกช่อ (*Bruguiera hainesii* C.G.Roger)

0= DNA Ladder, 1= พังกาดอกข้อ ISSR1, 2= พังกาดอกข้อ ISSR2, 3= พังกาดอกข้อ ISSR3,
4= พังกาดอกข้อ ISSR4, 5= พังกาดอกข้อ ISSR 8

ตารางที่ 5. จำนวนแถบดีเอ็นเอ monomorphic, polymorphic ของตัวอย่างขลุ่ 15 จังหวัดโดยใช้เทคนิค ISSR จาก 5 primer

Primer	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (base pair)	จำนวน polymorphic	จำนวน monomorphic	จำนวนแถบ ทั้งหมด
ISSR3	250-750	9(100%)	0	9
ISSR4	250-1,500	8(89%)	1(11%)	9
ISSR8	250-1,000	6(86%)	1(14%)	7
รวม		23	2	25

ตัวอย่างขลุ่ที่เก็บมาจาก 15 จังหวัดได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาความหลากหลายทางสายพันธุ์ด้วยเทคนิค ISSR โดยมีการใช้ primer จำนวน 5 ชนิด ซึ่งคัดเลือกมาจากการวิจัยของ Bekir Dogan ซึ่งเป็นการศึกษาความหลากหลายของพืชในวงศ์ Asteraceae ด้วยเทคนิค ISSR (34) เมื่อได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของขลุ่ทั้ง 15 ตัวอย่างพบว่า primer ทั้ง 5 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งประกอบไปด้วยแถบดีเอ็นเอทั้งแบบที่เห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน และชนิดที่เห็นแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน จึงมีการให้คะแนนของการนับแถบดีเอ็นเอแบบ Binary เฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนเป็นหลัก จากการนับแถบดีเอ็นเอของ primer ทั้ง 5 ชนิด พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณโดย primer ISSR1 และ ISSR2 ไม่สามารถนำมานับจำนวนแถบดีเอ็นเอได้เนื่องจากแถบที่ได้ไม่ชัดเจน จึงคัด primer ISSR1 และ ISSR2 ออกจากการศึกษา แต่สำหรับ primer ISSR3, ISSR4 และ ISSR8 สามารถนับแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนดังนั้นการศึกษานี้จึงคัดเลือก primers 3 ชนิดนี้มาใช้ในการศึกษา

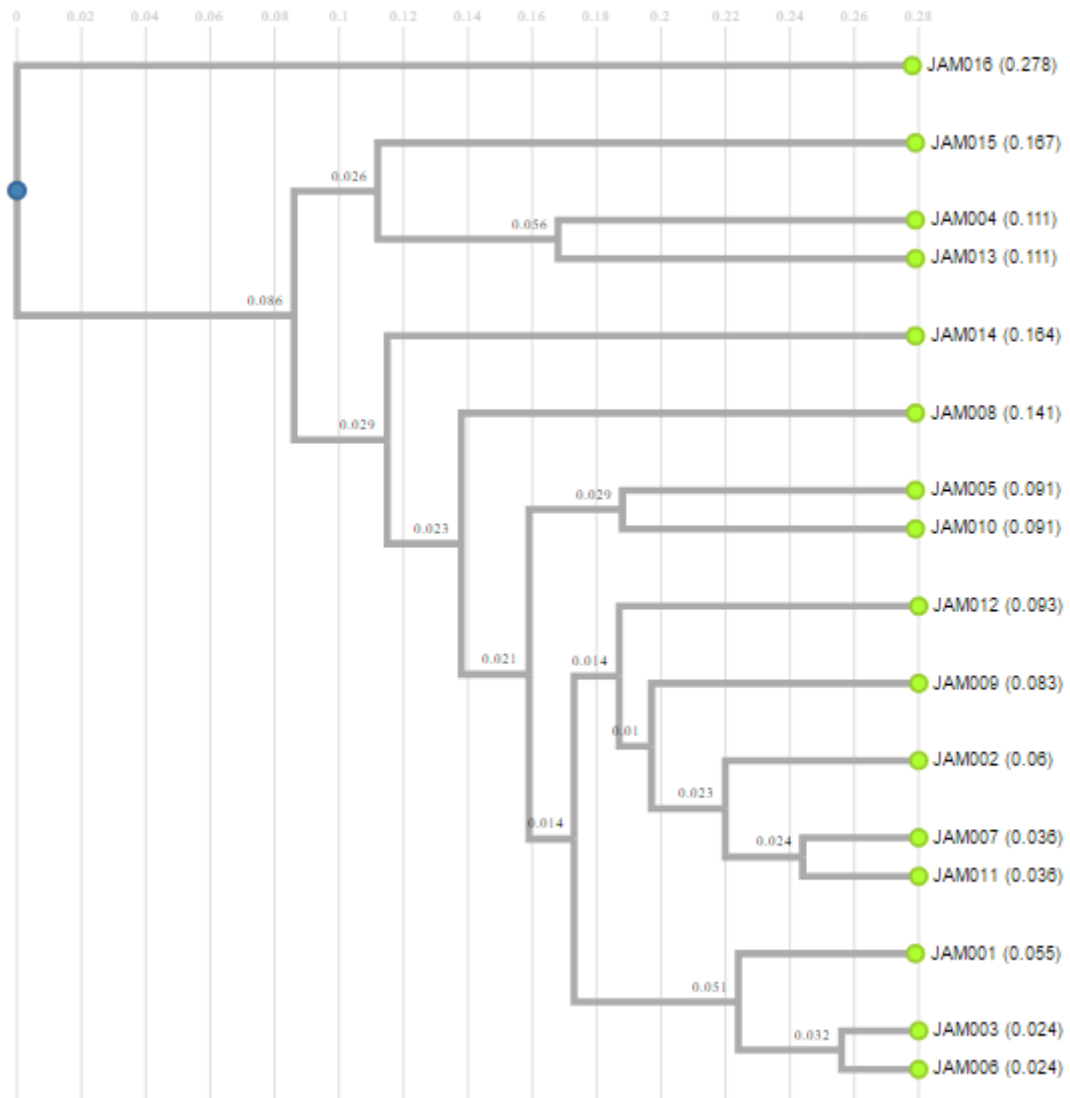
จากการนับจำนวนแถบดีเอ็นเอพบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 25 แถบ และมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic) เป็นจำนวน 23 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 250-1,500 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ marker ที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 250-10,000 bp เมื่อได้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เปรียบเทียบเหมือนและความแตกต่างของแต่ละตัวอย่างแล้ว นำมาวิเคราะห์ต่อด้วยการคำนวณ

ค่าดัชนีความเหมือน (Similarity index, S.I.) ดังตารางที่ 6 และแปลผลให้เป็นค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) เพื่อนำไปสร้างเป็นแผนภาพเดนโรแกรม (Dendrogram) ดังรูปที่ 19. เพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างกล้วยทั้ง 15 จังหวัด โดยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) ด้วยการใช้โปรแกรมบนเว็บไซต์ genomes.urv.cat

ตารางที่ 6. ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม (Similarity Index) จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้โปรแกรมบนเว็บไซต์

<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>

	JAM-001	JAM-002	JAM-003	JAM-004	JAM-005	JAM-006	JAM-007	JAM-008	JAM-009	JAM-010	JAM-011	JAM-012	JAM-013	JAM-014	JAM-015	JAM-016
JAM-001	1.000	0.783	0.870	0.571	0.762	0.909	0.769	0.636	0.741	0.720	0.769	0.714	0.476	0.815	0.476	0.381
JAM-002	0.783	1.000	0.818	0.800	0.700	0.857	0.880	0.762	0.846	0.750	0.880	0.815	0.700	0.692	0.700	0.500
JAM-003	0.870	0.818	1.000	0.600	0.800	0.952	0.800	0.762	0.769	0.750	0.880	0.741	0.600	0.692	0.500	0.400
JAM-004	0.571	0.800	0.600	1.000	0.556	0.632	0.783	0.632	0.667	0.636	0.783	0.720	0.778	0.583	0.778	0.556
JAM-005	0.762	0.700	0.800	0.556	1.000	0.842	0.783	0.632	0.667	0.818	0.783	0.640	0.667	0.583	0.333	0.333
JAM-006	0.909	0.857	0.952	0.632	0.842	1.000	0.833	0.700	0.800	0.783	0.833	0.692	0.526	0.720	0.526	0.421
JAM-007	0.769	0.880	0.800	0.783	0.783	0.833	1.000	0.750	0.828	0.815	0.929	0.800	0.696	0.690	0.696	0.522
JAM-008	0.636	0.762	0.762	0.632	0.632	0.700	0.750	1.000	0.720	0.696	0.833	0.692	0.737	0.560	0.526	0.421
JAM-009	0.741	0.846	0.769	0.667	0.667	0.800	0.828	0.720	1.000	0.786	0.828	0.774	0.583	0.667	0.583	0.500
JAM-010	0.720	0.750	0.750	0.636	0.818	0.783	0.815	0.696	0.786	1.000	0.815	0.759	0.636	0.643	0.455	0.364
JAM-011	0.769	0.880	0.880	0.783	0.783	0.833	0.929	0.833	0.828	0.815	1.000	0.867	0.783	0.690	0.609	0.435
JAM-012	0.714	0.815	0.741	0.720	0.640	0.692	0.800	0.692	0.774	0.759	0.867	1.000	0.720	0.645	0.560	0.480
JAM-013	0.476	0.700	0.600	0.778	0.667	0.526	0.696	0.737	0.583	0.636	0.783	0.720	1.000	0.500	0.556	0.444
JAM-014	0.815	0.692	0.692	0.583	0.583	0.720	0.690	0.560	0.667	0.643	0.690	0.645	0.500	1.000	0.583	0.333
JAM-015	0.476	0.700	0.500	0.778	0.333	0.526	0.696	0.526	0.583	0.455	0.609	0.560	0.556	0.583	1.000	0.556
JAM-016	0.381	0.500	0.400	0.556	0.333	0.421	0.522	0.421	0.500	0.364	0.435	0.480	0.444	0.333	0.556	1.000



รูปที่ 19. เดนโดแกรม(Dendrogram)ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชทั้ง 15 จังหวัดและพังกาดอกช่อ

จากการวิเคราะห์เพื่อหาค่าดัชนีความเหมือน (Similarity index) และสร้างเดนโดแกรม (Dendrogram) แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชจาก 15 จังหวัดในประเทศไทย โดยจากการวิเคราะห์พบว่าพืชจากจังหวัดนครราชสีมากับนนทบุรีนั้น มีค่าดัชนีความเหมือนสูงสุดคือ 0.952 และจังหวัดเพชรบุรีกับอุตรดิตถ์มีค่าดัชนีความเหมือนน้อยที่สุดคือ 0.333 จากการคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและทำแผนภาพเดนโดแกรมพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มพืช 15 จังหวัดออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สมุทรสาครและอุตรดิตถ์ และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ระยอง สงขลา เพชรบุรี จันทบุรี สมุทรสงคราม ฉะเชิงเทรา สุราษฎร์ธานี ราชบุรี ชลบุรี ภูเก็ต นครราชสีมาและนนทบุรีนอกจากนี้ผู้ทำวิจัยได้นำพังกาดอกช่อ (*Bruguiera hainesii*) มาทำ ISSR

เทียบกับขลุ่ยเพื่อให้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค ISSR สามารถแยกพืชที่ต่างชนิดกันได้ โดยผลการทดลองพบว่าค่าดัชนีความเหมือนอยู่ในช่วง 0.333-0.556 เมื่อเทียบกับขลุ่ยทุกจังหวัด

8. GeneDireX[®] OnePCR (บริษัท Genedirex; Taiwan)
9. ISSR primer 5 ชนิด ได้แก่
 - ISSR 1 = 5'-ACC ACC ACC ACC ACC ACC G-3'
 - ISSR 2 = 5'-GAG AGA GAG AGA GAG AGA C-3'
 - ISSR 3 = 5'-AGA GAG AGA GAG AGA GAG C-3'
 - ISSR 4 = 5'-ACA CAC ACA CAC ACA CAC G-3'
 - ISSR 8 = 5'-CGT CAC ACA CAC ACA CAC A-3'
10. Reverse primer (26sR) = 5'-CCG CCA GAT TTT CAC GCT GGG C-3'
11. Ultrapure 10x TAE buffer (บริษัท Invitrogen; USA)

1.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1.3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างขลุ่ 15 จังหวัดของประเทศไทยและถูกเก็บเป็น herbarium specimen สามารถดูรูปตัวอย่างได้ในส่วนของ ภาคผนวกและตัวอย่างถูกเก็บไว้ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

- (1) ล้างตัวอย่างขลุ่สดที่ได้ด้วยน้ำกลั่น เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก
- (2) นำตัวอย่างขลุ่สดไปผึ่งลมที่อุณหภูมิห้องและเช็ดให้แห้ง
- (3) แบ่งตัวอย่างขลุ่สดออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปทำ herbarium specimen โดยเลือกส่วนที่มีทั้ง กิ่ง ก้าน ใบและดอกครบถ้วน
- (4) ส่วนที่สองนำไปสกัดดีเอ็นเอ และส่วนที่เหลือจากการสกัดจะทำการเก็บรักษาโดยนำไปบรรจุลงถุงพลาสติกที่ปิดปากถุงอย่างแน่นหนา จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้สามารถนำตัวอย่างขลุ่ที่เก็บรักษาโดยวิธีนี้ ยังคงมีคุณภาพดีเอ็นเอที่ดีและสามารถนำมาสกัดได้ในครั้งต่อไป

ตารางที่ 2. ตัวอย่างขลุที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	จังหวัด	สถานที่เก็บ	วันที่เก็บ	Voucher No.	Accession number
1	ภูเก็ต	ช. ร่วมใจอ่าวยอนต์ ต. วิจิตร อ.เมือง	06/07/59	JAM-001	LC194200
2	สุราษฎร์ธานี	ต.สินปุน อ.พระแสง	19/08/59	JAM-002	LC194207
3	นครราชสีมา	ต.ประดุก-โคกไผ่ อ.เมือง	03/08/59	JAM-003	LC194197
4	ประจวบคีรีขันธ์	ต.ปากน้ำปราณ อ.ปราณบุรี	29/07/59	JAM-004	LC194201
5	เพชรบุรี	1016 ต.ปึกเตียน อ.ท่ายาง	29/07/59	JAM-005	LC194199
6	นนทบุรี	ต.บางกระสอ อ.เมือง	07/08/59	JAM-006	LC194198
7	ราชบุรี	ทางหลวงสายเอเชียหมายเลข 2 ต.ดอนทราย อ.ปากท่อ	30/07/59	JAM-007	LC194202
8	สงขลา	ถ.ลพบุรีราเมศวร์ ต.น้ำน้อย อ.หาดใหญ่	08/08/59	JAM-008	LC194206
9	ฉะเชิงเทรา	ถ.สุขุมวิท ต.ท่าข้าม อ.บางปะกง	06/08/59	JAM-009	LC196166
10	จันทบุรี	ต.บางกะไชย อ.แหลมสิงห์	26/08/59	JAM-010	LC194195

ลำดับที่	จังหวัด	สถานที่เก็บ	วันที่เก็บ	Voucher No.	Accession number
11	ชลบุรี	ถ.ข้าวหลาม ต.บ้านปึก อ.เมืองชลบุรี	08/08/59	JAM-011	LC194196
12	สมุทรสงคราม	ต.บางแก้ว อ.เมือง สมุทรสงคราม	29/08/59	JAM-012	LC194205
13	สมุทรสาคร	ถ.สายธนบุรี ปากท่อ ต.บางกระเจ้า อ.เมือง	29/07/59	JAM-013	LC194204
14	ระยอง	ถ.เฉลิมบูรพาชลทิศ ต.พังราด อ.แกลง	26/08/59	JAM-014	LC194203
15	อุตรดิตถ์	ต.ทุ่งยั้ง อ.ลับแล	02/08/59	JAM-015	LC196167

1.3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากขลุ่

1) การสกัดดีเอ็นเอโดยชุดเครื่องมือ DNeasy® Plant Mini Kit(36)

- ใส่พืชตัวอย่าง (≤ 100 mg wet weight หรือ ≤ 20 mg lyophilized tissue) ลงใน collection tube ขนาด 2 ml เติมนัฟเฟอร์ AP1 (Lysis buffer) 400 μ l ตามลงไป แล้วทำให้เซลล์แตกออก(disrupt) ด้วยเครื่อง TissueRuptor เป็นเวลาประมาณ 30 วินาทีด้วยความเร็วสูงสุด (full speed) แล้วย้ายสารไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube)
- เติมนสารละลาย RNase A stock solution 4 μ l (100 mg/ml) ตามลงในเนื้อเยื่อพืชที่ถูกทำให้แตกออกแล้วทันที เพื่อให้เนื้อเยื่อเซลล์แตกและแยกออกจากกัน ไม่ให้มีการจับเป็นกลุ่มก้อน ถ้าหากมีกลุ่มก้อนของเนื้อเยื่อเกิดขึ้น จะทำให้ปริมาณของ DNA ที่จะสกัดนั้น มีปริมาณต่ำ
- นำสารผสมไปปั่นเป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

4. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ P3 ปริมาตร 130 μ l ลงไปใน lysate จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นต่อในที่เย็นเป็นเวลา 5 นาที เพื่อช่วยในการตกตะกอนของสารจำพวกสารชะล้าง (detergent), โปรตีน (proteins) และโพลีแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)
5. นำ lysate มาปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาทีที่ $20,000 \times g$ (14,000 rpm) ที่อุณหภูมิห้อง
6. ปิเปต lysate ที่ได้ไปยัง QIAshredder Mini spin column ที่บรรจุอยู่ใน collection tube ขนาด 2 ml และนำไปปั่นเหวี่ยงต่ออีกครั้งเป็นเวลา 2 นาทีที่ $20,000 \times g$ (14,000 rpm)
7. วัดปริมาตรที่ได้ของเหลว (flow-through) จากขั้นตอนที่ 6 ย้ายไปใส่ลงในหลอดอันใหม่ ที่ปราศจากการรบกวนของเศษซากจากเซลล์
8. เติมบัฟเฟอร์ AW1 ลงในส่วนใส (cleared lysate) ในปริมาตร 1.5 เท่าของ lysate แล้วผสมให้เข้ากันทันที
9. ปิเปตสารละลายผสมจากขั้นตอนที่ 8 มา 650 μ l รวมถึงตะกอนต่างๆใส่ลงใน DNeasy Mini spin column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่แรงเหวี่ยง $\geq 6000 \times g$ และทิ้งของเหลว (flow-through) ไป ซึ่งในของเหลวนั้นจะประกอบด้วยบัฟเฟอร์ AW1
10. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 9 ด้วยตัวอย่างที่เหลืออยู่ภายในหลอดเดิม ทิ้งของเหลว (flow-through) และ collection tube ไป
11. วาง DNeasy Mini spin column ใส่ใน collection tube อันใหม่ขนาด 2 ml เติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 μ l แล้วปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ $\geq 6000 \times g$ ทิ้งของเหลว (flow-through) ไปและนำ collection tube กลับมาใช้ใหม่ในขั้นตอนที่ 12
12. เติมบัฟเฟอร์ AW2 500 μ l ลงใน DNeasy Mini spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2 นาทีที่ $20,000 \times g$ (14,000 rpm)
13. ย้าย DNeasy Mini spin column มาใส่บนหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 หรือ 2.0 ml แล้วปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์ AE มา 50 μ l ใส่ลงบน membrane ของ DNeasy จากนั้นนำไป incubate ต่อเป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (15–25 องศาเซลเซียส) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงต่อเป็นเวลา 1 นาทีที่ $\geq 6000 \times g$ เพื่อชะล้างที่เหลืออยู่ ซึ่ง

ในขั้นปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์ AE สามารถเลือกเติม 50, 100, 200 μ l โดยการเติมแค่ 50 μ l จะทำให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอสูงแต่ได้ปริมาตรรวมน้อย

14. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 13 อีกครั้ง โดยใช้หลอด microcentrifuge tube อันใหม่ในการหะครั้งที่สอง

2) การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยชุด Qubit[®] assays (37)

1. จัดเตรียม microcentrifuge tube ขนาด 1 ml ซึ่งบรรจุสารละลาย Standard A ปริมาตร 10 μ l และ Standard B ปริมาตร 10 μ l ไว้อย่างละหลอด และ microcentrifuge tube ซึ่งบรรจุสารละลาย Sample ปริมาตร 1-20 μ l

2. เตรียมสารละลาย working solution โดยการผสม Qubit[®] reagent ปริมาตร 1x μ l กับ Qubit[®] Buffer ปริมาตร 199x μ l (n = จำนวน Standards รวมกับ จำนวน Samples

3. แบ่งสารละลาย working solution ออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนที่เป็น Standard (Standard A, Standard B) และส่วน Sample โดยให้แบ่งใส่ส่วน Standard อย่างละ ปริมาตร 190 μ l และส่วน Sample ปริมาตร 199 μ l

4. ผสมให้เข้ากันโดยเทคนิคปิเปตหรือ vortex

5. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที

6. ใส่หลอดทดลองเข้าไปในเครื่อง Qubit[®] Fluorometer แล้วอ่านค่าที่ได้ โดยวัด หลอดที่เป็น Standard A และ Standard B ก่อนแล้วค่อยวัด Samples ตามลำดับ

1.3.3 การตรวจสอบคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Gel electrophoresis (19)

- 1) เตรียมอะกาโรสที่ความเข้มข้น 0.8% (หากเตรียมเจลสำหรับทำ PCR ใช้ 1% แต่หากเตรียมเพื่อทำ ISSR ใช้ 2%) โดยชั่งผงอะกาโรส 0.8 g ละลายด้วย 1X TAE buffer 100 ml
- 2) นำผงอะกาโรสในสารละลายบัฟเฟอร์ไปอุ่นในเครื่องไมโครเวฟ จนผงอะกาโรสละลายจนหมดและได้สารละลายที่ใส
- 3) เติมน้ำ SYBR ให้เป็น 1x ของปริมาตรสารละลายอะกาโรส

- 4) รอให้สารละลายอะกาโรสลดอุณหภูมิลง แล้วค่อยๆ เทสารละลายลงถาดที่มีหี้อยู่ (โดยวางหีไว้ให้ห่างจากขอบถาดประมาณ 1 เซนติเมตร)
ให้ระวังการเกิดฟองอากาศขณะเทเจลลงในถาดรอจนเจลแข็งตัวดี
- 5) รอให้เนื้อเจลแข็งตัวและลดอุณหภูมิลง ค่อยดึงหี้ออก
- 6) แกะเจลออกจากถาดแล้วนำแผ่นเจลไปวางใน electrophoresis tank แล้วเท TAE buffer ให้ท่วมเจล
- 7) นำสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 μ l มาผสมสี Novel juice DNA staining dye, GeneDireX® 1 μ l
- 8) เติมสารละลายดีเอ็นเอลงในหลุมอย่างระมัดระวัง (ระวังสารละลายดีเอ็นเอ กระจายออกจากหลุม) โดยช่องแรกเติมเป็น DNA Ladder
- 9) ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 35 V เข้าสู่เจลโดยกำหนดเวลา 20 นาที (หากเตรียมเพื่อทำ ISSR ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 75 V เข้าสู่เจลโดยกำหนดเวลา 45 นาที)

1.3.4 การพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ่ยที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้เทคนิค PCR (38)

- 1) เตรียมส่วนผสมประกอบได้แก่ OnePCR plus, ultrapure water, DNA template, primer 18sF, primer 26sR ก่อนเข้าปฏิกิริยา PCR ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml โดยใส่ส่วนผสมที่มีปริมาตรมากก่อน ซึ่งส่วนผสมมีดังนี้ One PCR Plus 25.0 μ l, ultrapure water 18.0 μ l, DNA template 5.0 μ l, 10 μ M Forward primer 1.0 μ l, 10 μ M Reverse primer 1.0 μ l
- 2) นำ PCR tube ไปใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler ซึ่งกำหนดสภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขึ้น denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขึ้น annealing 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขึ้น extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1.5 นาที ขึ้น final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และกำหนดให้ขึ้น denaturation, annealing และ extension ทำซ้ำ 35 รอบ
- 3) ตรวจสอบคุณภาพของ PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis (ดูในหัวข้อ 2.3.2)
- 4) ตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค capillary electrophoresis
- 5) นำลำดับดีเอ็นเอที่ถอดรหัสได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.2

1.3.5 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของขลุ่ยด้วยเทคนิค ISSR

- 1) เตรียมส่วนผสมก่อนเข้าปฏิกิริยา PCR ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml โดยใส่ส่วนผสมที่มีปริมาตรมาก่อน ซึ่งส่วนผสมมีดังนี้ One PCR Plus 12.5 μ l, altapure water 9.0 μ l, DNA template 2.5 μ l, ISSR primer 1.0 μ l
- 2) นำ PCR tube ไปใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler ซึ่งกำหนดสภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ขึ้น denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ขึ้น annealing 56,60 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ขึ้น extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1.0 นาที ขึ้น final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และกำหนดให้ขึ้น denaturation, annealing และ extension ทำซ้ำ 40 รอบ(39)
- 3) ตรวจสอบคุณภาพของผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis (ดูในหัวข้อ 2.3.2)
- 4) นับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ
- 5) วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยการใช้โปรแกรมบนเว็บไซต์ <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>

1.2 การนำไปใช้ประโยชน์และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของขลุ้

ขลุ้เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทย ในตำรายาไทยใบขลุ้จะมีรสหอมฝาดเมาเค็ม เป็นยา ขับปัสสาวะ ฝาดสมาน แก้แผลอักเสบ แก้เบาหวาน ขับนิ่ว (3) นอกจากนี้ยังมีรายงานงานวิจัยที่ทำการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของขลุ้ ยกตัวอย่างเช่น การทดสอบการแยกสารสกัดจากรากขลุ้และนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. histolytica* จากผลการทดลองพบว่า สารประกอบหลักที่แยกมาได้คือ R/J/3 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. histolytica* เมื่อมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 µg/ml และบ่มนาน 2-4 ชั่วโมง(10) ต่อมาได้มีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาศักยภาพด้านการอักเสบของใบขลุ้ที่สกัดด้วยเอทานอลในหนูขาว พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 300 mg/kg และเมื่อให้สารสกัดผ่านทางปากนาน 180 นาที สามารถยับยั้งอาการอักเสบได้ดีที่สุด อีกหนึ่งงานวิจัยที่ทำการทดสอบฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดในสภาวะปกติและสภาวะเหนี่ยวนำ พบว่า เมื่อฉีดสารสกัดเข้าไปในเส้นเลือดของหนูขาว 1, 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมงสารสกัดใบขลุ้สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดให้อยู่ในระดับปกติทั้งในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำและไม่ถูกเหนี่ยวนำ (13) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหนึ่งทำการทดลองฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ตับของสารสกัดขลุ้ในหนู พบว่า เมื่อให้สารพิษในหนูที่ได้รับสารสกัดจากรากขลุ้ เซลล์ตับมีความเสียหายน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ(14) และได้มีการศึกษาความสามารถในการต้านพิษจาก β -sitosterol และ Stigmasterol ที่แยกได้จากสารสกัดของขลุ้ที่สกัดด้วยเมทานอล และนำมาทดลองกับหนู (mice) ด้วยการฉีดพิษให้กับหนูทดลองแล้วฉีดสารสกัด β -sitosterol และ Stigmasterol ทางหลอดเลือดให้แก่ หนูพบว่า β -sitosterol และ Stigmasterol สามารถต้านพิษในหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญ(15)

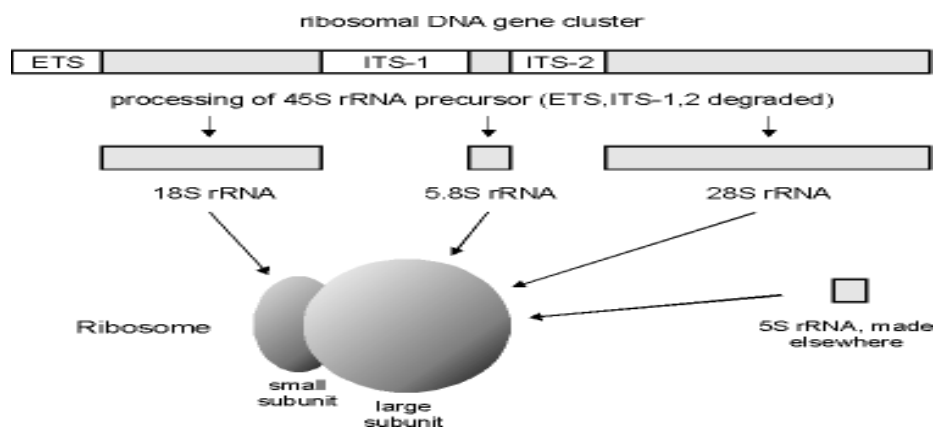
1.3 ตำแหน่งดีเอ็นเอกับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1.3.1 ดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA)

ดีเอ็นเอของพืชจะมีรูปร่างแบบ linear DNA และขดแน่นจนกลายเป็นโครโมโซม (chromosome) ซึ่งดีเอ็นเอจะได้รับการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อและแม่อย่างละครึ่ง โดยพบว่า ขนาดหรือความยาวของดีเอ็นเอในพืชแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน

ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA; rDNA)

ribosomal DNA (rDNA) เป็นลำดับดีเอ็นเอที่จะถูกถอดรหัสไปเป็นไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) มีหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีน rDNA จะประกอบด้วยการจัดเรียงของชุดซ้ำๆ ซึ่งประกอบด้วย ETS, 18s, ITS1, 5.8s, ITS2, และ 28s (ในพืชสามารถพบได้ตั้งแต่ 25s - 28s) เรียงตัวต่อกันเป็นหนึ่งชุดและแต่ละชุดของ rDNA จะต่อกันด้วย intergenic spacer (IGS) หรือเรียกว่า nontranscribed spacer (NTS) ซึ่งดีเอ็นเอส่วน 5.8s และ 28s จะแสดงหน้าที่รวมกันเป็น large subunit rRNA มี ITS1 และ ITS2 เป็นตัวทำหน้าที่เชื่อมให้เป็นก้อนเดียวกัน และ rDNA 18s จะทำหน้าที่เป็น small subunit rRNA สำหรับ 18s, 5.8s และ 26s เป็นส่วนของยีนไรโบโซมอล ที่จะแสดงออกเป็นโครงสร้าง rDNA โดยในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนนั้นต้องทำงานร่วมกับ ทรานเฟอร์อาร์เอ็นเอ tRNA และ เมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ mRNA



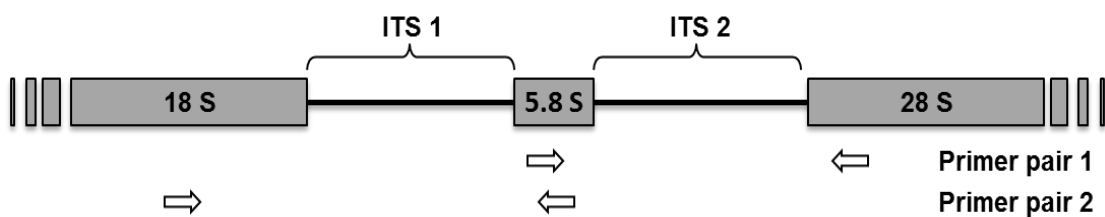
รูปที่ 4. Ribosomal DNA(22)

โดยปกติแล้วจะพบว่าความยาวของยีน 18s, 5.8s, 26s โดยมากจะมีความยาวที่ใกล้เคียงกัน ยีน 5.8S ยาวประมาณ 160 คู่เบส ยีน 18s ยาวประมาณ 1,800 คู่เบส และยีน 26S ยาวประมาณ 3,300 คู่เบส

ribosomal DNA (rDNA) เป็นลำดับดีเอ็นเอ ที่นิยมใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืช เพราะมีการเรียงตัวของชุดดีเอ็นเอซ้ำๆ มากมายหลายชุดซึ่งง่ายต่อการนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและมียีน 18s, 5.8s, 26s เป็นดีเอ็นเอส่วนอนุรักษ์ (conserved region) และยีน ITS และ IGS ที่เป็นส่วนดีเอ็นเอที่มีการวิวัฒนาการ ดังที่กล่าวมาทั้งหมดนี้จึงทำให้ ribosomal DNA (rDNA) มี

ประโยชน์ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์พืช และหาความใกล้เคียงของการวิวัฒนาการของพืช (19)

2) ดีเอ็นเอบริเวณไอทีเอส (Internal Transcribed Spacer หรือ ITS)



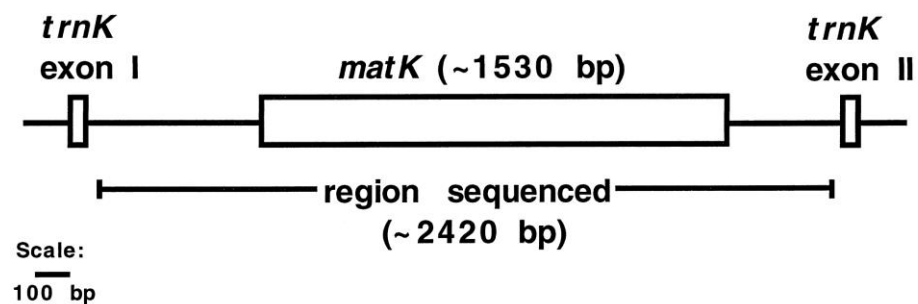
รูปที่ 5. ดีเอ็นเอบริเวณไอทีเอส (23)

Internal transcribed spacer (ITS) คือ spacer DNA ซึ่งเป็นบริเวณของลำดับเบสขนาดสั้นๆ ที่ไม่ใช่ยีน นั่นคือ ถูกถอดรหัส (transcribed) ได้แต่จะไม่ถูกนำไปแปลรหัส (translated) เพื่อสร้างเป็นโปรตีน ดีเอ็นเอบริเวณ ITS นี้ถูกใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์สปีชีส์มากที่สุด เนื่องจากมีบริเวณอนุรักษ์ จึงสามารถใช้เป็นตำแหน่งเกาะของยูนิเวอร์ซอลไพรมเมอร์ (universal primer) เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ นอกจากนี้ดีเอ็นเอบริเวณ ITS ยังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ได้ง่าย ดีเอ็นเอบริเวณ ITS จะอยู่ระหว่างยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA gene) ของ small-subunit ribosome และ large-subunit ribosome บนโครโมโซม ในสิ่งมีชีวิตจากโปรคาริโอต (Prokaryotes) อย่าง bacteria และ archaea นั้น ITS จะอยู่ระหว่างยีน 16S และ 23S rRNA แต่ถ้าเป็นสิ่งมีชีวิตจากยูคาริโอต (Eukaryotes) จะมีอยู่ 2 ITS; ITS1 จะอยู่ระหว่างยีน 18s และ 5.8S rRNA ส่วน ITS2 อยู่ระหว่างยีน 5.8S และ 26S (ในพืช, หรือ 28S ในสัตว์) rRNA โดยยีนทั้ง ITS1 และ ITS2 จะถูกนำไปถอดรหัสไปเป็นไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) แต่ไม่ได้ถูกรวมอยู่ในโครงสร้างของไรโบโซมหรือโมเลกุลของ rRNA ที่เป็นส่วนหนึ่งในการสร้างโปรตีน แต่ดีเอ็นเอส่วน ITS1 และ ITS2 จะทำหน้าที่เพียงช่วยให้ large-subunit rRNA ซึ่งเกิดจากการรวมกันของยีน 26S และ 5.8S กับ small-subunit rRNA ซึ่งเกิดจากยีน 18s เข้ามาใกล้กันมากขึ้นจนมีโครงสร้างเป็นโดเมนคอยทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีน (24)

1.3.2 ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA)

คลอโรพลาสต์มีหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช ดังนั้นยีนส่วนใหญ่ใน chloroplast จึงมีหน้าที่ในการแสดงออกเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งสายดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์มีลักษณะวงแหวนดีเอ็นเอแบบเกลียวคู่ที่เป็นสายดีเอ็นเอซ้ำแบบกลับ (invert repeat) จำนวน 2 ชุด โดยดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ได้รับการถ่ายทอดจากแม่ฝ่ายเดียว (19) มีความยาวในช่วง 85 ถึง 292 กิโลเบส ซึ่งพบว่าพืชส่วนใหญ่จะมีความยาวในช่วง 120-160 กิโลเบส ยกตัวอย่างเช่น ยีน *matK*

ยีน *matK*



รูปที่ 6. Gene *matK*(25)

ยีน *matK* เป็นยีนที่มีวิวัฒนาการอย่างรวดเร็ว มีการเปลี่ยนแปลงในระดับ nucleotide และกรดอะมิโน มีการแทนที่สูงของ nucleotide และเกิดการเปลี่ยนแปลงของความยาวยีน *matK* โดยพบว่ามีอัตราการเปลี่ยนแปลง nucleotide สูงกว่าเป็น 3 เท่าและการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน สูงกว่า 6 เท่าเมื่อเทียบกับยีน *rbcl* ที่เป็นยีนในคลอโรพลาสต์เช่นเดียวกัน จึงสามารถใช้ *matK* เป็นสัญญาณที่บ่งบอกถึงการวิวัฒนาการของพืชใน taxonomy ในระดับต่างๆ โครงสร้างของยีน *matK* อยู่ระหว่าง 2 exons ของ *trnK* โดยพบว่าในพืช angiosperms มียีน *matK* ซึ่งมีความยาวประมาณ 1500 bp และเมื่อถอดรหัสจะสร้างโปรตีนซึ่งคือเอนไซม์ maturase ที่ประกอบด้วย 500 กรดอะมิโน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง lysine (26)

1.3.3 ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (mitochondria DNA)

ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียของพืชมีอัตราการเปลี่ยนแปลงช้าเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอในนิวเคลียสจีโนมและคลอโรพลาสต์จีโนม จึงไม่นิยมนำเอาดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในระดับสปีชีส์ แต่สามารถใช้ในการหาความสัมพันธ์ของพืชในระดับวงศ์หรือสูงกว่าได้ (19) ยกตัวอย่างเช่น ยีน *coxI*

ยีน *coxI* (cytochrome C oxidase subunit I)

เมื่อถูกถอดรหัสออกมาจะได้โปรตีน cytochrome C oxidase subunit 1 ที่อยู่บริเวณ inner membrane ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการ oxidation phosphorylation pathway และกระบวนการสร้างพลังงาน จึงนิยมใช้ยีนนี้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์พืชสมุนไพรมากกว่ายีนอื่นๆ ในไมโทคอนเดรีย (27)

1.4 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers) หมายถึง ช่วงนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ช่วงหนึ่งของสายดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้หรือเอกลักษณ์ที่แสดงความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ (species) พืชแต่ละสายพันธุ์จะมีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ ที่แตกต่างกันหรือเรียกว่า โพลิมอร์ฟิซึม (polymorphisms) โดยสามารถเลือกใช้ดีเอ็นเอจากนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอจากไมโทคอนเดรีย (mitochondria DNA) หรือ ดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA) ก็ได้เนื่องจากสารพันธุกรรมเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้

การใช้ประโยชน์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) เพื่อใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา ที่เรียกว่า “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA fingerprinting)(16, 28)

1.5 เทคนิคพื้นฐานทางชีวโมเลกุล

1.5.1 เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

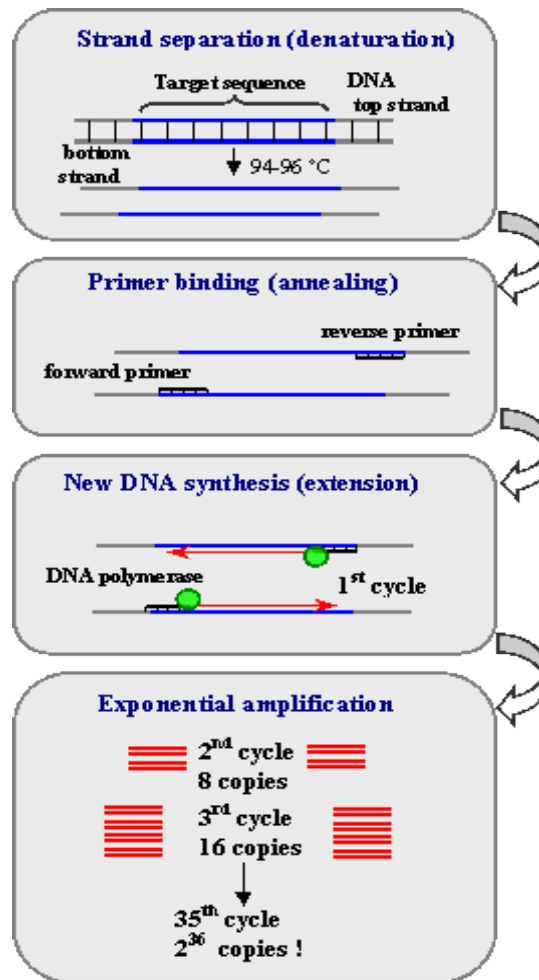
เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis ในช่วงปี ค.ศ. 1980 ซึ่ง polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน

ของดีเอ็นเอ ภายในหลอดทดลอง โดยใช้ความสามารถของ DNA polymerase ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) โดยเริ่มต้นจากการใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาณเล็กน้อย เหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอเรส (PCR) ทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นเป็นจำนวนมากหลายพันล้านโมเลกุล

องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอเรส (PCR) ประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีคุณภาพดีจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของการทำพีซีอาร์ ตัวอย่างเช่น สารสกัดมีการเจือปนของตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polymerase ก็จะมีผลต่อ ปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอเรส (PCR) หรือกรณีที่สกัดดีเอ็นเอแล้วได้อาร์เอ็นเอในปริมาณสูง จะทำให้เกิดการแย่งจับกับ Mg^{2+} ส่งผลให้ผลผลิตพีซีอาร์ลดลง ดังนั้นขั้นตอนการสกัด DNA เพื่อให้ได้ ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก
2. เอนไซม์ดีเอ็นเอพหุริเมอเรส (DNA polymerase)
3. ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers)
4. Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP, dTTP
5. สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution)

เทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง เมื่อผสมสารต่าง ๆ ลงในหลอดพีซีอาร์ หลังจากนั้นนำหลอดทดลองไปใส่ในเครื่องพีซีอาร์ โดยที่เครื่องจะมีการตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ เกิดการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามหลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอเรส ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาขึ้นซ้ำๆ โดยแต่ละรอบจะประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนคือ



รูปที่ 7. Polymerase chain reaction(29)

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ จากดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30-60 วินาที (สิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์เฮลิเคส (helicase) ช่วยในการแยกสายดีเอ็นเอ แต่ในหลอดทดลองไม่มีจึงต้องใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้เกิดการแยกสายดีเอ็นเอ)
2. Annealing เป็นขั้นตอนการจับของไพรเมอร์ โดยที่ไพรเมอร์จะเข้าจับบนสายดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นลำดับเบสคู่สม ซึ่งจะต้องควบคุมอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30-60 วินาที (ในสิ่งมีชีวิตมีเอนไซม์ไพรเมส (primase) ซึ่งจะทำหน้าที่สร้างอาร์เอ็นเอไพรเมอร์ แตกต่างจากการทำ PCR ที่จะต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มปริมาณ)

3. Primer extension หรือ DNA synthesis เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยต่อออกจาก Primer ที่เข้าคู่อยู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยมีการเติมเบสต่อจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5' ไป 3' โดยจะมีการต่อเติมเบสที่ปลาย 3' อุณหภูมิในขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30-120 วินาที ระยะเวลาขึ้นอยู่กับความยาวของดีเอ็นเอที่นำมาสังเคราะห์ ปกติการสังเคราะห์ดีเอ็นเอความยาว 1 กิโลเบส ใช้เวลา 60 วินาที แต่ถ้าสังเคราะห์ดีเอ็นเอความยาวน้อยกว่า 500 กิโลเบส ใช้เวลา 30 วินาที

การทำงานของพีซีอาร์เมื่อทำครบ 3 ขั้นตอนจะนับเป็น 1 รอบ และมักจะทำซ้ำเป็นจำนวน 20-40 รอบ ทำให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) เป็นดีเอ็นเอชุดใหม่จำนวนมาก (19, 30)

1.5.2 ISSR (Inter simple sequence repeat)

เทคนิค ISSR เป็นเทคนิคการพิสูจน์เอกลักษณ์ที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Zietkiewicz ซึ่งเทคนิค ISSR ได้ถูกพัฒนาขึ้นจากเทคนิค microsatellite-PCR โดยการทำ SSR-anchored PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มหมู่ Polynucleotide ตรงตำแหน่งปลาย 5' กับ 3' ของ Primer จึงทำให้ Primer สามารถจับกับ microsatellite ได้จำเพาะมากกว่าการทำ microsatellite-PCR แบบเดิมจึงทำให้ผลผลิตจากการทำพีซีอาร์มีความยาวสม่ำเสมอจึงสามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ได้ดียิ่งขึ้น วิธี ISSR นี้จึงไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับ DNA มาก่อนการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ ดังนั้น จึงเป็นประโยชน์ในการศึกษาพืชต่าง ๆ โดยปราศจากข้อมูลลำดับ DNA ที่มีอยู่ วิธี ISSR จะช่วยทำให้เกิดผลผลิตที่ได้จากเทคนิค PCR มีความคงที่เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี RAPD ในทางปฏิบัติ ISSR fingerprinting มีการนำไปใช้ในการศึกษาอย่างแพร่หลาย อาทิเช่น การศึกษาถึงความหลากหลายของประชากร, การศึกษานุกรมวิธาน (taxonomy) และการศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogeny) ของพืชต่าง ๆ (31)

ปัจจัยที่สำคัญของการทำ ISSR

- 1) Genomic DNA ซึ่งเป็น ดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับ ISSR-PCR

ดีเอ็นเอแม่แบบเป็นส่วนสำคัญในการประสบความสำเร็จในเทคนิค ISSR ดังนั้นจึงต้องการดีเอ็นเอแม่แบบที่มีคุณภาพสูง และต้องมีการ standardise ปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบก่อนจะเริ่ม PCR ดังนั้น ขั้นตอนและวิธีการสกัดดีเอ็นเอรวมถึงชนิดตัวอย่างจึงมีความสำคัญ ซึ่งหากพบเศษซากของเซลล์ปนอยู่อาจไปรบกวนการทำ PCR ได้ ซึ่งการสกัดโดยวิธีแบบดั้งเดิมก็

เพียงพอที่ให้คุณภาพของดีเอ็นเอที่ดี แต่ถ้าไม่ก็สามารถใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (kit) ซึ่งจะได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอก่อนทำ PCR นั้นจะต้องปรับให้มีความเหมาะสม โดยทั่วไปนิยมใช้ความเข้มข้น 10-50 ng ซึ่งจะได้ผลผลิตที่เพียงพอและมีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง

2) ISSR primer design

ISSR primer มักมีความยาว 16-25 base pairs (bp) โดยจะประกอบด้วยชุด base ซ้ำๆ ชุดละ 2-4 bp ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จะเข้าไปจับกับ microsatellites รูปแบบของ ISSR primer มี 3 รูปแบบได้แก่ unanchored (primer ที่มีเฉพาะ sequence ที่มีลำดับเบสซ้ำๆ เช่น 5'-(AC)₈-3'), 5'-anchored (primer มีส่วนที่เป็นลำดับเบสซ้ำและอีกส่วนที่ไม่ใช่ลำดับเบสซ้ำที่ด้านปลาย 5' ของ primer เช่น 5'-GA(AC)₈-3' ซึ่ง GA จะเป็นส่วน anchored ซึ่งไม่ใช่ลำดับเบสซ้ำ) และ 3'-anchored (primer มีส่วนที่เป็นลำดับเบสซ้ำและอีกส่วนที่ไม่ใช่ลำดับเบสซ้ำที่ด้านปลาย 3' ของ primer เช่น 5'-(AC)₈(AG)-3' AG จะเป็นส่วน anchored ซึ่งไม่ใช่ลำดับเบสซ้ำ) ได้มีการศึกษาถึงความแตกต่างของ primer ทั้ง 3 ชนิด โดยงานวิจัยดังกล่าวแนะนำว่าการศึกษาที่ใช้ ISSR markers นั้นควรใช้ primer ที่เป็น 3' หรือ 5'-anchored primer เพราะว่า unanchored นั้นจะสามารถเลื่อนไปจับกับตำแหน่งอื่นที่อยู่ใกล้เคียงได้ทำให้ความยาวของ genomic ที่นำไปทำ PCR นั้นมีความยาวไม่เท่ากันซึ่งจะมีผลต่อผลผลิต PCR ที่ได้ออกมา

ISSR primer นั้นง่ายในการออกแบบและปรับแต่งให้เข้ากับการทดลอง โดยอาจจะนำ primer ที่เคยใช้ในการทดลองก่อนหน้านี้มาทำการทดลองก็ได้ซึ่งเป็นทางเลือกที่นิยมมากในการทดลองต่างๆ

3) PCR amplification with ISSR primers (ISSR-PCR)

ข้อแตกต่างเล็กน้อยระหว่าง ISSR กับ PCR จะเกี่ยวข้องกับ primer ที่ใช้โดย ISSR-PCR จะใช้แค่ primer เดียวของแต่ละปฏิกิริยา ซึ่ง single primer นี้จะทำหน้าที่เป็นทั้ง forward และ reverse primer

ISSR-PCR นี้ จะมีการกำหนด annealing temperature (T_a) ที่ 45-60 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้จะขึ้นกับ melting temperature (T_m) ของ ISSR primer โดยสิ่งสำคัญคือการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยปกติจะทดลองที่ T_a เท่ากับ 45 องศาเซลเซียส 50 องศาเซลเซียส 55 องศาเซลเซียส หรือ 60 องศาเซลเซียส โดยเลือก T_a ที่ให้ผลผลิตสูงและดีที่สุด และจะต้องทดลองหาอุณหภูมิหลายค่า ที่ให้ผลผลิตที่ดีที่สุด ขั้นตอนนี้มีความสำคัญในการที่จะทำให้ PCR ประสบผลสำเร็จโดยใช้ ISSR primer

4) Gel electrophoresis

การทำ electrophoresis จากผลผลิต ISSR-PCR นิยมใช้เจลที่ความเข้มข้น 1.5-2.0% w/v ของ agarose เพื่อให้ DNA เกิด band ที่ชัดเจนและให้ score ง่าย โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการวิเคราะห์ ISSR คือ 2.0% w/v ของ agarose หรืออาจใช้ polyacrylamide ในการทำ gel electrophoresis ก็ได้

5) Scoring of bands

วิธีมาตรฐานหรือ criteria สำหรับให้คะแนน DNA band สำหรับ dominant DNA marker อาจแตกต่างกันขึ้นกับแต่ละการทดลองว่าจะกำหนดอย่างไร

(1.) ให้นับแต่เฉพาะ band ที่ชัดเจน smeared band เพื่อให้ผลการทดลองที่เกิดจากความไม่จำเพาะของ ISSR primer ที่เกิดโดยไม่ได้ตั้งใจหรือการ overlap ของ band ที่มี DNA ขนาดคล้ายกันออกไป เพราะทั้ง 2 สิ่งนี้อาจทำให้ยากต่อการให้ score และได้ผลการทดลองที่ไม่สอดคล้องกัน

(2.) ให้แต่เฉพาะ band ที่เข้มเท่านั้น เพราะ band ที่อ่อนคือ band ที่มีปริมาณดีเอ็นเอ น้อยจึงไม่ให้คะแนน

(3.) ต้องมีการกำหนดเกณฑ์คะแนนมาตรฐาน ของช่วงขนาด band ที่แตกต่างกันก่อน จะเริ่มให้คะแนน โดยปกติช่วงความยาวจะอยู่ที่ 100-2,000 bp ซึ่ง ISSR ใช้ 2% agarose gel โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80-100 V

- ถ้าขนาด band น้อยกว่า 100 bp จะเห็น band ไม่ชัดสามารถบอกได้ว่าเป็น primer dimer
- ถ้าขนาด band ใหญ่กว่า 2,000 bp จะเป็นไปได้ยากในการทำ PCR และจะเห็น band จางเนื่องจากได้ผลผลิตน้อย

จาก rule-of-thumb เมื่อออกแบบ PCR protocol ระยะเวลา 1 นาทีในขั้น extension สามารถสังเคราะห์ได้ 1,000 bp ดังนั้น ตามทฤษฎีหากใช้เวลา 2 นาทีจะสังเคราะห์ได้สูงสุดประมาณ 2,000 bp การเพิ่ม extension time ใน ISSR-PCR ไม่ได้ทำให้ได้ผลผลิตที่ดีกว่า ดังนั้น ไม่จำเป็นต้องใช้ระยะเวลามาก เพราะ PCR จะได้ผลผลิตเป็นสายสั้นๆ สุดท้ายนี้การบันทึกผล band ที่ขึ้นจะใช้สัญลักษณ์ 1= ขึ้น และ 0= ไม่ขึ้น (32)

การศึกษาก่อนหน้ามีการใช้เทคนิค ISSR มาใช้จำแนกสายพันธุ์ต้นแป้นน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) จำนวน 37 ตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย โดยมีการใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 ไพรเมอร์พบว่า สามารถแยกสายพันธุ์ของตัวอย่างที่นำมาได้ ซึ่งเมื่อแปลผลออกมา

พบว่า เป็ดน้อยในประเทศไทยมีลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันโดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ โดยผลลัพธ์บ่งชี้ว่าเทคนิค ISSR สามารถใช้แยก DNA marker ของทั้ง 37 ตัวอย่างได้และสัมพันธ์กับผลทดสอบการสกัดสาร pluanotal จากตัวอย่างซึ่งพบว่า ปริมาณสารสำคัญมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (33)

เคยมีการศึกษาการใช้เทคนิค ISSR ในการวิเคราะห์ความใกล้ชิดกันของสายพันธุ์ใน *Jurinea* species ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับกับขลุ่ย (Asteraceae) โดยออกแบบการทดลองดังนี้

1. Pre-denaturation 3 นาที ที่ 94 องศาเซลเซียส
2. Denaturation 1 นาที ที่ 94 องศาเซลเซียส
3. Annealing 50 วินาที อุณหภูมิขึ้นกับ T_m ของ primer
4. Extension 1 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส

โดยเตรียมปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 μ l ทำ PCR ทั้งสิ้น 40 รอบ ส่วน primer ที่ใช้มีทั้งสิ้น 8 primer ดังนี้

ตารางที่ 1. ISSR primer ในการวิเคราะห์ความใกล้ชิดกันของสายพันธุ์ *Jurinea* species วงศ์ Asteraceae

Primer	Primer sequence	T_m ($^{\circ}$ C)	Size (bp)
ISSR1	(ACC) ⁶ -G	63.1	19
ISSR2	(GA) ⁹ -C	56.7	19
ISSR3	(AG) ⁹ -C	56.7	19
ISSR4	(AC) ⁹ -G	56.7	19
ISSR8	(AC) ⁸ -CG	56	18
ISSR6	(AC) ⁸ -CC/T	54.8	18
ISSR7	CAG-(CA) ⁸	56.7	19
ISSR8	CGT-(CA) ⁸	56.7	19

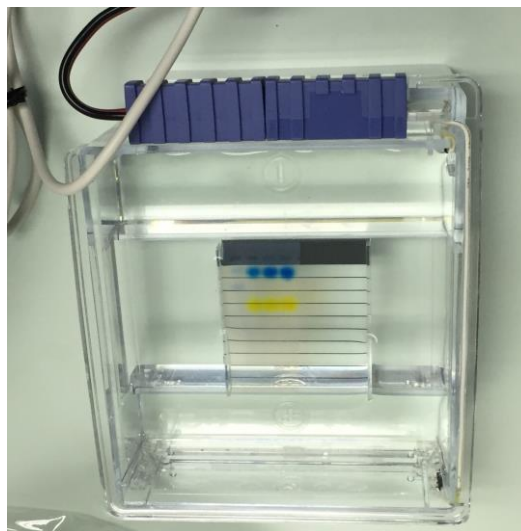
โดยปกติแล้วการแยก *Jurinea* species สามารถทำได้ยาก เนื่องจากมีลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกันแต่เมื่อใช้เทคนิค ISSR พบว่า สามารถแยก *Jurinea* species ออกได้เป็นสองกลุ่มหลักๆ ที่มีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกันมาก (34)

1.5.3 เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

เป็นเทคนิคที่ใช้แยกดีเอ็นเอหรือวิเคราะห์ขนาดและคุณภาพของดีเอ็นเอ ภายใต้สนามไฟฟ้า โดยผ่านตัวกลางคือ อะกาโรสเจล (agarose gel)

หลักการของวิธีนี้คือ โครงสร้างของดีเอ็นเอที่มีประจุโดยรวมเป็นลบ(หมู่ฟอสเฟต) เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จาก ขั้วลบไปสู่อั้วบวก ซึ่งดีเอ็นเอจะถูกแยกตามขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารแมคโครโมเลกุล (macromolecule) โดยเฉพาะสารพวกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก ที่มีขนาดและประจุที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในสาขาวิชาชีวเคมี biochemistry และ อนุชีววิทยา (molecular biology)



รูปที่ 8. Agarose gel electrophoresis of DNA

เมื่อโมเลกุลที่มีประจุ อยู่ในสนามแม่เหล็กไฟฟ้าโมเลกุลเหล่านั้นจะเกิดการเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกหรือขั้วลบ ซึ่งเป็นประจุตรงข้ามกับพวกมัน สำหรับโปรตีน (proteins) ที่อาจพบทั้งประจุ

สุทธิที่เป็นประจุบวกหรือลบ แตกต่างกับกรดนิวคลีอิก (nucleic acids) ที่ประกอบด้วย phosphate backbone ซึ่งเป็นเป็นประจุลบ จึงทำให้เคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก

Proteins และ nucleic acids จะถูกแยกโดยผ่านตัวกลาง (matrix) ในที่นี้คือเจล ซึ่งแผ่น gel ที่ใช้จะถูกทำให้อยู่ในรูปแผ่นบางๆและมีหลุมสำหรับใส่ sample โดยแผ่น gel จะถูกแช่อยู่ในสารละลาย electrophoresis buffer เพื่อทำให้ไอออนสามารถเคลื่อนที่ได้ และ ช่วยควบคุม pH ของสารละลายให้คงที่

Agarose เป็น polysaccharide ซึ่งสามารถสกัดได้จาก seaweed โดยความเข้มข้นที่นิยมใช้คือ 0.5 ถึง 2% agarose มีข้อดีคือสามารถเตรียมได้ง่ายโดยการละลายผง agarose ในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วให้ความร้อนเพื่อให้ละลายจนได้เนื้อเจลและอีกประการหนึ่งคือไม่มีพิษ

Agarose gels มีความสามารถในการแยกขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันได้ในช่วงกว้างแต่ประสิทธิภาพต่ำ โดยความสามารถในการแยกขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันขึ้นกับความเข้มข้นที่แตกต่างกันในการเตรียม agarose gel โดยปกติแล้ว gel electrophoresis สามารถใช้แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 200 ถึง 50,000 คู่เบส โดยการใช้เทคนิคพื้นฐาน standard electrophoretic techniques(35)

1.5.4 การตรวจความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง

ใช้หลักการการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ของกรดนิวคลีอิก ได้แก่ พิวรีน และไพริมิดีน ซึ่งจะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร แต่โปรตีนจะดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากนั้นนำมาคำนวณหาอัตราส่วนการดูดกลืนแสงของกรดนิวคลีอิกที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร หากได้ค่าที่อยู่ในช่วง 1.8-2.0 หมายถึงดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี แต่หากมีค่าน้อยกว่า 1.8 หมายถึงมีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือสารประกอบกลุ่มฟีนอลปนอยู่ ซึ่งควรนำไปผ่านขั้นตอนการเพิ่มความบริสุทธิ์ เนื่องจากหากมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการทำปฏิกิริยา PCR (19)

เอกสารอ้างอิง

1. MGR online. สิทธิบัตรใบกระท่อม การรุกรืบของโจรสลัดชีวภาพที่รัฐไทยไม่เคยจดจำ [อินเทอร์เน็ต]. 2559[เข้าถึงเมื่อ 25/11/59]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.manager.co.th/Weekend/ViewNews.aspx?NewsID=9590000090948>
2. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.). โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ระยะ 5 ปีที่ห้า (ตุลาคม 2554-กันยายน 2559). กรุงเทพฯ: โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.); 2554.
3. สุดารัตน์ หอมหวล. ขลุ่[อินเทอร์เน็ต]. 2553[เข้าถึงเมื่อ 20/06/59]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.phargarden.com/main.php>.
4. อรสา สุริยาพันธ์. ใบชา: ุคุณค่าทางโภชนาการฤทธิ์ทางชีวภาพและความเป็นพิษ [อินเทอร์เน็ต]. 2557[เข้าถึงเมื่อ 21/07/59]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/227/%E0%B9%83%E0%B8%9A%E0%B8%82%E0%B8%A5%E0%B8%B9%E0%B9%88-%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B9%82%E0%B8%A2%E0%B8%8A%E0%B8%99%E0%B9%8C-%E0%B9%82%E0%B8%97%E0%B8%A9-%E0%B8%A4%E0%B8%97%E0%B8%98%E0%B8%B4%E0%B9%8C-%E0%B8%84%E0%B8%A7%E0%B8%B2%E0%B8%A1%E0%B9%80%E0%B8%9B%E0%B9%87%E0%B8%99%E0%B8%9E%E0%B8%B4%E0%B8%A9/>
5. Kaewkhao J, Limsuwan P, P.Yupapin PPY, JanJai SJ, Sudjaroen Y. ISECEvaluation of ethnobotanical vegetables and herbs in Samut Songkram province. Procedia Engineering. 2012;32:160-5.
6. Suriyaphan O. Nutrition, Health Benefits and Applications of *Pluchea indica* (L.) Less Leaves. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014;41(4):1-10.

7. Gomes A, Archita S, Ipshita C, Chakravarty AK. Viper and cobra venom neutralization by β -sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* (L.) Less. (Asteraceae). *Phytomedicine*. 2007;14(9):637-43.
8. Sharmila G, Bhat FA, Arunkumar R, Elumalai P, Raja Singh P, Senthilkumar K, et al. Chemopreventive effect of quercetin, a natural dietary flavonoid on prostate cancer in *in vivo* model. *Clinical Nutrition*. 2014;33(4):718-26.
9. Mori H, Tanaka T, Shima H, Kuniyasu T, Takahashi M. Inhibitory effect of chlorogenic acid on methylazoxymethanol acetate-induced carcinogenesis in large intestine and liver of hamsters. *Cancer Letters*. 1986;30(1):49-54.
10. Biswas R, Dutta PK, Achari B, Bandyopadhyay D, Mishra M, Pramanik KC, et al. Isolation of pure compound R/J/3 from *Pluchea indica* (L.) Less. and its anti-amoebic activities against *Entamoeba histolytica*. *Phytomedicine*. 2007;14(7–8):534-7.
11. Roslida AH, Erazuliana AK, Zuraini A. Anti-Inflammatory and antinoceptive activities of the ethanolic extract of *Pluchea indica* (L.) LESS. leaf. *Pharmacologyonline* 2. 2008:349-60
12. Sen T, Chaudhuri AKN. Antiinflammatory evaluation of a *Pluchea indica* root extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 1990;33:135-41
13. Pramanik KC, Bhattacharya P, Biswas R, Bandyopadhyay D, Mishra M, Chatterjee T. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of leaf extract of *Pluchea indica* Less. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 2006 6(3), 232-236. 2006;6(3):232-6
14. Sen T, A. Basu RNR, Chaudhuri AKN. Hepatoprotective effects of *Pluchea indica* (Less) Extract in Experimental Acute Liver Damage in Rodents. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*. 1993;7:352-5.
15. Gomes A, Saha A, Chatterjee I, Chakravarty AK. Viper and cobra venom neutralization by β -sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less. (Asteraceae). *Phytomedicine*. 2007;14(9):637-43.

16. Yuliani, Soemarno, Yanuwadi B, Leksono AS. Total Phenolic and Flavonoid Contents Of *Pluchea indica* Leaves Extracts from Some Altitude Habitats. International Journal of ChemTech Research. 2015;8(4):1618-25.
17. Klinbantom R. ISSR ANALYSIS OF *Croton sublyratus* Kurz. IN THAILAND: Chulalongkorn University; 2004.
18. Endashaw Bekele MG, Kifle Dagne ALJ, Ian Barnes, Neil Bradman MGT. Molecular phylogeny of genus *Guizotia* (Asteraceae) using DNA sequences derived from ITS. Genet Resour Crop Evol. 2006;54:1419–27.
19. สุชาดา สุขห่อ. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2553.
20. สำนักงานราชบัณฑิตยสถาน. สายพันธุ์[Internet]. 2553[เข้าถึงเมื่อ 25/11/59]. เข้าถึงได้จาก <http://www.royin.go.th/?knowledges=%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A2%E0%B8%9E%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B8%98%E0%B8%B8%E0%B9%8C-%E0%B9%92%E0%B9%99-%E0%B8%98%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B8%A7%E0%B8%B2%E0%B8%84%E0%B8%A1-%E0%B9%92%E0%B9%95%E0%B9%95>
21. *Pluchea indica*(L.) Less., Asteraceae[Internet]. 2013[cited 2016/6/20]. Available from: http://www.hear.org/pier/species/pluchea_indica.htm
22. World! tMFot. The ribosomal DNA gene cluster[Internet]. 2002[cited 2016/7/20]. Available from: <https://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~bu6/index.html>
23. Biotech G. internal transcribed spacer[Internet]. 2016[cited 2016 7/04]. Available from: <http://www.gatc-biotech.com/en/products/inview-applications/inview-microbiome.html>
24. Rogers SO. Integrated Molecular Evolution: USA acid-free paper[Internet]. 2012[cited 2016/7/21]. Available from: https://books.google.co.th/books?id=xywnbQMKzXwC&pg=PA66&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.

25. Young ND, dePamphilis CW. Sketch of the plastid gene trnK and its matK-containing intron.: oxfordjournals; 2000.
26. Barthet MM. Expression and Function of the Chloroplast-encoded Gene matK.: faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University; 2006.
27. Abumourad IMK. Cytochrome C Oxidase Subunit-1(COX1) Gene in Tilapia(Oreochromis Niloticus): its Cloning and Characterization. International Journal of Genetic Engineering. 2011;1:1-5.
28. สุรินทร์ ปิยะโชติณากุล. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2552.
29. NCBI. Polymerase Chain Reaction (PCR). 2014.
30. วีระพงศ์ ลุฑิตานนท์, นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. พื้นฐานเทคนิค Polymerase Chain Reaction[อินเทอร์เน็ต]. 2551[เข้าถึงเมื่อ 20/06/59]. เข้าถึงได้จาก: http://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/17/Basic_PCR_June_08.pdf
31. Yan J, Wen-Ju Z, Da-Xu F, Bao-Rong L. Sampling Strategy Within a Wild Soybean Population based on Its Genetic Variation Detected by ISSR Markers. Acta Botanica Sinica 2003;45:995-1002.
32. Ng WL, Tan SG. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers:Are We Doing It Right? ASM Sci J. 2015;9(1):30-9.
33. รัฐพร กลิ่นบรรทม. การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์. Chulalongkorn University: Chulalongkorn; 2547.
34. Dogan B., Duran, A. & Hakki, E. E. 2007: Phylogenetic analysis of *Jurinea* (Asteraceae) species from Turkey based on ISSR amplification. *Ann. Bot. Fennici* 44: 353-358.
35. Principle of Gel Electrophoresis[Internet]. 2000[cited 2016/6/25]. Available from: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/principles.html>.
36. QIAGEN. DNeasy plant handbook[Internet]. 2015[cited 2016/7/26]. Available from:

<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=56ff54f2eeae39355963f1b1&assetKey=AS%3A346292619366400%401459574002159>

37. Thermo Fisher Scientific. Qubit Assay Kits[Internet]. 2016[cited 2016/6/20]. Available from: <https://www.thermofisher.com/th/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-assays.html>.
38. Agarose Gel Electrophoresis of DNA[Internet]. 2000[cited 2016/8/30]. Available from: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html>.
39. GeneDirex. OnePCR™ Plus[Internet]. 2013[cited 2016/7/30]. Available from: <http://www.genedirex.org//Protocol/MB207-0100.pdf>
40. Sigma-aldaich. Polymerase chain reaction[Internet]. 2016[cited 2016/8/30]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/polymerase-chain-reaction.html>
41. DNA Data Bank of Japan. *Pluchea indica*[Internet]. 2016[cited: 2016/6/25]. Available from: <http://ddbj.nig.ac.jp/arsa/>
42. Kitijuntaropas Y, Wansomnuk PP. Genetic Diversiry of Thirteen Cultivars of Para Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) in Thailand. Agricultural Sci. 2007;38(6):19-24.
43. นภาพร แก้วดวงดี, อนุชิวา แซ่ตั้ง. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์มะพร้าว. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ ปีที่ 12. 2555;1:108-20.