

บทที่ 2

บททวนเอกสาร

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพืชวงศ์ขิง

พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่จัดอยู่ในอันดับ Zingiberales ตามระบบของ Hutchison (Ridley, 1924) หรือ Scitamineae ตามระบบของ Bentham และ Hooker (Baker, 1890) พืชวงศ์ขิง เป็นพืชล้มลุกอายุหลายปีที่เจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นที่มีความชื้นสูง ศูนย์กลางการกระจายพันธุ์อยู่ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สามารถกระจายได้บริเวณกว้างตั้งแต่ความสูงระดับต่ำสุดจนถึงระดับสูง 2,000 เมตรจากระดับน้ำทะเล ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ดีในภูมิภาคอากาศร้อนชื้นของทวีปเอเชีย แอฟริกา อเมริกาและในบางส่วนของทวีปออสเตรเลีย ยุโรป และอเมริกาเหนือ (ภาพ 2.1) (Kress *et al.*, 2002) มีการบันทึกการค้นพบพืชวงศ์ขิงในหลายประเทศ เช่น ประเทศจีนพบจำนวน 21 สกุล 200 ชนิด ประเทศอินเดียพบจำนวน 18 สกุล 120 ชนิด ประเทศอินโดนีเซียพบจำนวน 14 สกุล 120 ชนิด ประเทศมาเลเซียพบจำนวน 25 สกุล 650 ชนิด ประเทศเนปาลพบจำนวน 11 สกุล 35 ชนิด ประเทศฟิลิปปินส์พบจำนวน 15 สกุล 103 ชนิด ประเทศไทยพบจำนวน 25 สกุล 270 ชนิดและทั่วโลกพบ จำนวน 52 สกุล 1,500 ชนิด (Larsen, 2002) พืชวงศ์นี้มีลักษณะพิเศษคือ ทุกส่วนของต้นมีกลิ่นของน้ำมันหอมระเหย มีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร ซึ่งมีน้ำมันประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด เป็นส่วนที่ทำให้พืชกลุ่มนี้มีกลิ่นฉุน และมีรสเผ็ด สารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย จะออกฤทธิ์กระตุ้นการบีบตัวของกระเพาะอาหารและลำไส้ ขับลม แก้ท้องอืด จุกเสียด แน่นเฟ้อ คลื่นไส้อาเจียน แก้อบอเอ ขับเสมหะ แก้บิด (กัลทิมา, 2554) ทำให้พืชสมุนไพรกลุ่มนี้เป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศ พืชวงศ์ขิงมีลักษณะภายนอกที่คล้ายกันมากและยังนิยมนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายรูปแบบ ทั้งในรูปของยารักษาโรค อาหารเสริม เครื่องสำอาง ยาแก้ปวดศีรษะ เป็นต้น ทำให้ไม่สามารถใช้ข้อมูลทางด้านอนุกรมวิธานมาใช้ในการจัดจำแนกได้ สมุนไพรไทยนอกจากมีคุณค่าทางด้านสุขภาพแล้วยังมีคุณค่าด้านวัฒนธรรม สมุนไพรวงศ์ขิงเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่สร้างรายได้ให้แก่ประเทศ ตลอดจนคุณค่าด้านสิ่งแวดล้อมและการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ



ภาพที่ 2.1 การกระจายพันธุ์ของพืชวงศ์ขิง (Kress *et al*, 2001)

2.2 ประวัติการสำรวจพรรณพฤกษชาติพืชวงศ์ขิงของประเทศไทย

การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างพันธุ์ไม้ในประเทศไทยได้เริ่มต้นขึ้นในปี ค.ศ. 1690 โดย นายแพทย์ชาวเยอรมันชื่อ Engelbert Kaempfer ได้เดินทางมายังประเทศไทย (ขณะนั้นยังใช้ชื่อว่า สยาม) เพื่อสำรวจและเก็บข้อมูลทางด้านภาษา สถาปัตยกรรม ปรากฏการณ์ทางธรรมชาติ รวมทั้ง พรรณไม้ต่างๆ ในประเทศไทย สันนิษฐานว่าตัวอย่างพันธุ์ไม้ที่รวบรวมได้ในคราวนั้นคงสูญหายไป เนื่องจากไม่มีหลักฐานปรากฏในเวลาต่อมา อย่างไรก็ตามมีพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ท่านได้เก็บและ วาดรูปไว้พร้อมคำบรรยายลักษณะพืชชนิดนี้อย่างละเอียดและได้ส่งไปให้ Carolus Linnaeus นัก ชีววิทยาผู้ที่ได้รับสมญานามว่า “บิดาแห่งวิชาอนุกรมวิธาน” ที่ประเทศสวีเดน และ Carolus Linnaeus ได้ตั้งชื่อพืชชนิดนี้เพื่อเป็นเกียรติแก่ Engelbert Kaempfer ว่า *Kaempferia galanga* ชื่อไทย คือ “เปราะหอม” ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่รู้จักกันแพร่หลายทั่วประเทศไทย ปี ค.ศ. 1779 J.G. Koenig ชาวลัตเวีย หลังจากศึกษาพฤกษศาสตร์กับ Carolus Linnaeus ที่มหาวิทยาลัย Uppsala ประเทศสวีเดน ได้มาทำงานเป็นนักพฤกษศาสตร์อยู่ที่ประเทศเดนมาร์ก ได้เดินทางมาสำรวจพรรณ ไม้ในประเทศไทย โดยเฉพาะบริเวณจังหวัดภูเก็ตและจันทบุรี ได้ตัวอย่าง พันธุ์ไม้เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะวงศ์กล้วยไม้และวงศ์ขิง ซึ่งมีหลายชนิดในวงศ์ขิงที่ถูกตั้งชื่อเป็นชนิดใหม่ของโลก เช่น *Amomum uliginosum* Koenig (กระวานป่า) *Hedychium coronarium* Koenig (มหาหงส์) และ *Hornstedtia leonurus* Koenig (ปุดเข่งเล็ก) เป็นต้น ระหว่างปี ค.ศ. 1899-1990 Johann Schmidt นักพฤกษศาสตร์ชาวเดนมาร์กได้สำรวจพรรณไม้บริเวณเกาะช้าง จังหวัดตราดและเก็บ ตัวอย่างพันธุ์ไม้ได้ประมาณ 550 เลขหมาย แม้จำนวนไม่มากนัก แต่มีอยู่หลายชนิดที่เดียวที่เป็นชนิด ใหม่ของโลก ต่อมาตัวอย่างพันธุ์ไม้เหล่านี้ได้ถูกนำมาศึกษาและตีพิมพ์ในหนังสือ “พรรณพฤกษชาติ ของเกาะช้าง” (Flora of Koh Chang) นับเป็นหนังสือพรรณพฤกษชาติเล่มแรกของไทย

นอกจากนั้นได้มีนักพฤกษศาสตร์ที่มีชื่อเสียงชาวเยอรมันผู้หนึ่งชื่อ Karl Moritz Schumann ซึ่งกำลังศึกษาพืชวงศ์จิงอยู่ในขณะนั้น ได้ศึกษาตัวอย่างพันธุ์ไม้วงศ์จิงที่ Johann Schmidt ได้เก็บรวบรวมจากประเทศไทยและได้บรรยายเสนอตั้งชื่อเป็นชนิดใหม่ของโลกหลายชนิด ตัวอย่างที่รู้จักกันและสามารถพบได้ไม่ยากนัก เช่น *Elettariopsis schmidtii* K. Schum. ปัจจุบันคือ *Amomum biflorum* Jack (ว่านสาวหลง) และ *Alpinia oxymitra* K. Schum. (หลาว หรือ ปุคใหญ่) ปี ค.ศ. 1902 นายแพทย์ A.F.G. Kerr ชาวไอร์แลนด์ได้เข้ามาทำงานในประเทศไทยในฐานะที่ปรึกษาด้านการแพทย์ที่จังหวัดเชียงใหม่และเป็นผู้ที่สนใจพรรณไม้มาก ขณะทำงานอยู่ที่นี้ได้ใช้เวลาว่างเก็บรวบรวมตัวอย่างพันธุ์ไม้ไปด้วย ต่อมาจึงได้รับการสนับสนุนจากสวนพฤกษศาสตร์ KEW ในประเทศอังกฤษให้สำรวจและเก็บรวบรวมพรรณไม้ทั่วประเทศไทย จึงได้หันมาทุ่มเทให้กับงานด้านพฤกษศาสตร์มากกว่าด้านการแพทย์ จนกลายมาเป็นนักพฤกษศาสตร์ในที่สุด ต่อมาในปี ค.ศ. 1920 ได้รับแต่งตั้งให้เป็นผู้อำนวยการกองตรวจพันธุ์รุกขชาติของประเทศไทยเป็นคนแรก (ปัจจุบันคือพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ อาคารสิรินธร กรมวิชาการเกษตร) นายแพทย์ Kerr เป็นนักพฤกษศาสตร์ที่มีชื่อเสียง มีผลงานที่ยิ่งใหญ่และมีความสำคัญต่อพรรณพฤกษชาติของไทย นับว่าเป็นบุคคลแรกที่เก็บตัวอย่างพันธุ์ไม้ในประเทศไทยได้มากเกินกว่า 23000 เลขหมาย ตัวอย่างพันธุ์ไม้แห่งเลขหมายซ้ำ (duplicate) ชุดหนึ่งได้เก็บรักษาไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ (BK) ส่วนอีกชุดหนึ่งเก็บที่สวนพฤกษศาสตร์ KEW ตัวอย่างพันธุ์ไม้ที่เก็บรวบรวมโดยนายแพทย์ Kerr ส่วนใหญ่มีความสมบูรณ์และอยู่ในสภาพที่ดีแม้ว่าจะเก็บไว้นานเกือบร้อยปีแล้วก็ตาม ตัวอย่างพันธุ์ไม้เหล่านี้มีคุณค่าและมีความสำคัญมากต่อการศึกษาพรรณพฤกษชาติของประเทศไทยในเวลาต่อมา ซึ่งมีเป็นร้อยชนิดที่ตั้งชื่อเป็นชนิดใหม่ของโลก ตัวอย่างสำหรับวงศ์จิง เช่น *Geostachys kerrii* K. Larsen (ปุดเข่ง) *Zingiber kerrii* Craib (ชิงดา) เป็นต้น ปี ค.ศ. 1947 จนถึงปัจจุบัน การสำรวจและเก็บตัวอย่างพันธุ์ไม้มีความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก มีผลงานจำนวนมากจากนักพฤกษศาสตร์ทั้งชาวไทยและต่างประเทศ อีกทั้งได้มีการศึกษาทบทวน (taxonomic revision) พรรณพืชไทยทั้งระดับสกุลและระดับวงศ์เพิ่มมากขึ้น และสามารถดำเนินการจัดพิมพ์หนังสือ Flora of Thailand ได้สำเร็จเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1970 นั่นคือ Volume 2. Part 1 (สำหรับ Volume 1 เป็นบทนำได้เว้นไว้ตีพิมพ์ในภายหลัง) โดยมีศาสตราจารย์เต็ม สมิตินันท์ ผู้เชี่ยวชาญพันธุ์ไม้และเป็นผู้เชี่ยวชาญพืชเขตร้อน เป็นบรรณาธิการร่วม แม้ในระยะแรกๆ ผลงานออกมาก่อนข้างช้า แต่ในระยะต่อมาจวบจนปัจจุบันการศึกษาทบทวนพรรณพฤกษชาติของไทยมีความก้าวหน้ามาก

2.3 ความก้าวหน้าการศึกษาพืชวงศ์จิงในประเทศไทย

การศึกษาทบทวนสกุลต่างๆ ของพืชวงศ์จิงในประเทศไทย สรุปได้ดังนี้ สกุลที่มีพืชอยู่เพียงชนิดเดียว (monotypic genus) พบได้ 6 สกุล (คือ *Camptandra*, *Cautleya*, *Haniffia*, *Pommereschea*, *Siamanthus* และ *Smithatris*) สกุลที่มีพืชตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปแต่ต่ำกว่า 10 ชนิดมีอยู่ประมาณ 9 สกุล รวมสกุลที่มีจำนวนชนิดพืชต่ำกว่า 10 ชนิด ประมาณ 15 สกุล ส่วนสกุลที่มีพืชตั้งแต่ 10 - 50 ชนิด มีประมาณ 10 สกุล ได้แก่

2.3.1 สกุล *Alpinia* (สกุลข่า) เป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดของพืชวงศ์จิง คาดว่าทั่วโลกมีมากกว่า 250 ชนิด และมีผลการวิจัยในเบื้องต้นว่า ในประเทศไทยพบพืชสกุลข่าประมาณ 18 ชนิด อย่างไรก็ตาม เชื่อว่าหากมีการสำรวจใหม่อย่างจริงจัง น่าจะพบพืชในสกุลนี้เพิ่มขึ้นอีก (Saensouk, 2006)

2.3.2 สกุล *Amomum* (สกุลกระวาน) เป็นสกุลที่มีขนาดใหญ่ เป็นอันดับสองของวงศ์ คาดว่าทั่วโลกมีไม่ต่ำกว่า 150 ชนิด และมีรายงานว่าพบพืชสกุลนี้ในประเทศไทยประมาณ 36 ชนิด (Kaewsri et al., 2006)

2.3.3 สกุล *Boesenbergia* (สกุลกระชาย) เป็นสกุลขนาดกลางของวงศ์มีจำนวนประมาณ 40 ชนิด

2.3.4 สกุล *Caulokaempferia* สกุลนี้ตั้งชื่อโดย Kai Larsen (Larsen, 1964) และได้บรรยายเสนอตั้งชื่อชนิดใหม่ของโลกอีกหลายชนิด ในประเทศไทยมีมากกว่า 10 ชนิด

2.3.5 สกุล *Curcuma* (สกุลขมิ้น-กระเจียว) เป็นสกุลขนาดใหญ่อีกสกุลหนึ่งของพืชวงศ์จิง คาดว่ามีจำนวนไม่ต่ำกว่า 80 ชนิด เป็นสกุลที่ยากต่อการจัดจำแนก เนื่องจากมีความแปรผันสูงมาก มีรายงานว่าในประเทศไทยมีพืชสกุล *Curcuma* ประมาณ 38 ชนิด และพบชนิดใหม่ของโลกหลายชนิด (Maknoi, 2006)

2.3.6 สกุล *Etlingera* (สกุลดาหลา) พืชสกุลนี้มีลำต้นเหนือดิน (คือ “ลำต้นเทียม” ที่เกิดจากกาบใบโอบกันแน่นและชูตั้งขึ้นเหนือดิน) สูงถึง 3 เมตรหรือมากกว่า นับเป็นพืชที่มีขนาดใหญ่และสูงที่สุดของวงศ์นี้ มีจำนวนประมาณ 60 ชนิด มีเขตการกระจายพันธุ์ในภูมิภาคมาเลเซีย (Malesia) ซึ่งครอบคลุมทางภาคใต้ของไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย บรูไน หมู่เกาะฟิจิ และ

ฟิลิปปินส์ ในประเทศไทยมีพืชสกุลนี้ประมาณ 12 ชนิด มีอยู่ชนิดเดียวเท่านั้นที่พบทางภาคเหนือและภาคกลาง คือ ปูดเมืองกาน (*Etlingera araneosa* (Bak.) R.M. Smith) นอกนั้นพบทางภาคใต้ของไทย โดยเฉพาะบริเวณใต้สุดติดชายแดนประเทศมาเลเซีย

2.3.7 สกุล *Globba* (สกุลข่าลิง) เป็นหนึ่งในสกุลใหญ่ของวงศ์ขิง ที่มีจำนวนเกินกว่า 100 ชนิด คาดว่าพบได้ในประเทศไทยประมาณ 40 ชนิด

2.3.8 สกุล *Hedychium* (สกุลมหาหงส์) เบื้องต้นมีรายงานจำนวน 18 ชนิดที่พบในประเทศไทยโดยเสนอรูปริธาน (key) ตรวจสอบชนิดที่พิมพ์พร้อมด้วยชนิดใหม่ของโลก 3 ชนิดโดยศาสตราจารย์ Kai Larsen เป็นผู้เขียนร่วม (Sirirugsa et al., 1995)

2.3.9 สกุล *Kaempferia* (สกุลเปราะ) ประเมินว่าสกุลนี้พบในประเทศไทยได้ถึง 25 ชนิด

2.3.10 สกุล *Zingiber* (สกุลขิง) เป็นสกุลใหญ่อีกสกุลหนึ่งของวงศ์ขิง คาดว่าทั่วโลกมีประมาณ 100 ชนิด หลังจากนั้นได้มีผู้ศึกษาสกุลนี้ต่อเนื่อง และมีผลงานสรุปว่าสกุลขิงในประเทศไทยมีประมาณ 56 ชนิด (Triboun, 2006)

2.4 พืชวงศ์จิงที่ใช้ในการวิจัย

พืชวงศ์จิงที่ใช้ในงานวิจัยมีทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ จิง (*Zingiber officinale*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*) กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) กระชาย (*Boesenbergia rotunda*) ไพล (*Zingiber montanum*) ข่า (*Alpinia galanga*) และกระวาน (*Amomum uliginosum*) โดยจะกล่าวถึงข้อมูลทางพฤกษศาสตร์และสรรพคุณทางสมุนไพรของพืชแต่ละชนิด โดยอ้างอิงข้อมูลจากหนังสือสรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด (สุนทรี, 2536)

2.4.1 จิง



ภาพที่ 2.2 จิง (*Zingiber officinale* Roscoe)
(Flora of China Volume 24)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Zingiber officinale* Roscoe

ชื่อสามัญ : Ginger

ชื่ออื่น : จิงแคง จิงแดง (จันทบุรี) จิงเผือก (เชียงใหม่) สะเอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน สีนํ้าตาลแกมเหลือง เนื้อในสีนวล มีกลิ่นเฉพาะ จะแทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นมาเหนือพื้นดิน ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ รูปขอบขนาน แกมรูปใบหอก กว้าง 1.5-2 ซม. ยาว 15-20 ซม. ขอบใบเรียบ แผ่นใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ดอก ออกเป็นช่อ แทงออกจากปลายยอด ใบประดับเรียงเวียนสลับสีเขียวอ่อน ดอกสีเหลืองแกมเขียว ผล เป็นผลแห้ง ทรงกลม ขนาดประมาณ 1 ซม. เป็น 3 พู เมล็ดหลายเมล็ด

ส่วนที่ใช้ : เหง้าแก่สด ต้น ใบ ดอก ผล

สารเคมี : เหง้าพบ Gingerol Zingiberene, Zingiberone Zingiberonol, Shogol, Fenchone, Camphene Cineol Citronellol ในน้ำมันหอมระเหย พบสาร Bisabolene, Zingiberone Zingiberol, Zingiberene, Limonene, Citronellol Gingerol, Camphene, Borneol, Cineol ทั้งต้นพบ Gingerol ใบพบ Shikimic acid

สรรพคุณ :

- เหง้าแก่สด เป็นยาแก้ไอเจียน ยาชมหจรีญอาหาร ยาแก้ท้องขึ้น ท้องอืดเพื่อ ขับลม แก้ไอ ขับเสมหะ บำรุงธาตุ สามารถต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ลดอาการจุกเสียดได้ดี มีฤทธิ์ในการขับน้ำดี เพื่อย่อยอาหาร แก้ปากคอเปื่อย แก้ท้องผูก ลดความดันโลหิต
- ต้น เป็นยาขับผายลม แก้จุกเสียดแน่นเฟ้อ แก้น้ำ บำรุงไฟธาตุ แก้คอเปื่อย ช่วยย่อยอาหาร ฆ่าพยาธิ แก้โรคตา แก้บิด แก้ลมป่วง แก้ท้องร่วงอย่างแรง แก้อาเจียน
- ใบ แก้โรคกำเดา ขับผายลม แก้น้ำแก้เบาซัด แก้คอเปื่อย ช่วยย่อยอาหาร ฆ่าพยาธิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.2 ขมิ้นชัน



ภาพที่ 2.3 ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.)
(Flora of China Volume 24)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Curcuma longa* L.

ชื่อสามัญ : Turmeric

ชื่ออื่น : ขมิ้น (ทั่วไป) ขมิ้นแกง ขมิ้นหยวก ขมิ้นหัว (เชียงใหม่) ขมิ้น หมิ้น (ภาคใต้)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุก อายุหลายปี สูง 30-90 ซม. เหง้าใต้ดินรูปไข่มีแขนงรูปทรงกระบอกแตกออกด้านข้าง 2 ด้าน ตรงกันข้ามเนื้อในเหง้าสีเหลืองส้ม มีกลิ่นเฉพาะ ใบเดี่ยว แทงออกมาเหง้าเรียงเป็นวงซ้อนทับกันรูปใบหอก กว้าง 12-15 ซม. ยาว 30-40 ซม. ดอกช่อ แทงออกจากเหง้า แทรกขึ้นมาระหว่างก้านใบ รูปทรงกระบอก กลีบดอกสีเหลืองอ่อน ใบประดับสีเขียวอ่อนหรือสีนวล บานครั้งละ 3-4 ดอก ผล รูปกลมมี 3 พู

ส่วนที่ใช้ : เหง้าแก่สด และแห้ง

สารเคมี : ราก และ เหง้า มี tumerone, zingerene, bisabolone, zingiberene, sabinene, alpha-phellandrene, curcumone, curcumin

สรรพคุณ :

1. เป็นยาภายใน แก้ท้องอืด แก้ท้องร่วง แก้โรคกระเพาะ
2. เป็นยาภายนอก ทาแก้ผื่นคัน โรคผิวหนัง พุพอง ขาอักเสบคันและหนังศีรษะเป็นเม็ดคัน

2.4.3 ขมิ้นอ้อย



ภาพที่ 2.4 ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria* Roscoe)
(Köhler, 2007)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Curcuma zedoaria* Roscoe

ชื่ออื่น : ขมิ้นชัน ขมิ้นเหลือง ขมิ้นเจดีย์ ว่านเหลือง ละเมียด (เขมร) สากกะเบือ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : เป็นพืชจำพวกเหง้า ต้นแห้งในฤดูร้อน งอกงามในฤดูฝน ต้นและใบโตกว่าขมิ้นชัน เหง้าหลักรูปไข่ตั้ง ส่วนหนึ่งอยู่ใต้ดิน ส่วนปลายไหลพาดดินขึ้นมาเล็กน้อย แขนงย่อยแยกออกอีกเป็นจำนวนมาก ผิวด้านนอกสีขาวอมเหลือง เนื้อในสีเหลืองเข้ม เมื่อกาบใบแห้งไป เหลือแต่เหง้าไหลพาดดินขึ้นมา เหมือนเจดีย์ทรงกลมสูงหลายๆ ชั้น เรียกว่า ขมิ้นหัวขึ้น หรือขมิ้นเจดีย์ ใบเดี่ยวเรียงสลับรอบลำต้น ใบรูปหอกแกมขอบขนาน ปลายใบเรียวแหลม โคนใบแคบผิวใบนูนตามลายเส้นใบ เส้นกลางใบเป็นร่องเล็กน้อย ก้านใบเป็นกาบหุ้มลำต้น กลางก้านเป็นร่องลึกตลอดความยาว ดอกออกเป็นช่อ แทงช่อขึ้นมาจากหัวใต้ดิน ดอกย่อยสีขาว ใบประดับตอนล่างสีเขียว ตอนบนสีชมพูอมม่วง ก้านดอกเป็นหลอดปลายแผ่เป็นแฉกสีเหลือง

สรรพคุณ :

- ใบ รสเฝื่อน ขับปัสสาวะ แก้ไข้บวม
- เหง้า รสเฝื่อน แก้คลื่นเหียนคลื่นตัว สมานลำไส้ แก้ระดูขาว ขับปัสสาวะ ตำพอกแก้ฟกบวม แก้อักเสบ แก้พิษโลหิต แก้ลม รักษาเมเร็ง เนื่องจากธรรมชาติของกล้ามเนื้อมดลูก รักษาอาการเลือดคั่ง เลือดลมไหลเวียนไม่สะดวก รักษากระดูกไม่ปกติ
- เหง้าสดตำผสมกับการบูรเล็กน้อย ค่อน้ำฝนกลางหาว รินเอาน้ำหยอดตา แก้ตาแดง ตาแฉะ ตามัว ตาพิการ หรือหัวใช้สมานแผล ใช้ผสมปรุงยาท้องอืดเฟ้อ

2.4.4 กระชายดำ



ภาพที่ 2.5 กระชายดำ (*Kaempferia parviflora* wall. ex Baker)
(Schlechter, 1985)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Kaempferia parviflora* wall. ex Baker

ชื่ออื่น : ว่านจิ้งจก ว่านพญานกยูง ว่านกันบัง ว่านกำบัง ว่านกำบังภัย

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: เป็นพืชล้มลุกมีเหง้าใต้ดิน รากสะสมอาหารมีลักษณะเป็นปุ่ม ๆ ไม่ยาวเป็นหางไหลเหมือนกับกระชาย ธรรมชาติจะมีแต่รากและรากนั้นเองจะเปลี่ยนเป็นหัวเมื่อโตขึ้น เนื้อในหัวอาจเป็นสีม่วงหม่นหรือสีดำดังผลลูกหว้า แต่ถือกันว่ากระชายดำที่มีคุณสมบัติที่ดีต้องสีดำสนิท ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับคล้ายกระชายธรรมดา แต่มีใบใหญ่และเขียวเข้มกว่าผลิแทงม้วนเป็นกรวยขึ้นมาราก ไม่มีดิน ดอก จะออกดอกจากยอดของต้น ช่อละหนึ่งดอก มีใบเลี้ยงที่ช่อดอก ริมปากดอกสีขาว เส้นเกสรสีม่วง และเกสรมีสีเหลือง

- ต้น กระชายดำเป็นพรรณไม้ล้มลุก ขนาดลำต้นสมบูรณ์เต็มที่สูงประมาณ 30 ซม. ส่วนของแกนกลางลำต้นจะมีลักษณะแข็ง มีกาบใบที่อวบหนา นุ่ม หุ้มแกนลำต้นไว้ ลำต้นโดยรวมจะอวบอูมน้ำเหมือนกับพืชล้มลุกทั่วไป
- ใบ ใบของกระชายดำ เป็นใบเลี้ยงเดี่ยว ออกเรียงสลับซ้อนกันเป็นรูปกรวย และจะแยกออกจากกันเป็นอิสระเมื่อโตขึ้น สีของใบกระชายดำเมื่อเริ่มแตกใบอ่อนจะมีสีเขียวเข้มม่วง

อมแดง และจะค่อยๆ สีจางไปเป็นสีเขียวเข้ม เส้นขอบใบจะมีสีแดงระเรื่อ หรืออมชมพูคล้ายรอยไหม้ กาบใบจะยาวเป็นร่อง แทงขึ้นมาจากหัวที่อยู่ในดิน ใบมีกลิ่นหอมเฉพาะขนาดของใบกว้างประมาณ 7-20 ซม. ยาวประมาณ 30-40 ซม. ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของ ธาตุอาหารในดิน หรือการดูแลรักษา

- เหง้า รูปทรงกลม เรียงต่อกัน มักมีขนาดเท่าๆกัน หลายเหง้า อวบน้ำ ผิวเหง้าสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม อาจพบรอยที่ผิวเหง้าเป็นบริเวณที่จะงอกของต้นใหม่ เนื้อภายในสีม่วงอ่อน ม่วงเข้ม จนถึงสีม่วงดำ มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว รสชาติขมเล็กน้อย

สารเคมี : 1.8 - Cineol , Boesenbergin A, dl - Pinostrobin , Camphor สารจากเหง้า กระชาย มีประสิทธิภาพ การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ได้ผลกับเชื้อแบคทีเรียดีกว่าเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย ที่ได้ผลคือ *Bacillus subtilis*, แบคทีเรียในลำไส้ และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในขับลม ช่วยให้กระเพาะและลำไส้เคลื่อนไหว และเจริญอาหาร กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ศึกษาและรายงานว่ามีพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักร

สรรพคุณ : รสเผ็ดร้อนขม แก้ปวดมวนในท้อง แก้ท้องอืดเฟ้อและบำรุงกำลัง ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ ในเหง้ากระชายดำมีสารสำคัญคือ น้ำมันหอมระเหย (Essential oil) แต่พบว่ามีจำนวนน้อย มีรายงานว่าได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยประมาณ 0.08 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.5 กระชาย



ภาพที่ 2.6 กระชาย (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.)
(Flora of China Volume 24)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.

ชื่อสามัญ : Kaempfer

ชื่ออื่น : กระชาย กระแอน จิงทราย (มหาสารคาม) จี๊ปู ซีฟู เปาซอไร๊ะ เป้าสี่ระแอน (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) ละแอน (ภาคเหนือ) ว่านพระอาทิตย์ (กรุงเทพฯ)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุก มีเหง้าสั้น แตกหน่อได้ รากอวบ รูปทรงกระบอกหรือรูปไข่ค่อนข้างยาว ปลายเรียว กว้าง 1-2 ซม. ยาว 4-10 ซม. ออกเป็นกระจุก ผิวสีน้ำตาลอ่อน เนื้อในสีเหลือง มีกลิ่นเฉพาะตัว ส่วนที่อยู่เหนือดินเป็นใบ มี 2-7 ใบ ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปรี กว้าง 5-12 ซม. ยาว 12-50 ซม. ปลายเรียวแหลม โคนมนหรือแหลม ขอบเรียบ เส้นกลางใบ ก้านใบ และกาบใบด้านบนเป็นร่อง ด้านล่างนูนเป็นสัน ก้านใบเรียบ ยาว 7-25 ซม. กาบใบสีชมพู ยาว 7-25 ซม. ระหว่างก้านใบและกาบใบมีลิ้นใบ ช่อดอกแบบช่อเชิงลด ยาวประมาณ 5 ซม. แต่ละดอกมีใบประดับ 2 ใบ สีขาวหรือขาวอมชมพูอ่อน รูปใบหอก กว้างประมาณ 8 มม. ยาว 3.5-4.5 ซม. กลีบเลี้ยงสีขาวหรือขาวอมชมพูอ่อน โคนติดกันเป็นหลอด ยาวประมาณ 1.7 ซม. ปลายแยกเป็น 3 แฉก กลีบดอกสีขาวหรือขาวอมชมพูอ่อน โคนติดกันเป็นหลอด ยาวประมาณ 6 ซม. ปลายแยกเป็น 3 กลีบ รูปใบหอก ขนาดไม่เท่ากัน กลีบใหญ่ 1 กลีบ กว้างประมาณ 7 มม. ยาวประมาณ 1.8 ซม. อีก 2 กลีบ ขนาดเท่ากัน กว้างประมาณ 5 มม. ยาวประมาณ 1.5 ซม.

สารเคมี : ทั้งส่วนรากและส่วนต้น ประกอบด้วยสาร alpinetin, pinocembrin, cardamonin, boesenbergin A, pinostrobin และน้ำมันหอมระเหย และในส่วนรากยังพบ chavicolonic acid อีกด้วย

สรรพคุณ :

- เหง้าใต้ดิน - มีรสเผ็ดร้อนขม แก้ปวดท้อง มวนในท้อง ท้องอืดท้องเฟ้อ บำรุงกำลัง บำรุงกำหนด แก้ลมตายด้าน เป็นยารักษาโรคผิวหนัง
- เหง้า ราก และใบ - แก้บิดมูกเลือด เป็นยาขับปัสสาวะ แก้ปัสสาวะพิการ ใช้เป็นยาภายนอก รักษาฝีกลาก ใบ ใช้บำรุงธาตุ แก้โรคในปาก คอ แก้โลหิตเป็นพิษ ถอนพิษต่างๆ



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.6 ไพล



ภาพที่ 2.7 ไพล (*Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr.)
(Roscoe, 1828)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr.

ชื่อพ้อง : *Zingiber purpureum* Roscoe

ชื่ออื่น : ปุลอย ปุลย (ภาคเหนือ) ว่านไฟ (ภาคกลาง) มันสะล่าง (ฉาน-แม่ฮ่องสอน)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุกสูง 0.7-1.5 เมตร มีเหง้าใต้ดิน เปลือกสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในสีเหลืองถึงเหลืองแกมเขียว แทะหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นเป็นกอ ซึ่งประกอบด้วย กาบหรือโคนใบหุ้มซ้อนกัน ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปขอบขนานแกมใบหอก กว้าง 3.5-5.5 เซนติเมตร ยาว 18-35 เซนติเมตร ดอกช่อ แทงจากเหง้าใต้ดิน กลีบดอกสีนวล

สารเคมี : Alflabene : 3,4 - dimethoxy benzaldehyde, curcumin, beta-sitosterol, Volatile Oils

สรรพคุณ :

- เหง้า เป็นยาแก้ท้องขึ้น ท้องอืดเฟ้อ ขับลม แก้บิด ท้องเดิน ขับประจำเดือนสตรี ทาแก้ฟกบวม แก้คันคัน เป็นยารักษาหิด เป็นยากันเล็บถอด ใช้ต้มน้ำอาบหลังคลอด
- หัว ช่วยขับระดู ประจำเดือนสตรี เลือดร้าย แก้มุตกิตระดูขาว แก้อาเจียน แก้ปวดฟัน
- ดอก ขับโลหิตกระจายเลือดเสีย
- ต้น แก้ธาตุพิการ แก้อุจจาระพิการ
- ใบ แก้ไข้ ปวดเมื่อย แก้ก้นนื้อครันตัว แก้เมื่อย

2.4.7 ข่า



ภาพที่ 2.8 ข่า (*Alpinia galanga* (L.) Willd.)
(Stüber, 1813)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Alpinia galanga* (L.) Willd.

ชื่อสามัญ : Galanga

ชื่ออื่น : ข่าหยวก ข่าหลวง (ภาคเหนือ) , กุกกักรโห้ (ภาคกลาง)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุก สูง 1.5-2 เมตร เหนือมีข้อและปล้องชัดเจน ใบ เดี่ยว เรียงสลับ รูปใบหอก รูปวงรีหรือเกือบขอบขนาน กว้าง 7.9 ซม. ยาว 20-40 ซม. ดอก ช่อ ออกที่ยอด ดอกย่อยขนาดเล็ก กลีบดอกสีขาว โคนติดกันเป็นหลอดสั้นๆ ปลายแยกเป็น 3 กลีบ กลีบใหญ่ที่สุดมีริ้วสีแดง ใบประดับรูปไข่ ผล เป็นผลแห้งแตกได้ รูปกลม

สารเคมี : 1 - acetoxychavicol acetate น้ำมันหอมระเหย ซึ่งประกอบด้วย monoterene 2 - terpineol, terpenen 4 - ol, cineole, camphor, linalool, eugenol

สรรพคุณ : เป็นยาแก้ท้องขึ้น ท้องอืดเฟ้อ ขับลม แก้อาหารเป็นพิษ เป็นยาแก้ลมพิษ เป็นยารักษากลากเกลื้อน โรคผิวหนัง ดัดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา

2.4.8 กระวาน



ภาพที่ 2.9 กระวาน (*Amomum uliginosum* Koenig ex Retz.)
(Plant Resources of South-East Asia No.12)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Amomum uliginosum* Koenig ex Retz.

ชื่ออื่น : เร่ว

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ลักษณะวิสัย เป็นไม้ล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน ลำต้นเหนือดิน สูง 2.5-4 เมตร มีเหง้า ใต้ดิน ลักษณะใบ ใบรูปขอบขนาน หรือรูปหอก ยาว 40-60 เซนติเมตร กว้าง 7-10 เซนติเมตร ฐานใบรูปลิ้น ปลายใบแหลมมีติ่งแหลม ขอบใบเรียบ ผิวใบด้านบนบนเกลี้ยง ผิวใบด้านล่างมีขนสีน้ำตาล ลักษณะดอก ช่อดอกแบบช่อกระจุก เกิดจากตาเหง้าบริเวณโคนของลำต้นเหนือดิน มีดอกย่อยประมาณ 15 ดอก กลีบเลี้ยงสีขาวปนชมพูอ่อน กลีบดอกสีขาว เกสรเพศผู้สีขาวมีสีชมพูอ่อนที่โคน เกสรเพศผู้ที่สมบูรณ์ มี 1 อัน เกสรเพศเมียมีรังไข่อยู่ใต้กลีบ ลักษณะผล เป็นผลเป็นผลแห้ง เมื่อสุกมีสีแดง ภายในมีเมล็ดสีน้ำตาล รวมกลุ่มเป็น 3 กลุ่ม กลั่นกลายการบูร

สรรพคุณ : เมล็ด เป็นยาขับลม แก้ปวดท้อง และเป็นเครื่องเทศ

2.5 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode)

barcode ซึ่งปรากฏอยู่ด้านหลังสินค้าบรรจุหีบห่อที่วางขายทั่วไปนั้นเปรียบเสมือนรหัสสินค้าที่ทำให้ผู้ขายสามารถแยกประเภทและระบุราคาของสินค้าได้อย่างรวดเร็วผ่านเครื่องอ่านรหัสสินค้า ในทำนองเดียวกัน หลักการของ DNA barcode เกิดจากแนวคิดที่ต้องการสร้างรหัสประจำตัวของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยอาศัยหลักการพื้นฐานที่ว่า การจัดเรียงตัวของเบส 4 ตัว คือ A (Adenine) T (Thymine) C (Cytosine) และ G (Guanine) ในลำดับนิวคลีโอไทด์ (สายดีเอ็นเอ) ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะต้องมีความแตกต่างกันไปบ้างไม่มากนัก ดังนั้น หากนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันมาเปรียบเทียบกับกันจะพบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน หรือแตกต่างกันน้อยมากจนไม่นับสำคัญ ส่วนสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดกันจะมีการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผันแปรแตกต่างกันไป ความแตกต่างในการจัดเรียงตัวของเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจึงเปรียบเสมือนความแตกต่างของรหัสบนแถบ barcode ของสินค้าต่างๆ นั่นเอง วิธีการของ DNA barcode จัดเป็น molecular based identification system ที่ผสมผสานกับชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) เป็นการนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอในบริเวณที่มีการประสมแล้วว่ามีศักยภาพเพียงพอที่จะใช้แยกและระบุ (identification) ชนิดของสิ่งมีชีวิตได้เรียกบริเวณนี้ว่า ดีเอ็นเอมาตรฐาน (standardized DNA) การใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานในการระบุชนิดอาจใช้เพียงบริเวณเดียวหรือหลายบริเวณในจีโนม แต่มักเป็นดีเอ็นเอช่วงสั้นๆ (150-800 คู่เบส)

คำว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้นผู้ที่นำมาใช้คนแรก คือ Arnot ตั้งแต่ปี ค.ศ.1993 แต่ไม่ได้รับความสนใจมากนัก จนกระทั่ง Hebert *et al.* (2003) ได้ตีพิมพ์ผลงานมีชื่อว่า “Biological identifications through DNA barcodes” ทำให้แนวความคิดนี้เป็นที่รู้จักและนิยมอีกครั้งจนปัจจุบันอาจเรียกได้ว่าเป็นยุคทองของดีเอ็นเอบาร์โค้ด จะเห็นได้จากผลงานวิจัยในการประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสิ่งมีชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน ซึ่งในปี ค.ศ.2004 ได้มีการจัดตั้งความร่วมมือภายใต้โครงการ Consortium for the Barcode of Life (CBOL) และจัดทำเป็นฐานข้อมูล The Barcode of Life Data System (BOLD) ด้วยความร่วมมือของ 150 สถาบันจาก 45 ประเทศทั่วโลกเพื่อจุดประสงค์ในการพัฒนาวิธีการที่เป็นมาตรฐานสากลในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตขึ้น และในปี ค.ศ. 2010 จากการร่วมมือของ 26 ประเทศทั่วโลก ได้พัฒนาโครงการ International Barcode of Life project (iBOL) เพื่อจุดประสงค์ในการพัฒนาเทคนิค

รวมทั้งเครื่องมือและกระบวนการศึกษาและสกัดดีเอ็นเอ ให้ง่าย รวดเร็ว พร้อมทั้งมีราคาถูกลง (International Barcode of Life, 2011)

วิธีการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดคือ นำดีเอ็นเอมาตรฐานที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานในบริเวณเดียวกันซึ่งถูกบันทึกเก็บไว้ในฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA barcoding database) ซึ่งเป็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ววิธีการนี้จะทำให้ระบุตัวอย่างสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว (Shneyer, 2009; Casiraghi *et al.*, 2010) เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยระบบ DNA barcode แล้วจะทำให้ทราบชื่อที่ถูกต้องถึงระดับชนิดภายในเวลาอันรวดเร็วสามารถนำไปใช้ตรวจสอบตัวอย่างสิ่งมีชีวิตได้ทุกกลุ่มเหมาะสำหรับนักอนุกรมวิธานและบุคคลอื่นที่ไม่ใช่ผู้เชี่ยวชาญทางด้านอนุกรมวิธาน (Hebert *et al.*, 2003; Valentini *et al.*, 2009) ขั้นตอนการสร้าง DNA barcode ปัจจุบันการสร้าง DNA barcode มี 2 ระบบ คือ DNA barcoding sensu stricto และ DNA barcoding sensu lato (Casiraghi *et al.*, 2010) ซึ่งระบบแรกนั้นจะเน้นการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอนุกรมวิธาน จึงพัฒนาระบบให้สามารถระบุตัวอย่างสิ่งมีชีวิตให้ได้ถึงระดับชนิด ส่วนระบบที่ 2 นั้นเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายโดยเน้นการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ เช่น ด้านนิติวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีชีวภาพ อุตสาหกรรมอาหาร และนิเวศวิทยา รวมถึงการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ต่างๆ เช่น ตัวอย่างดิน น้ำ และมูลสัตว์ เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้มักให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีนัก (ดีเอ็นเอเสื่อมสภาพ) ดังนั้นระบบนี้จึงเน้นการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานบริเวณสั้นๆ ไม่เกิน 150 คู่เบสเท่านั้น เพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ได้ง่าย และอาจรวมไปถึงการใช้เทคนิคอื่นๆ ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยเช่น Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) และ indels (การแทรกเข้าหรือการหายไปของนิวคลีโอไทด์) (Valentini *et al.*, 2009) เป็นต้น การสร้าง DNA barcode ทั้งสองระบบมีวิธีการที่คล้ายกัน ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ (1) การสร้างฐานข้อมูล DNA barcode และ (2) การทดสอบประสิทธิภาพของระบบ ในที่นี้ขอยกตัวอย่างวิธีการสร้าง DNA barcode ในพืช

ขั้นตอนที่หนึ่ง การสร้างฐานข้อมูล DNA barcode ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ (ภาพที่ 2.10) ดังนี้

- 1.) การเก็บและระบุตัวอย่างพืช (Sample collection and identification) ขั้นตอนนี้ต้องอาศัยความรู้ทางด้านอนุกรมวิธาน หรือมีผู้เชี่ยวชาญมาช่วยตรวจสอบการระบุชนิดพืช การระบุชนิดต้องมีความถูกต้อง ไม่เช่นนั้นจะทำให้ ระบบ DNA barcode ไม่น่าเชื่อถือ

(Hollingsworth *et al.*, 2009) ผู้วิจัยต้องเก็บและคัดเลือกพืชกลุ่มที่ต้องการศึกษาให้ได้จำนวนชนิดครอบคลุมมากที่สุด และแต่ละชนิดควรใช้มากกว่า 1 ตัวอย่างและมาจากหลายประชากรหรือเขตชีวภูมิศาสตร์ เพื่อนำไปใช้ประเมินความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ว่ามีการแปรผันภายในชนิด (intraspecific variation) มากน้อยเพียงใด โดยปกติจำนวนตัวอย่างต่อชนิดที่เหมาะสมต่อการใช้วิเคราะห์ข้อมูล DNA barcode มีตั้งแต่ 3-5 ตัวอย่าง หรือมากถึง 10-12 ตัวอย่างต่อชนิด (Meyer *et al.*, 2005; Spooner, 2009; Zhang *et al.*, 2010)

2.) การสกัดดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่าง ตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอ็นเออาจเป็นตัวอย่างสด ตัวอย่างแห้งที่เก็บรักษาไว้ด้วยซิลิกา หรือตัวอย่างที่เก็บรักษาสภาพด้วยแอลกอฮอล์ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บรักษาในรูปของพันธุ์ไม้แห้ง และในแอลกอฮอล์จะให้ดีเอ็นเอคุณภาพไม่ดี มีการึกขาดเสียหายมากกว่าการใช้ตัวอย่างสด (Shokralla *et al.*, 2010) ส่วนตัวอย่างที่เก็บด้วยน้ำยารักษาสภาพที่มีฟอร์มาลินเป็นองค์ประกอบ จะสกัดดีเอ็นเอได้ยาก จึงไม่เป็นที่นิยม ส่วนวิธีการสกัดมีหลายวิธีทั้งซับซ้อนและไม่ซับซ้อน ศึกษาได้จาก Karp *et al.* (1998) และเว็บไซต์ของ CBOL Plant Working Group

3.) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเทคนิค PCR (DNA amplification using PCR) นำเอาดีเอ็นเอของพืชที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดีเอ็นเอมาตรฐาน (ซึ่งควรจะต้องเลือกบริเวณที่มีความเหมาะสมในการ คัดแยกสิ่งมีชีวิตนั้นๆ) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงกับบริเวณดีเอ็นเอมาตรฐาน

4.) วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing) นำเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานที่เพิ่มปริมาณได้ ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเครื่องอ่านลำดับดีเอ็นเออัตโนมัติ (Automated DNA sequencer) หากไม่มีเครื่องมือนี้ จำเป็นต้องส่งไปวิเคราะห์ที่หน่วยให้บริการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

5.) การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Verification of the sequences) เป็นการตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ เป็นบริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่เลือกไว้หรือไม่ เพราะอาจจะเป็นบริเวณอื่น ซึ่งมีสาเหตุมาจากไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะต่ำ จึงทำให้ไปจับกับดีเอ็นเอบริเวณอื่น หรือมีดีเอ็นเอชนิดอื่นเจือปนในระหว่างขั้นตอนการสกัด หรือการทำ PCR เป็นต้น การตรวจสอบนิยมใช้วิธี MAGABLAST เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

กับฐานข้อมูลดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lim *et al.*, 2009) เมื่อทราบผลที่ถูกต้องแล้ว จึงนำไปประเมินคุณภาพลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

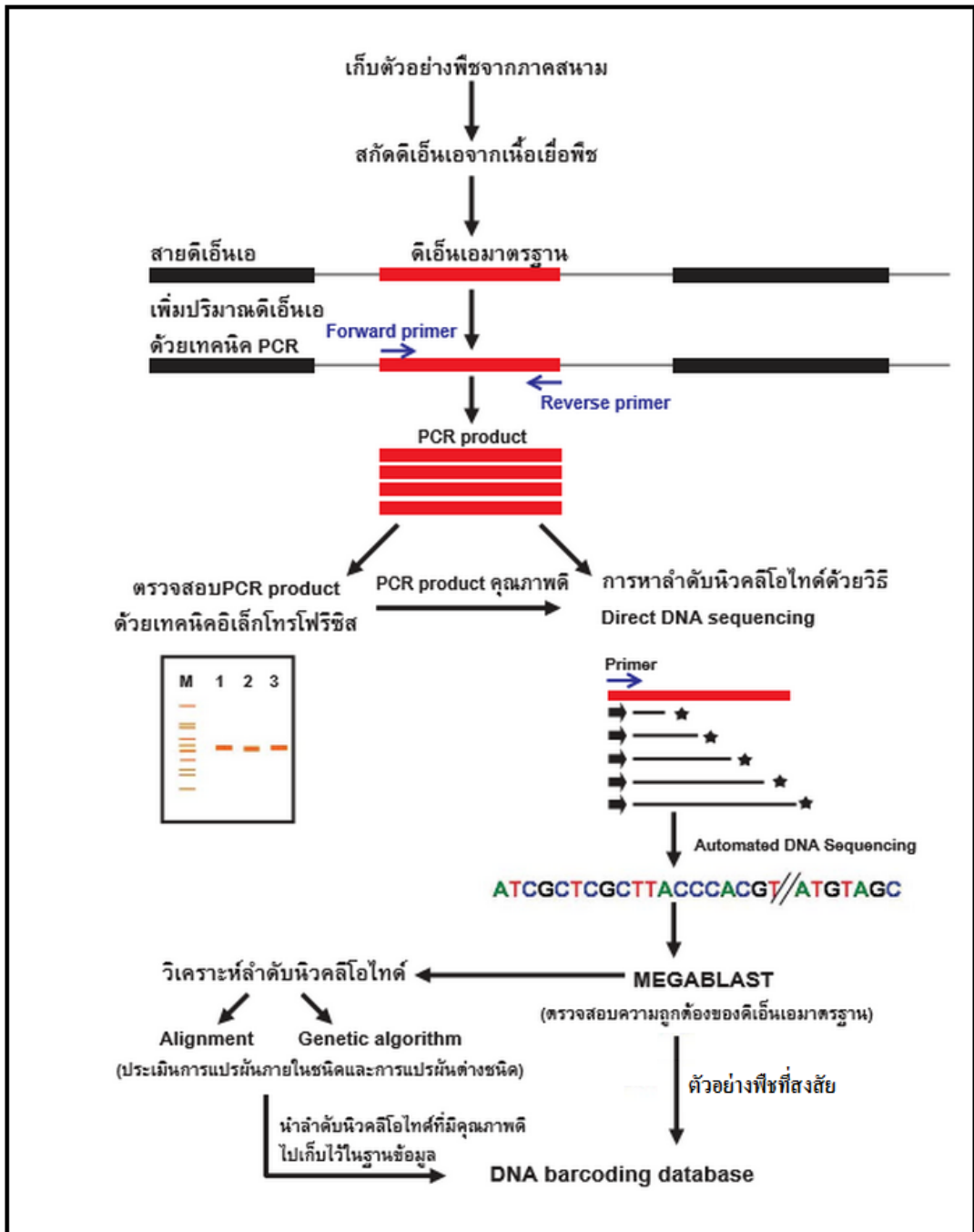
6.) การประเมินคุณภาพลำดับนิวคลีโอไทด์ (Assessment of sequence quality)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการนำไปวิเคราะห์หามาโดยทำการเรียงเทียบ (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากตัวอย่างพืชหลายๆชนิด และคำนวณหาระยะห่างทางพันธุกรรม โดยทั่วไปนิยมใช้แบบจำลองวิวัฒนาการ Kimura 2 –parameter (CBOL Plant Working Group, 2009) เพื่อประเมินว่ามีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์มากน้อยเพียงใด เหมาะที่จะนำมาใช้หรือไม่

7.) การนำข้อมูลเข้าสู่ฐานข้อมูล หากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีคุณภาพดีและมีแนวโน้ม จะนำไปใช้ระบุชนิดพืชกลุ่มที่ศึกษาได้ สามารถนำไปเก็บไว้ในฐานข้อมูล เพื่อใช้เป็นชุดข้อมูลอ้างอิง (reference data set) หากเป็นข้อมูลที่มีมาตรฐานสูงจะต้องมีข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่างพืช เช่น ภาพของ voucher specimen สถานที่เก็บตัวอย่าง พิกัดภูมิศาสตร์ และคำบรรยายลักษณะ เป็นต้น (Ford *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2009)

ขั้นตอนที่สอง การคัดแยกหรือระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตที่สงสัย

นำพืชตัวอย่างที่สงสัยว่าเป็นชนิดนี้หรือไม่มาทำการตรวจสอบโดยขั้นตอนการทำคล้ายกับขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณมาตรฐานมาตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบกับชุดข้อมูลอ้างอิงในฐานข้อมูลด้วยวิธี MEGABLAST (Casiraghi *et al.*, 2010) แล้ว จากนั้นก็นำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชที่ถูกบันทึกไว้ในฐานข้อมูล (DNA barcoding database) ก็จะสามารระบุหรือคัดแยกชนิดของพืชตัวอย่างได้ (ภาพที่ 2.10)



ภาพที่ 2.10 ขั้นตอนของการสร้างและการระบุชนิดของพืชตัวอย่างที่สงสัยด้วยเทคนิค DNA barcoding system (ดัดแปลงมาจาก วุฒิพงษ์, 2554)

2.5.1 คุณลักษณะและเกณฑ์ในการคัดเลือกดีเอ็นเอมาตรฐาน

บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการคัดแยกหรือระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตควรมีคุณลักษณะดังต่อไปนี้ (Chase *et al.*, 2007; Pennisi, 2007; CBOL Plant Working Group, 2009; Ford *et al.*, 2009; Valevini *et al.*, 2009)

- 1.) บริเวณที่เลือกอาจเป็น coding region หรือ non-coding region ก็ได้ แต่ควรมีความยาวไม่มากนัก เพื่อให้เหมาะสมกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ซึ่งต้องทำได้ง่าย และรวดเร็ว
- 2.) มีจำนวนซ้ำในจีโนมน้อยมาก หรือควรมีเพียง 1 ซ้ำ เพื่อหลีกเลี่ยงการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น paralog กัน
- 3.) ในส่วนปลายของบริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานต้องมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแปรผันน้อยมาก หรือแทบไม่มีเลย เพื่อออกแบบไพรเมอร์ให้เป็นสากล (universal primer) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่ายและครอบคลุมกับพืชหลากหลายกลุ่ม
- 4.) ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในบริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่เลือกมาใช้นั้นจะต้องมีความแปรผันระหว่างชนิดเพียงพอที่จะใช้แยกและระบุชนิดที่ต่างกันได้ แต่ต้องมีความผันแปรภายในชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำมาก
- 5.) มีคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ดี กล่าวคือ การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองเส้นในชั้นดีเอ็นเอมาตรฐานต้องได้ผลที่ชัดเจน มีความถูกต้อง และชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานที่ต้องการนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จะต้องง่ายต่อการวิเคราะห์แบบ direct sequencing ไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ รวมถึงให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ง่ายต่อการแปลและวิเคราะห์ความผันแปรของนิวคลีโอไทด์

2.5.2 การประยุกต์ใช้ DNA barcode

ในปี ค.ศ. 2003 Hebert และคณะ ได้พัฒนาระบบการทำ DNA barcode ขึ้นมาใช้ระบุชนิดของสัตว์กลุ่มต่างๆ อย่างเป็นรูปธรรม โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Cytochrome c oxidase subunit I (COI หรือ *coxI*) ซึ่งเป็นยีนในไมโทคอนเดรีย มีความแปรผันมากเพียงพอที่จะใช้แยกและระบุชนิดของสัตว์ที่นำมาทดสอบได้หลายกลุ่ม โดยเฉพาะกลุ่มผีเสื้อ

(Order Lepidoptera) จากการทดสอบการระบุชนิดของกลุ่มผีเสื้อมากกว่า 200 ชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน พบว่าวิธีการ DNA barcode ให้ผลในการระบุชนิดผีเสื้อได้แม่นยำถึง 100% ต่อมาการสร้าง DNA barcode สำหรับการระบุชนิดสัตว์จึงได้รับความนิยมแพร่หลายมากขึ้น (Hebert *et al.*, 2004; Waugh, 2007) และมีการตั้งสมาคม Consortium for the Barcode of Life (CBOL, <http://www.barcodeoflife.org>) ในปี ค.ศ. 2004 โดยความร่วมมือระหว่างนักวิจัยจากมหาวิทยาลัยต่างๆ รวมถึงนักวิจัยของพิพิธภัณฑ์สัตว์และพืชระดับนานาชาติจากหลายประเทศ ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่ายีน COI เป็นบริเวณที่เหมาะสมและได้รับการยอมรับมากที่สุดสำหรับการสร้าง DNA barcode ของสัตว์เพราะนอกจากจะมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงพอที่จะใช้แยกและระบุชนิดสัตว์ได้แล้วการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนนี้ด้วยเทคนิค PCR ทำได้ค่อนข้างง่าย เนื่องจากยีนนี้มีขนาดไม่ใหญ่มากนัก (โดยเฉลี่ย 600-700 คู่เบส) และมีไพรเมอร์ที่เป็น universal primers ซึ่งได้รับการออกแบบมาให้มีความจำเพาะสูงและสามารถใช้ได้กับสัตว์หลากหลายกลุ่ม โดยทั่วไปแล้วการทำ DNA barcode ด้วยยีน COI ในสัตว์ให้ความถูกต้องในการระบุชนิดสูงกว่า 95% (Thomas, 2009) แม้วิธีนี้จะให้ผลไม่ดีนักในสัตว์บางกลุ่มเช่น พวกแมลงอันดับ Diptera (Meier *et al.*, 2006) และปะการัง (Shearer *et al.*, 2008) แต่ก็นับว่าการสร้าง DNA barcode ในสัตว์ประสบความสำเร็จค่อนข้างมากและมีอุปสรรคค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับระบบการสร้าง DNA barcode ของพืช ปัจจุบันมีนักวิจัยบางท่านได้เสนอให้นำเอา DNA barcode มาเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาอนุกรมวิธานแบบบูรณาการ (integrative taxonomy) (Padial *et al.*, 2007; Goldstein *et al.*, 2010) ซึ่งแนวคิดการสร้างและรวบรวม DNA barcode ไว้ในรูปของฐานข้อมูลจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการนำมาใช้ระบุชนิดสิ่งมีชีวิตในกรณีที่ขาดผู้เชี่ยวชาญด้านอนุกรมวิธาน

ปัจจุบันการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชมีมากขึ้น และเป็นที่ถกเถียงถึงความเป็นไปได้เนื่องจากลำดับเบสบนบริเวณยีน COI ที่ใช้ในการจัดจำแนกสัตว์ไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ในพืช สาเหตุจากไมโทคอนเดรียในพืชมีอัตราการวิวัฒนาการต่ำทำให้ความผันแปรของลำดับเบสบน COI ระหว่างชนิดมีน้อยมากไม่เพียงพอในการนำมาใช้สนับสนุนการจำแนกชนิดในกลุ่มของพืชได้ (Cho *et al.*, 2004) ต่อมากลุ่มศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชจึงได้พยายามหาตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานและยีนที่สามารถนำมาใช้ในดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชและพบความเป็นไปได้ว่าตำแหน่งที่เหมาะสมกับการนำมาใช้เป็นบาร์โค้ดในพืชนั้นส่วนใหญ่จะตั้งอยู่บนยีนที่อยู่บนคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA; cpDNA) บริเวณตำแหน่ง

rbcL, *trnL*, *matK*, *rpoC*, *trnH-psbA* และบริเวณตำแหน่ง ITS ที่อยู่ในนิวเคลียสจีโนม (ตารางที่ 2.1) ซึ่งได้รับการยอมรับ จากนักวิจัยหลายคณะว่าเป็นบริเวณดีเอ็นเอที่เหมาะสม สำหรับการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดในพืช (CBOL Plant working group, 2009; Chase *et al.*, 2009; Hollingsworth *et al.*, 2009; Lahaye *et al.*, 2008)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

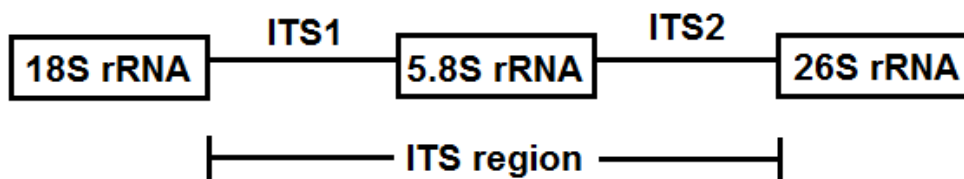
ตารางที่ 2.1 บริเวณที่ถูกเสนอให้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืช

คณะนักวิจัย	บริเวณดีเอ็นเอที่นำมาประเมิน	บริเวณที่เสนอให้เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน
Kress <i>et al.</i> , 2005	<i>atpB-rbcL</i> , ITS, <i>psbM-trnD</i> , <i>trnC-ycf66</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>trnL-F</i> , <i>trnK-rps16</i> , <i>trnV-atpE</i> , <i>rpl36-</i> <i>rps8</i> , <i>ycf6-psbM</i>	<i>trnH-psbA</i> + ITS
Kress <i>et al.</i> , 2007	ITS1, <i>accD</i> , <i>ndhJ</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-</i> <i>psbA</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>ycf5</i>	<i>rbcL</i> + <i>trnH-psbA</i>
Chase <i>et al.</i> , 2007	-	<i>matK</i> + <i>rpoC1</i> + <i>rpoB</i> หรือ <i>matK</i> + <i>rpoC1</i> + <i>trnH-</i> <i>psbA</i>
Kim <i>et al.</i> , 2007	-	<i>matK</i> + <i>atp-atpH</i> + <i>trnH-</i> <i>psbA</i> , <i>matK</i> + <i>atp-atpH</i> + <i>psbK-psbI</i>
Newmaster <i>et al.</i> , 2008	<i>accD</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , UPA	<i>matK</i> + <i>trnH-psbA</i>
Lahaye <i>et al.</i> , 2008	<i>accD</i> , <i>ndhJ</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>ycF5</i>	<i>matK</i> หรือ <i>matK</i> + <i>trnH-</i> <i>psbA</i>
Fazekas <i>et al.</i> , 2008	COI, 23S rDNA, <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>atpF-atpH</i> , <i>psbK-psbI</i>	แนะนำให้ใช้ 3-4 บริเวณร่วมกัน ระหว่าง <i>rbcL</i> , <i>rpoB</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> และ <i>atpF-atpH</i>
Hollingsworth <i>et</i> <i>al.</i> , 2009	<i>rpoC1</i> , <i>rpoB</i> , <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>atpF-atpH</i> , <i>psbK-psbI</i>	แนะนำให้ใช้ 3-4 บริเวณร่วมกัน ระหว่าง <i>rpoC1</i> , <i>rbcL</i> , <i>matK</i> และ <i>trnH-psbA</i>
CBOL Plant Working Group, 2009	<i>atpF-atpH</i> , <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>psbK-psbI</i> , <i>trnH-psbA</i>	<i>rbcL</i> + <i>matK</i>
Chen <i>et al.</i> , 2010	<i>trnH-psbA</i> , <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC1</i> , <i>ycf5</i> , ITS2, ITS	ITS2

2.6 บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่นิยมใช้ในการคัดแยกและระบุชนิดของพืช

2.6.1 บริเวณ ITS

บริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacer) เป็นบริเวณที่แทรกอยู่ภายในชุดยีน ribosomal DNA (18S-5.8S-26S rRNA) ที่อยู่ในนิวเคลียสจีโนม ซึ่งมีอยู่ 2 บริเวณคือ ITS1 และ ITS2 โดยบริเวณ ITS1 อยู่ระหว่างยีน 18S rRNA และยีน 5.8S rRNA ส่วนบริเวณ ITS2 อยู่ระหว่าง 5.8S rRNA และยีน 26S rRNA (ภาพที่ 2.11) บริเวณ ITS เหมาะสมเป็น ดีเอ็นเอมาตรฐานเนื่องจากมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง เพียงพอที่จะใช้คัดแยกและระบุชนิดของพืชได้ดี (Kress *et al.*, 2005) โดยพบว่ามีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงกว่าคลอโรพลาสต์จีโนม 3-4 เท่า นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จากดีเอ็นเอที่สกัดจากกตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้ง หรือตัวอย่าง ดีเอ็นเอคุณภาพไม่ดีสามารถทำได้ง่าย (Kress *et al.*, 2005; Chaes *et al.*, 2007)



ภาพที่ 2.11 บริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacer)

อย่างไรก็ตามบริเวณ ITS ยังมีข้อจำกัดในการนำมาใช้คัดแยกหรือระบุชนิดในพืชบางชนิด เช่น universal primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ของพืชนั้น สามารถเข้าไปจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของราที่เป็น endophytic fungi ของพืชบางกลุ่มได้ด้วย (Zhang *et al.*, 1997) ถึงแม้จะมีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อย แต่ก็ป็นอุปสรรคสำหรับการคัดแยกหรือระบุชนิดของพืชกลุ่มที่มีราดำรงชีวิตอยู่ด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ในพืชดอกบางกลุ่ม เช่น สกุล *Aquilegia* และ *Paeonia* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ที่มีความแปรผันต่ำมากและบางสปีชีส์ของพืชในสกุลเดียวกันมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เหมือนกัน (Shneyer, 2009) จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการคัดแยกหรือระบุชนิดได้

2.6.2 บริเวณ *matK*

บริเวณ *matK* เป็นยีนที่มีความยาวประมาณ 1500 คู่เบส ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ maturase ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Group II introns splicing (Hilu *et al.*, 1997) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานจะเลือกเพียงบางบริเวณของยีนที่มีความยาว 700-800 คู่เบส (Ford *et al.*, 2009) ข้อดีของยีนนี้คือ มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงเพียงพอที่จะนำมาใช้ระบุชนิดของพืชได้ดี อีกทั้งยังให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพดีอีกด้วย

อย่างไรก็ตาม ยีน *matK* มีข้อจำกัด คือ ไม่มีความเป็นมาตรฐานสากล ส่งผลให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้ผลสำเร็จค่อนข้างยาก โดยเฉพาะในกลุ่มพืชไร่เมล็ด ซึ่งให้ผลสำเร็จเพียง 10% ส่วนในพืชกลุ่มจิมโนสเปิร์มให้ผลประมาณ 83% และในพืชดอกให้ผลดีที่สุดประมาณ 90% (CBOL Plant Working Group, 2009) ในปัจจุบันยังไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ของยีน *matK* ให้ครอบคลุมกับพืชหลายๆกลุ่มได้ โดยเฉพาะในพืชกลุ่มจิมโนสเปิร์มและพืชไร่เมล็ดที่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำได้ยากหรือไม่ได้ผลเลย (Sass *et al.*, 2007) ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพืชดอกนั้น ต้องใช้ไพรเมอร์ถึง 2 คู่ หรืออาจจะมากถึง 10 คู่ (Fazekas *et al.*, 2008; Lahaye *et al.*, 2008) และจำเป็นต้องปรับสภาวะของปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสมแตกต่างกันไปในพืชแต่ละกลุ่มด้วย (Sass *et al.*, 2007; Fazekas *et al.*, 2008)

2.6.3 บริเวณ *trnH-psbA*

บริเวณ *trnH-psbA* เป็น non-coding region ในคลอโรพลาสต์จีโนม จากข้อมูลที่ผ่านมาพบว่าการใช้บริเวณ *trnH-psbA* เพียงบริเวณเดียวจะมีศักยภาพในการระบุชนิดได้ต่ำกว่าการใช้ร่วมกับบริเวณอื่น ดังนั้นจึงนิยมใช้บริเวณ *trnH-psbA* ร่วมกับบริเวณอื่น เช่น ใช้ร่วมกับยีน *rbcL* (Kress *et al.*, 2007) หรือ *matK* (Newmaster *et al.*, 2008) เป็นต้น เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอบริเวณอื่นในคลอโรพลาสต์จีโนม พบว่าบริเวณ *trnH-psbA* เป็นบริเวณที่นิยมนำมาใช้ในการคัดแยกและระบุชนิดของพืชค่อนข้างมาก เนื่องจากมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูง (Kress *et al.*, 2005; Kress *et al.*, 2007) นอกจากนี้บริเวณ *trnH-psbA* ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนปลายทั้งสองด้านที่เป็นบริเวณอนุรักษ์สูง (ความยาวประมาณ 75 คู่เบส) จึงมี ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer ที่ใช้ศึกษากับพืชได้หลายกลุ่ม (Taberlet *et al.*, 1991; Shaw *et al.*, 2005) และจากงานวิจัยของ Kress *et al.* (2005) พบว่าสามารถใช้

ไพรเมอร์คู่เดียวเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของบริเวณ *trnH-psbA* ในพืชดอกทุกชนิดจาก 50 วงศ์ ได้สำเร็จ

อย่างไรก็ตามบริเวณ *trnH-psbA* ยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ universal primer ในบริเวณ *trnH-psbA* นั้น มักให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ เรียงตัวต่อกันมาก ส่งผลทำให้เครื่องอ่านลำดับดีเอ็นเออัตโนมัติ แปลผลไม่ได้ หรือให้ผลผิดพลาดไปจากความจริง ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการคัดแยกตัวอย่างพืช (CBOL Plant Working Group, 2009; Spooner, 2009) ปัญหาอีกประการหนึ่งที่พบในบริเวณ *trnH-psbA* คือ บริเวณนี้มี Insertion/deletion (indels) สูงมาก จนทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความยาวแตกต่างกัน ซึ่งพบตั้งแต่ 200-1000 คู่เบส (Kress *et al.*, 2005) เป็นอุปสรรคอย่างมากในขั้นตอนการเทียบ (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์

2.6.4 บริเวณ *rbcL*

บริเวณ *rbcL* เป็นยีนในคลอโรพลาสต์จีโนม ที่ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) เอนไซม์ RubisCO ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ Ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) กับ Carbon dioxide (CO_2) ในวัฏจักรคัลวิน (Calvin's cycle) (Soltis *et al.*, 1998) การนำบริเวณ *rbcL* มาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานนั้น จะใช้เพียงบางส่วนของยีนที่มีความยาวตั้งแต่ 500-700 คู่เบส (Kress *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2009; Ebihara *et al.*, 2010) จุดเด่นของยีน *rbcL* ที่ CBOL Plant Working Group พิจารณามีความเหมาะสมนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเนื่องจากมีไพรเมอร์ที่เป็น universal primer และให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพดีมาก

แต่อย่างไรก็ตามความยาวของยีน *rbcL* มีความแปรผันเพียงเล็กน้อยในพืชแต่ละชนิดจึงทำให้ประสิทธิภาพในการนำมาใช้แยกและระบุชนิดของพืชค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อใช้ร่วมกับบริเวณอื่น เช่น *matK* จะให้ผลการแยกและระบุชนิดของพืชได้ดีขึ้น

2.6.5 บริเวณ tRNA-Leu (*trnL*)

trnL (UAA) intron เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวประมาณ 245-767 คู่เบส พบในคลอโรพลาสต์จีโนม ซึ่งถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านวิวัฒนาการเป็นอย่างมาก เช่น ใช้ในการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและถูกพัฒนามาเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้ในการคัดแยกและระบุชนิดของพืช (Fangan *et al*, 1994; Fernandez *et al*, 2011; Gielly *et al*, 1994; Taberlet *et al*, 1991)

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานเพียง 1 บริเวณ จะให้ผลในการคัดแยกพืชได้ไม่ดีนัก เนื่องจากอัตราการเกิดวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอค่อนข้างต่ำกว่าในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของสัตว์ จึงทำให้ไม่สามารถใช้ดีเอ็นเอเพียง 1 บริเวณจากคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการคัดแยกหรือระบุชนิดของพืชได้ และจากการศึกษาของคณะนักวิจัย จึงมีการนำเสนอให้ใช้ดีเอ็นเอร่วมกัน 2-3 บริเวณ (Kress *et al*, 2007; Newmaster *et al*, 2008; CBOL Plant Working Group, 2009) (ตารางที่ 2.1)

2.7 การประยุกต์ใช้ DNA barcode กับพืชวงศ์ขิง

จากงานวิจัยในการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชวงศ์ขิง พบว่ามีการประเมินความสามารถของยีนในพลาสติกตำแหน่ง *rpoB* และ *rpoC* ในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับจำแนกความแตกต่างในพืชวงศ์ขิง โดยยีน *rpoB* สามารถจำแนกพืชออกจากกันได้ 10 ชนิด จากทั้งหมด 16 ชนิด คิดเป็น 62.5% ส่วนยีน *rpoC* สามารถจำแนกพืชออกจากกันได้ 8 ชนิดจากทั้งหมด 15 ชนิดคิดเป็น 53.3% การจำแนกชนิดโดยใช้ตำแหน่ง *rpoB* หรือ *rpoC* เพียงตำแหน่งเดียวไม่สามารถจำแนกพืชได้ดี อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ข้อมูลจากยีนหลายตำแหน่งมาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อจำแนกชนิดพืช พบว่าสามารถจำแนกพืชได้ดีขึ้น โดยยีนที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการจำแนกพืชแต่ละชนิดออกจากกัน คือยีน *rpoB* และ *matK* (ณัฐกร, 2554) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยโดยการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *matK* ในการจำแนกพืชวงศ์ขิงแต่พบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *matK* ให้ผลสำเร็จน้อยมาก (Selvaraj *et al.*, 2008) และยังพบอีกว่าพืชในวงศ์ขิงมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก บริเวณ *trnH-psbA* ของพืชหลายชนิดมียีน *rps19* สอดแทรกเข้ามาทำให้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่งนี้ใช้ในการจำแนกพืชในวงศ์ขิงได้ไม่ดีนัก (Chase *et al.*, 2007) และล่าสุดในปี 2014 คณะนักวิจัยจากประเทศจีนได้ประเมินประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK* และ ITS กับพืชวงศ์ขิง พบว่าเมื่อใช้ตำแหน่ง ITS ร่วมกับตำแหน่ง *trnH-psbA* จะมีประสิทธิภาพในการจำแนกพืชวงศ์ขิงได้ดีที่สุด (ร้อยละ 90 จากการใช้พืช 10 ตัวอย่าง) (Zhang *et al.*, 2014) และถึงแม้ว่าจะใช้บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานถึง 3 ตำแหน่งจะให้ผลในการจำแนกดีขึ้น แต่ไม่ได้ให้ผลแตกต่างกันมากนัก อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนและใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นด้วย (CBOL Plant working group, 2009)

จะเห็นได้ว่าแม้เทคโนโลยีของดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะมีประโยชน์หลายด้านและได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายแต่การนำมาประยุกต์ใช้จริงยังมีปัญหาและข้อจำกัดหลายประการ โดยเฉพาะการนำมาใช้ระบุตัวอย่างพืช โดยพบว่าการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานเพียงบริเวณเดียวไม่สามารถระบุชนิดพืชได้แม่นยำเท่ากับการใช้มากกว่า 1 บริเวณซึ่งแตกต่างจากกรณีของสัตว์ที่สามารถใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานเพียงบริเวณเดียวแต่ระบุชนิดสัตว์ได้แม่นยำสูง ปัจจุบันกลุ่มนักวิจัยชั้นนำของโลกได้เสนอให้ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานมากกว่า 1 บริเวณร่วมกัน คือยีน *rbcL* ร่วมกับยีน *matK* ซึ่งจะให้ประสิทธิภาพในการระบุพืชได้ แม่นยำขึ้นอย่างไรก็ตามทั้งสองบริเวณนี้ยังไม่ใช่วิธีที่สมบูรณ์แบบที่สุดเพราะมี

ประสิทธิภาพในการระบุชนิดพืชบางกลุ่มให้ถูกต้องถึงระดับชนิดได้ไม่ด้นัก แม้จะมีนักวิจัยอื่นๆ ได้เสนอวิธีอื่นเพื่อมาตรฐานบริเวณอื่นเพิ่มเติมขึ้นมาแต่ยังไม่มีบริเวณใดที่เหมาะสมกับพืชทุกกลุ่ม วิธีการที่จะทำได้ดีที่สุดคือการพัฒนาระบบ DNA barcode ที่เหมาะสมกับพืชในแต่ละกลุ่มมากกว่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาประยุกต์ใช้กับเทคนิค HRM เพื่อให้สามารถระบุชนิดและจำแนกสิ่งมีชีวิตออกจากกันได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีความรวดเร็วมากขึ้น

2.8 ข้อจำกัดในการใช้ DNA barcode

2.8.1 การนำเทคนิคไปใช้ประโยชน์ทางด้านอนุกรมวิธานพืช จำเป็นต้องพัฒนาระบบให้มีความจำเพาะเจาะจงสูง สามารถระบุตัวอย่างพืชให้ได้ถึงระดับชนิด และถูกต้องแม่นยำ (Casriaghi *et al.*, 2010) เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีดีเอ็นเอมาตรฐานบริเวณใดที่เหมาะสมกับพืชทุกกลุ่ม (CBOL Plant Working Group, 2009; Seberg *et al.*, 2009; Spooner, 2009) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องประเมินหาบริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่เหมาะสมกับพืชที่ต้องการนำมาคัดแยก นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในตัวอย่างพืชที่มีสภาพเสียหาย เช่น ชากพืช หรือชิ้นส่วนเล็กๆ ยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก เนื่องจากบริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาใช้ส่วนใหญ่มีความยาวเกิน 500 คู่เบส ทำให้มีความยากต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่างดังกล่าว (Valenini *et al.*, 2009)

2.8.2 การเลือกใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานมีผลต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการศึกษาของ Spooner (2009) พบว่าดีเอ็นเอมาตรฐานบางบริเวณ เช่น *trnH-psbA* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้เครื่องอ่านลำดับดีเอ็นเอหยุดอ่าน ซึ่งส่งผลกระทบต่อคัดแยกและระบุชนิดของพืช

2.8.3 การระบุชนิดพืชที่ให้ผลน่าเชื่อถือที่สุด จำเป็นต้องมีชุดข้อมูลอ้างอิงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชตัวอย่างอื่นๆ ที่มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากที่สุด โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชที่ถูกบันทึกในชุดอ้างอิงนั้น ควรมีทุกชนิดในสกุลเดียวกัน มีหลายๆ ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างมาจากต่างประชากรหรือต่างชีวภูมิศาสตร์กัน จึงจะทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ (Ekrem *et al.*, 2007) ซึ่งมีรายงานพบว่าการระบุชนิดจะมีความผิดพลาดเพิ่มมากขึ้นหากชุดข้อมูลอ้างอิงมีความถูกต้องไม่เพียงพอ (Meyer *et al.*, 2005; Ekrem *et al.*, 2007) นอกจากนี้ในการส่งตัวอย่างพืชเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ควรเลือกหน่วยบริการที่มีประสิทธิภาพสูง เพราะอาจมีผลต่อความน่าเชื่อถือของข้อมูลได้

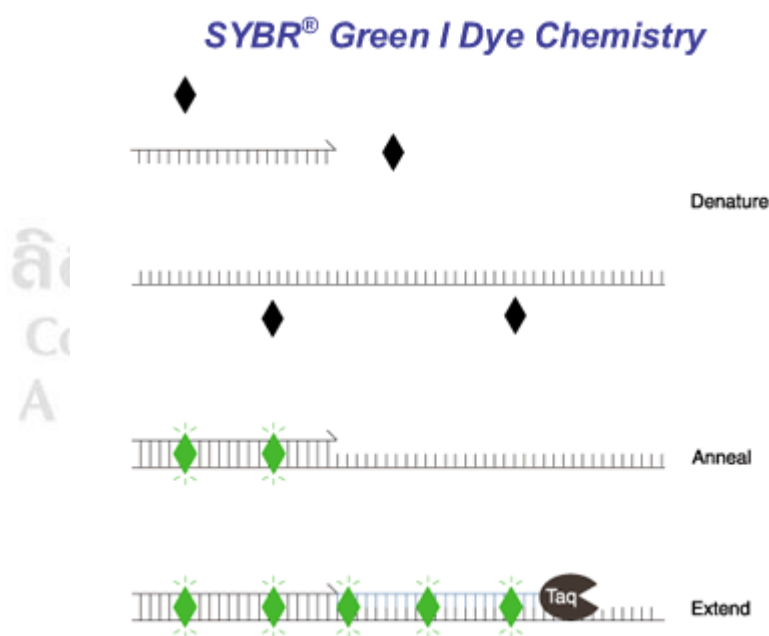
2.8.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank เช่น NCBI, DDBJ และ EMBL ไม่ได้มีความน่าเชื่อถือเสมอไป เพราะอาจมีตัวอย่างที่ระบุชนิดผิดพลาด มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากชนิดอื่น หรือมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกับความจริง (Ouellette, 2001; Harris, 2003; Vilgalis, 2003; Valentini *et al.*, 2009) ข้อมูลที่ไม่มีความน่าเชื่อถือเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บันทึกไว้ไม่มี voucher specimens และ electrophoregrams แสดงไว้ (Chase *et al.*, 2007; Ford *et al.*, 2009) และที่สำคัญคือไม่ทราบว่าผู้ที่นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาบันทึกไว้ระบุชนิดพืชได้อย่างถูกต้องหรือไม่ เพราะมีรายงานว่า ประมาณ 20% ของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank มีการระบุชนิดผิด (Vilgalis, 2003)

2.8.5 วิธีการ DNA barcode ไม่สามารถนำไปใช้แทนการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้เนื่องจากมีบริเวณดีเอ็นเอที่นำมาใช้ศึกษาน้อย

2.9 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเทคนิค HRM (High-Resolution Melting analysis)

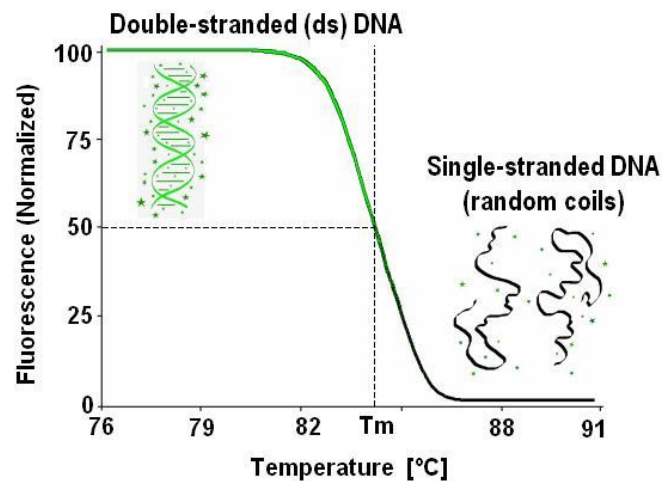
เทคนิค HRM เป็นการวิเคราะห์อุณหภูมิที่ใช้ในการคลายเกลียวของดีเอ็นเอ โดยพิจารณาจากค่า T_m คืออุณหภูมิที่ทำให้ 50% ของปริมาณดีเอ็นเอ ทั้งหมด ซึ่งปกติเป็นดีเอ็นเอสายคู่ให้แยกจากกัน กลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ในขณะที่เกิดการคลายตัวของดีเอ็นเอนั้น เมื่อวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 260 nm ไปด้วยจะพบว่าสารละลายดีเอ็นเอ มีการดูดกลืนคลื่นแสงมากขึ้นตามปรากฏการณ์ไฮเพอร์โครมิซึม เมื่อนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ กับการดูดกลืนแสงที่ 260 nm (DNA melting curve) ค่า T_m ขึ้นกับปริมาณ G-C ในดีเอ็นเอ โดยที่ดีเอ็นเอที่มี G-C สูงจะมีค่า T_m สูงกว่าดีเอ็นเอที่มี G-C ต่ำ (Areekit *et al.*, 2009) ซึ่งค่า T_m และลักษณะของกราฟจะใช้ในการจำแนกและระบุชนิดของพืช

ขั้นตอนการทำ HRM จะเริ่มจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาจากการทำ PCR แบบดั้งเดิม โดยจะใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เช่น SYBR-Green I Dye ซึ่งเป็นสี fluorescence ที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอ สายคู่ในขั้นตอน extension ตรงตำแหน่ง minor groove ได้ เมื่อสารนี้ถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จะคายพลังงานออกมาเป็นแสงฟลูออเรสเซนซ์ (ภาพ 2.12)

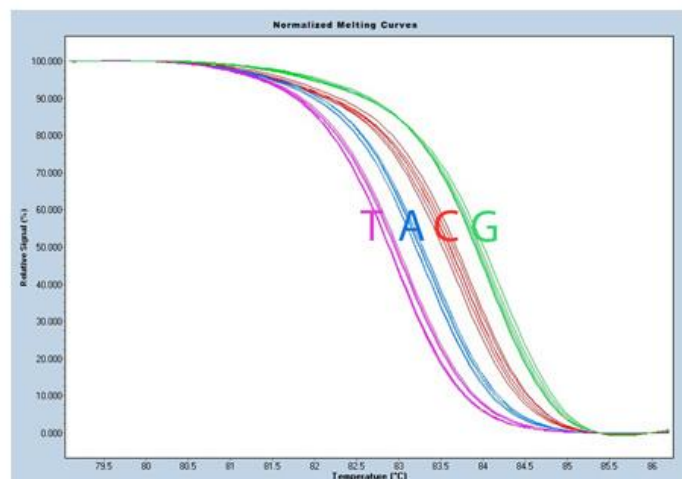


ภาพที่ 2.12 การเข้าจับของสารเรืองแสง SYBR-Green I Dye
ที่มา: [http://www.gibthai.com/userfiles/image/img12_17\(1\).gif](http://www.gibthai.com/userfiles/image/img12_17(1).gif)

เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ตามจำนวนรอบที่กำหนดไว้ เครื่องจะทำการวิเคราะห์ผล HRM โดยเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ และจะทำการตรวจวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงจากการคลายเกลียวจากดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ทุกๆ 0.1 C° (Reed *et al.*, 2004) ดังภาพที่ 2.13 และแสดงผลออกมาในรูปของ Normalized Melting Curve (ภาพที่ 2.14)



ภาพที่ 2.13 แสดงการตรวจวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ
ที่มา: https://dna.utah.edu/Image/Hi_Res%20Melting_Normalized.JPG



ภาพที่ 2.14 แสดง Normalized Melting Curve

ที่มา: <http://www.quantabio.com/img/performance/TACG%20Model%20Norm.jpg>

2.10 Barcode DNA-High Resolution Melting (Bar-HRM)

เป็นการประยุกต์เทคนิค DNA barcode เข้ากับเทคนิค HRM เพื่อความรวดเร็วในการจัดจำแนกและระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย และให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ เทคนิคดังกล่าวถูกนำมาใช้ครั้งแรกในการคัดแยกเบอร์รี่ (berry) ได้สำเร็จ (Jaakola *et al.*, 2010) ส่งผลทำให้เทคนิคนี้เป็นที่นิยมใช้ในการคัดแยกหรือระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น การคัดแยกพืชวงศ์ถั่ว (Leguminosae) โดยใช้ *trnL* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานได้สำเร็จ (Panagiotis *et al.*, 2011) การคัดแยกถั่วลิสง (Bosmali *et al.*, 2011) ใช้จัดจำแนก *Fava Santorinis* โดยใช้ *trnL* และ *rpoC* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (Ioannis *et al.*, 2012) การตรวจสอบน้ำมันมะกอก (Ganopoulos *et al.*, 2013) และ การจัดจำแนกพืชวงศ์กะเพรา (Lamiaceae) (Kalovas *et al.*, 2014) เป็นต้น