

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 Data Mining

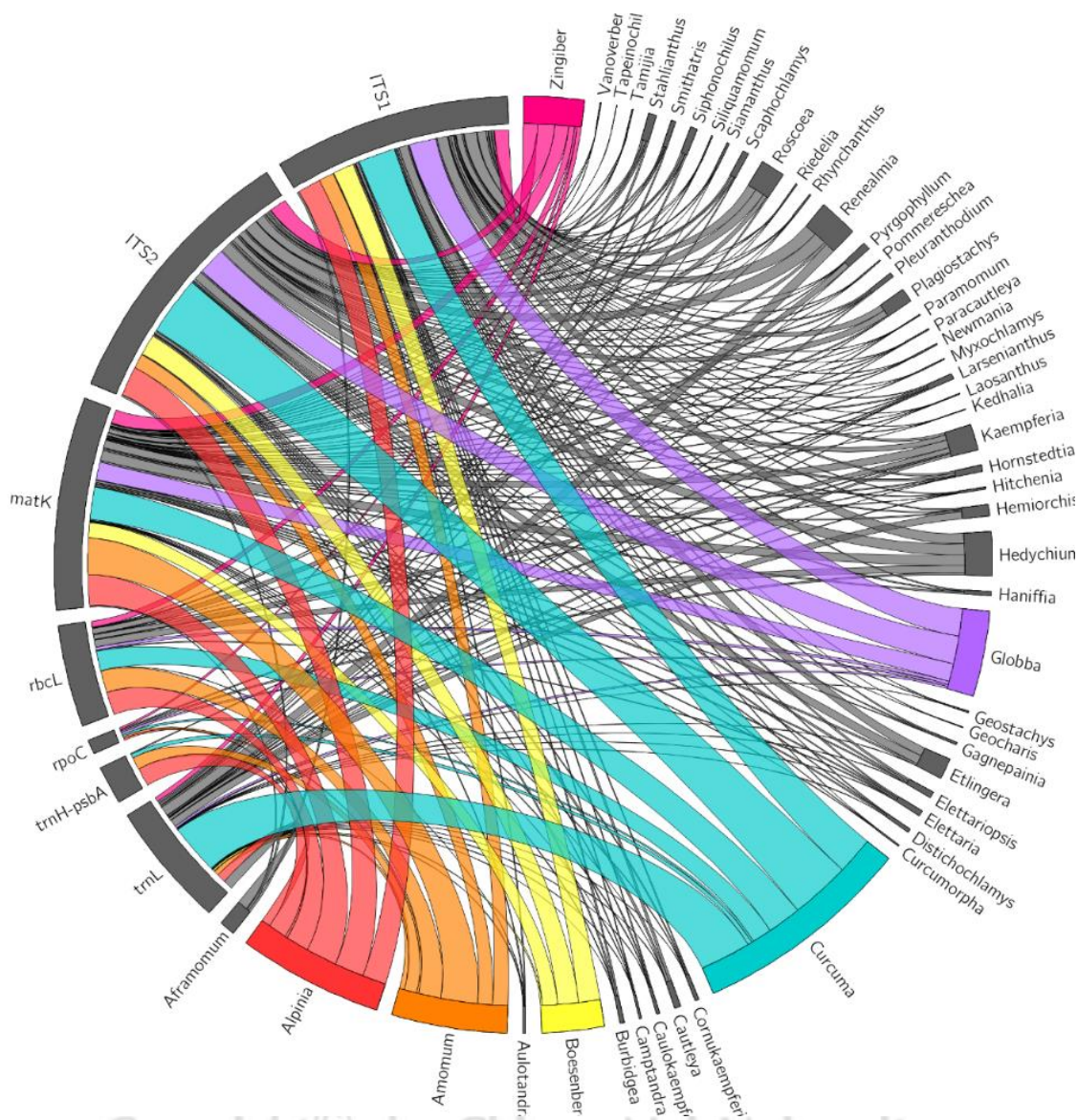
4.1.1 ค้นหาและรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS1, ITS2, *matK*, *rbcL*, *rpoC*, *trnH-psbA* และ *trnL*

จากการสืบค้นและรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS1 และ ITS2 ซึ่งอยู่ในนิวเคลียสจีโนม และบริเวณ *matK*, *rbcL*, *rpoC*, *trnH-psbA* และ *trnL* ซึ่งอยู่ในคลอโรพลาสต์จีโนมของพืชในวงศ์จิงบนฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เครือข่าย <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> โดยใช้คำค้นว่า Zingiberaceae + บริเวณที่ต้องการ ได้แก่ ITS, *matK*, *rbcL*, *rpoC*, *trnH-psbA* และ *trnL* พบจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 930, 879, 425, 60, 647 และ 436 ตัวอย่างตามลำดับ (ตาราง 4.1) พบพืชสกุล *Curcuma* มีจำนวนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุด รองลงมาคือ *Alpinia*, *Amomum*, *Globba*, *Zingiber* และ *Boesenbergia* ตามลำดับ (ภาพ 4.1) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ที่พบมีความยาวอยู่ระหว่าง 208-2661 เบส, บริเวณ *matK* มีความยาวอยู่ระหว่าง 209-3315 เบส, บริเวณ *rbcL* มีความยาวอยู่ระหว่าง 153-1548 เบส, บริเวณ *rpoC* มีความยาว 501 เบส, บริเวณ *trnH-psbA* มีความยาวอยู่ระหว่าง 153-1243 เบส และบริเวณ *trnL* มีความยาวอยู่ระหว่าง 188-962 เบส (ตาราง 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด และความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์
ที่ค้นหาได้จากการใช้คำค้น Zingiberaceae + บริเวณที่ต้องการ
(ได้แก่ ITS, *matK*, *rbcL*, *rpoC*, *trnH-psbA* และ *trnL*)

บริเวณ	จำนวนลำดับ นิวคลีโอไทด์	ความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ (เบส)	
		สั้นสุด	ยาวสุด
ITS	930	208	2661
<i>matK</i>	879	209	3315
<i>rbcL</i>	425	153	1548
<i>rpoC</i>	60	501	501
<i>trnH-psbA</i>	647	153	1243
<i>trnL</i>	436	191	1197

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.1 ข้อมูลปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่ง
ของพืชวงศ์ขิงที่มีในฐานข้อมูล GenBank

4.1.2 ตัดแต่งและคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.1.1 โดยมีเงื่อนไขในการเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ ตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มี %N มากกว่า 3% ในกรณีที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสปีชีส์นั้นๆ มากกว่า 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ จะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสปีชีส์นั้นมาทำการวิเคราะห์ไม่เกิน 3 ซ้ำ ทำการ alignment และตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนหัวและท้ายให้เท่ากัน หลังจากทำการคัดเลือกแล้วในแต่ละบริเวณพบตัวอย่างที่เหลือเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป ดังนี้ ITS จำนวน 252 ตัวอย่าง มีความยาว 776 เบส, *matK* จำนวน 342 ตัวอย่าง มีความยาว 686 เบส, *rbcL* จำนวน 323 ตัวอย่าง มีความยาว 471 เบส, *rpoC* จำนวน 60 ตัวอย่าง มีความยาว 501 เบส, *trnH-psbA* จำนวน 87 ตัวอย่าง มีความยาว 830 เบส และ *trnL* จำนวน 102 ตัวอย่าง มีความยาว 976 เบส (ตาราง 4.2)

ตารางที่ 4.2 จำนวนนิวคลีโอไทด์และความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกคัดเลือกของพืชวงศ์จิงหึงทั้งหมดจากตำแหน่ง ITS, *matK*, *rbcL*, *rpoC*, *trnH-psbA* และ *trnL*

บริเวณ	จำนวนตัวอย่างใช้วิเคราะห์	ความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้วิเคราะห์ (เบส)
ITS*	252	776
<i>matK</i>	242	686
<i>rbcL</i>	323	471
<i>rpoC</i>	60	501
<i>trnH-psbA</i> **	87	830
<i>trnL</i>	102	976

* ภาคผนวก (Supplementary Data 1.)

** ภาคผนวก (Supplementary Data 2.)

4.2 การวิเคราะห์ผ่านคอมพิวเตอร์ (*in silico analysis*)

4.2.1 เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์ขิงที่ถูกคัดเลือกจากบริเวณ 7 ตำแหน่งมาวิเคราะห์ผล โดยการทำ alignment เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบจำนวนตำแหน่งที่เป็น conserved site, variable site, singleton และ ค่า GC content โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ *rpoC* มีตำแหน่งที่เป็น conserved site มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *rbcL*, *trnH-psbA*, *trnL*, *matK*, *psbA-trnH* และ ITS โดยคิดเป็น 96.21%, 86.84%, 83.97%, 78.99%, 62.54 และ 27.71% ตามลำดับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS มีตำแหน่งที่เป็น variable มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *matK*, *trnL*, *rbcL*, *psbA-trnH* และ *rpoC* โดยคิดเป็น 69.075%, 36.88%, 16.49%, 12.95%, 11.69% และ 3.79% ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ย GC content พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS มีค่าสูงสุดรองลงมาได้แก่ *rbcL*, *rpoC*, *trnL*, *psbA-trnH* และ *matK* คิดเป็น 55.8%, 44.0%, 38.9%, 33.1%, 29.5% และ 29.3% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์จิงจากตำแหน่ง ITS, *matK*, *rbcL*, *rpoC*, *trnH-psbA* และ *trnL* ที่ได้จากการทำ alignment

ตำแหน่ง	ความยาวของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (เบส)	ตำแหน่ง conserved	ตำแหน่ง variable	ตำแหน่ง singleton	ค่าเฉลี่ย GC content (%)
ITS	776	215/776 (27.71%)	536/776 (69.07%)	94/776 (12.11%)	55.8
<i>matK</i>	686	429/686 (62.54%)	253/686 (36.88%)	74/686 (10.79%)	29.3
<i>rbcL</i>	471	409/471 (86.84%)	61/471 (12.95%)	27/471 (5.73%)	44.0
<i>rpoC</i>	501	482/501 (96.21%)	19/501 (3.79%)	0/501 (0%)	38.9
<i>trnH-psbA</i>	830	697/830 (83.97%)	97/830 (11.69%)	22/830 (2.65%)	29.5
<i>trnL</i>	976	771/976 (78.99%)	161/976 (16.49%)	78/976 (7.99%)	33.1

4.3. การออกแบบไพรเมอร์ ITS1, ITS2 และ *trnH-psbA*

จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ผ่านคอมพิวเตอร์ (*in silico analysis*) จากข้อ 4.2 ซึ่งพบว่าบริเวณที่มีความเหมาะสมและมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นตำแหน่งคัดแยกพีซีจีจึงมากที่สุดคือบริเวณ ITS รองลงมาได้แก่ *trnH-psbA* จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณทั้งสองตำแหน่งโดยพิจารณาจากตำแหน่ง Conserved site สำหรับการเข้าเกาะของไพรเมอร์ทั้ง Forward Primer และ Reverse Primer โดยตำแหน่ง conserved site จะอยู่คร่อมตำแหน่ง variable site (ภาพที่ 3.1) เนื่องจากตำแหน่งที่เป็น variable site จะเป็นตัวกำหนดความแตกต่างของพืชแต่ละชนิด จากนั้นสังเคราะห์ไพรเมอร์จากบริษัท Pacific Science Co.,Ltd. (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากฐานข้อมูลจำนวน 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ *trnH-psbA*, ITS1 และ ITS2

Region		Primer (5'-3')	T _m (°C)
<i>trnH-psbA</i>	FW	GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTG	57
	RW	CCGAGATATCCATTGCCGAGAGTC	57
ITS1	FW	GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTG	57
	RW	CCGAGATATCCATTGCCGAGAGTC	57
ITS2	FW	CGCCTGCTTGGGCGTCATGGC	58
	RW	GGGCCTCGCCTGACTTGGGGCC	58

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 การวิเคราะห์ไฟพรเมอร์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการจำแนกพืชวงศ์จิง

4.4.1 ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยคัดเลือกเฉพาะพืชที่ใช้ในการทดลองจำนวน 8 สปีชีส์ (ตาราง 3.1) บนฐานข้อมูล NCBI โดยใช้คำค้นคือ ชื่อสปีชีส์ + บริเวณที่ต้องการ (ได้แก่ ITS, *matK*, *rbcL*, *rpoC*, *trnH-psbA* และ *trnL*) ทำการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.1.1 ผลจากการค้นหาและคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์จิง (ภาคผนวก Supplementary Data 3.) สามารถพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์จิงทั้ง 8 ชนิดได้ 6 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง ITS มีจำนวน 10 ตัวอย่าง มีความยาว 570-654 เบส, *matK* มีจำนวน 12 ตัวอย่าง มีความยาว 777-2704 เบส, *rbcL* มีจำนวน 7 ตัวอย่าง มีความยาว 524-703 เบส, *trnH-psbA* มีจำนวน 9 ตัวอย่าง มีความยาว 647-774 เบส และ *trnL* มีจำนวน 9 ตัวอย่าง มีความยาว 730-947 เบส ยกเว้นตำแหน่ง *rpoC* ไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชทั้ง 8 ชนิดเลย ดังนั้นจึงทำการสุ่มเลือกพืชสมุนไพรที่มาจากพืชชนิดอื่นในวงศ์จิงมาทดแทน ซึ่งมีจำนวน 11 ตัวอย่าง มีความยาว 501 เบส (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 จำนวนนิวคลีโอไทด์และความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกคัดเลือกเพื่อนำมาวิเคราะห์ของพืชวงศ์จิง โดยค้นหาเฉพาะตัวอย่างพืชที่ใช้ทดลองจำนวน 8 สปีชีส์ จากตำแหน่ง ITS, *matK*, *rbcL*, *rpoC*, *trnH-psbA* และ *trnL*

Region	จำนวนตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล	ความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ (เบส)	
		สั้นสุด	ยาวสุด
ITS	10	570	654
<i>matK</i>	12	777	2704
<i>rbcL</i>	7	524	703
<i>rpoC</i> *	11	501	501
<i>trnH-psbA</i>	9	647	774
<i>trnL</i>	9	730	947

* เนื่องจากในฐานข้อมูล GenBank บริเวณตำแหน่ง *rpoC* ของพืชวงศ์จิงจำนวน 8 ชนิดดังกล่าวไม่มีในฐานข้อมูล จึงเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์จากพืชชนิดอื่นในวงศ์จิงมาทดแทน (ภาคผนวก)

4.4.2 วิเคราะห์การจับกันของไพรเมอร์กับบริเวณที่เหมาะสม

นำไพรเมอร์ที่มีในหีบปฏิบัติการจำนวน 4 คู่ ได้แก่ *matK*, *rbcL*, *rpoC*, และ *trnL* (ตารางที่ 3.2) และไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นมาใหม่จำนวน 3 คู่ ได้แก่ ITS1, ITS2 และ *trnH-psbA* มาจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชตัวอย่าง 8 สปีชีส์เพื่อทำการวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์ของการเข้าจับทั้งสาย forward primer และ reverse primer หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการจับของไพรเมอร์ (amplicons) มาเปรียบเทียบจำนวนตำแหน่งที่เป็น conserved site, variable site, singleton และ ค่า GC content จากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไพรเมอร์ทั้ง 7 คู่ พบว่าไพรเมอร์ ITS1, ITS2, *trnH-psbA*, *rbcL*, *trnL* สามารถเข้าเกาะ DNA template ได้ 100% ทั้งสาย forward และสาย reverse ส่วนไพรเมอร์ *rpoC* สาย forward สามารถเข้าจับ DNA template ได้ 100% แต่สาย reverse เข้าจับกับ DNA template ได้ 95% และไพรเมอร์ *matK* สาย forward สามารถเข้าจับ DNA template ได้ 92.31% แต่สาย reverse เข้าจับกับ DNA template ได้ 91.30% บริเวณตำแหน่ง ITS2 ที่ไพรเมอร์สามารถเข้าเกาะได้มี Variable sites มากที่สุดคือ 44.74% รองลงมาคือ ITS1, *trnH-psbA*, *rpoC*, *matK* และ *rbcL* มี Variable sites 26.71%, 12.59%, 4.00% และ 1.30% ตามลำดับ ส่วนบริเวณ *trnL* ที่ไพรเมอร์สามารถเข้าเกาะได้ไม่มีตำแหน่งที่เป็น Variable sites ในพืชวงศ์จิงเล (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์การเข้าจับของไพรเมอร์ 7 คู่

Region			ประสิทธิภาพ การเข้าจับของ ไพรเมอร์ (%)	T _m (°C)	Amplicon length (bp)	G-C content (%)	Conserved sites (%)	Variable sites (%)
<i>matK</i>	FW	CTTCTTATTTACGATTAACATCTTCT	92.31	57	154	32	98.70	1.30
	RW	TTTCTTTGATATCGAACATAATG	91.30					
<i>rbcL</i>	FW	GGTACATGGACAACGTGTGTGGA	100.00	57	149	42	99.33	0.67
	RW	ACAGAACCTTCTTCAAAAAGGTCTA	100.00					
<i>trnL</i>	FW	TGGGCAATCCTGAGCCAAATC	100.00	57	83-97	36-39	100.00	0.00
	RW	AACAGCTTCCATTGAGTCTCTGCACCT	100.00					
<i>rpoC</i>	FW	CCSATTGTATGGGAAATACTT	100.00	57	150	41-43	96.00	4.00
	RW	CTTACAAACTAATGGATGTAA	95.24					
<i>trnH-psbA</i>	FW	GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTG	100.00	57	124-141	17-20	87.41	12.59
	RW	CCGAGATATCCATTGCCGAGAGTC	100.00					
<i>ITS1</i>	FW	GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTG	100.00	57	213-237	53-60	63.18	26.71
	RW	CCGAGATATCCATTGCCGAGAGTC	100.00					
<i>ITS2</i>	FW	CGCCTGCTTGGGCGTCATGGC	100.00	58	264 - 289	60-67	54.61	44.74
	RW	CCGAGATATCCATTGCCGAGAGTC	100.00					

4.5 ดีเอ็นเอพืช

นำตัวอย่างพืชสด ตัวอย่างพืชแห้งและตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชนิดผงแห้ง มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Plant DNA Extraction Kit (Vivantis, USA) โดยดีเอ็นเอบางส่วนนำไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอะการโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) ร่วมกับการตรวจสอบด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (BioDrop, UK) ผลการตรวจสอบพบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี และมีความบริสุทธิ์สูง จากนั้นปรับปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้เท่ากันทุกตัวอย่าง โดยกำหนดให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 30 ng/μl

4.6 Realtime PCR และ HRM analysis

นำดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างที่สกัดและปรับความเข้มข้นเรียบร้อยแล้วมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการด้วยการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบเรียลไทม์ (Realtime Polymerase Chain Reaction : Realtime PCR) จากนั้นทำ HRM ผลที่ได้จากการทำ HRM จะอยู่ในรูปแบบของค่า T_m และ melting curve ซึ่งจะถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อหาความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละชนิด ความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับค่า T_m และลักษณะรูปร่างของกราฟ ที่คำนวณจากโปรแกรม Eco Real-Time PCR System Software v5.0 โดยใช้ค่าความเชื่อมั่น $\alpha=0.1$ พบว่า

4.6.1 ทำ HRM เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ทั้ง 7 คู่ โดยใช้พืชที่ทำการทดลอง 3 ชนิด ได้แก่ *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* และ *Kaempferia parviflora* (ใช้ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)

เลือกตัวอย่างตัวแทนพืชแต่ละสกุลของพืชวงศ์ขิงซึ่งได้แก่ *Zingiber officinale* (*Zingiber*) *Curcuma longa* (*Curcuma*) และ *Kaempferia parviflora* (*Kaempferia*) พบว่า เมื่อดูจากค่า T_m (ตาราง 4.7) และรูปร่างลักษณะของกราฟ

ไพรเมอร์ *matK* (ภาพ 4.2 A และ B) สามารถจำแนกพืช 3 ชนิดออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 ($T_m = 77.90 - 78.00$ °C) : *Zingiber officinale* กลุ่มที่ 2 ($T_m = 78.30 - 78.50$ °C) : *Curcuma longa* และ *Kaempferia parviflora*

ไพรเมอร์ *rpoC* (ภาพ 4.3 A และ B) สามารถจำแนกพืช 3 ชนิดออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 ($T_m = 79.60 - 79.70$ °C) : *Zingiber officinale* และ *Curcuma longa* กลุ่มที่ 2 ($T_m = 79.90 - 80.00$ °C) : *Kaempferia parviflora*

ไพรเมอร์ *rbcL* (ภาพ 4.4 A และ B) สามารถจำแนกพืช 3 ชนิดออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 ($T_m = 81.90\text{ }^{\circ}\text{C}$) : *Zingiber officinale* และ *Kaempferia parviflora* กลุ่มที่ 2 ($T_m = 81.2\text{ }^{\circ}\text{C}$) : *Curcuma longa*

ไพรเมอร์ *trnL* (ภาพ 4.5 A และ B) ไม่สามารถจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้

ไพรเมอร์ ITS1 (ภาพ 4.6 A และ B) สามารถจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ($T_m = 89.60 - 89.70\text{ }^{\circ}\text{C}$) : *Zingiber officinale* กลุ่มที่ 2 ($T_m = 88.00\text{ }^{\circ}\text{C}$) : *Curcuma longa* กลุ่มที่ 3 ($T_m = 87.80\text{ }^{\circ}\text{C}$) : *Kaempferia parviflora*

ไพรเมอร์ ITS2 (ภาพ 4.7 A และ B) สามารถจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ($T_m = 90.60 - 90.70\text{ }^{\circ}\text{C}$) : *Zingiber officinale* กลุ่มที่ 2 ($T_m = 88.90 - 90.0\text{ }^{\circ}\text{C}$) : *Curcuma longa* กลุ่มที่ 3 ($T_m = 90.90 - 91.00\text{ }^{\circ}\text{C}$) : *Kaempferia parviflora*

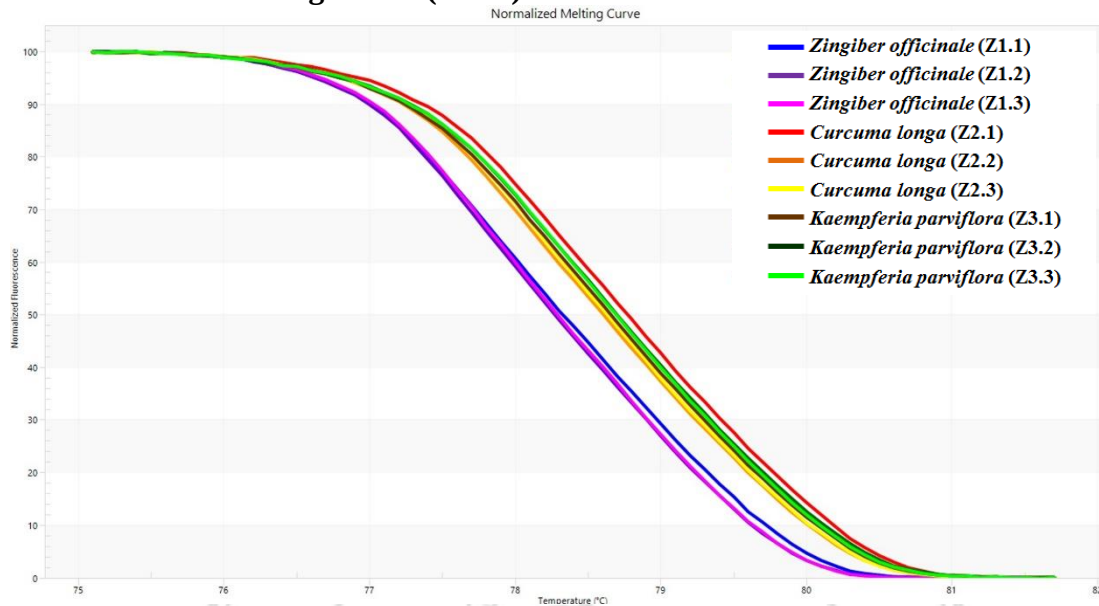
ไพรเมอร์ *trnH-psbA* (ภาพ 4.8 A และ B) สามารถจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ($T_m = 74.60 - 74.70\text{ }^{\circ}\text{C}$) : *Zingiber officinale* กลุ่มที่ 2 ($T_m = 72.50 - 72.60\text{ }^{\circ}\text{C}$) : *Curcuma longa* กลุ่มที่ 3 ($T_m = 73.40 - 73.50\text{ }^{\circ}\text{C}$) : *Kaempferia parviflora*

จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่า ไพรเมอร์ ITS1, ITS2 และ *trnH-psbA* เท่านั้นที่สามารถแยกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้

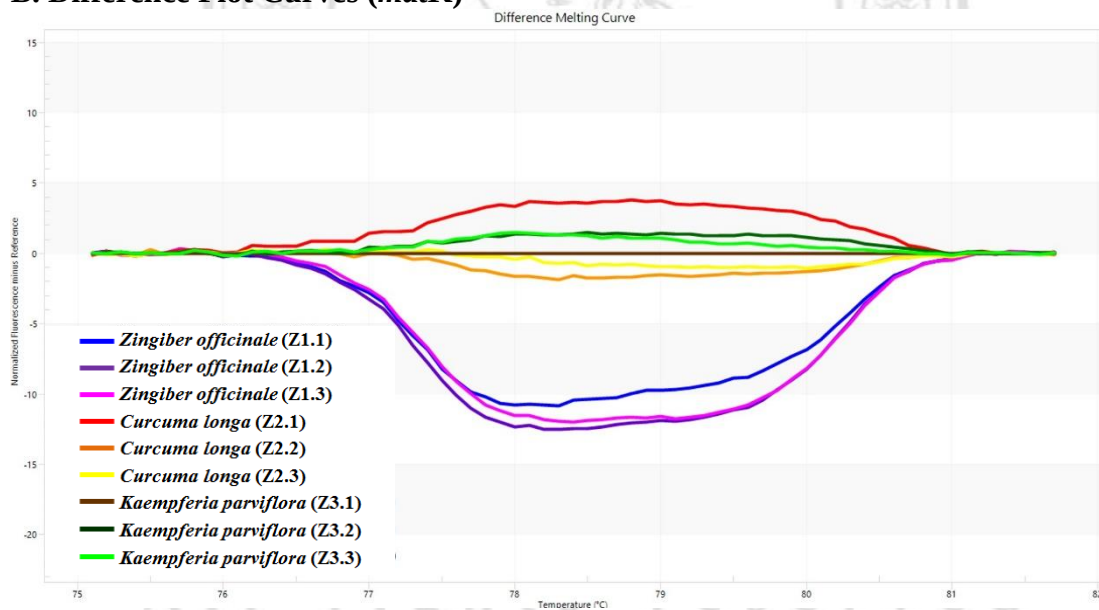
ตารางที่ 4.7 ค่า T_m ของพืชแต่ละชนิดเมื่อทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ *matK*, *rpoC*, *trnL*, *rbcL*, *trnH-psbA*, ITS1 และ ITS2

No.	Name	Mark	Scientific Name	T _m						
				matK	rpoC	trnL	rbcL	ITS1	ITS2	trnH-psbA
1	ขิง	S1.1	Zingiber officinale	78.00	79.70	76.20	81.90	89.60	90.70	74.60
		S1.2		77.90	79.70	76.10	81.90	89.60	90.60	74.60
		S1.3		78.00	79.70	76.10	81.90	89.70	90.70	74.70
		Mean		77.97	79.70	76.13	81.90	89.63	90.67	74.63
2	ขมิ้นชัน	S2.1	Curcuma longa	78.50	79.60	76.50	81.20	88.00	89.10	72.60
		S2.2		78.30	79.60	76.60	81.20	88.00	88.90	72.50
		S2.3		78.40	79.70	76.60	81.20	88.00	88.90	72.60
		Mean		78.40	79.63	76.57	81.20	88.00	88.97	72.57
3	กระชายดำ	S3.1	Kaempferia parviflora	78.40	80.00	76.50	81.90	87.80	90.90	73.50
		S3.2		78.40	80.00	76.40	81.90	87.80	90.90	73.50
		S3.3		78.50	79.90	76.40	81.90	87.80	91.00	73.40
		Mean		78.43	79.97	76.43	81.90	87.80	90.93	73.47

A. Normalized Melting Curve (*matK*)

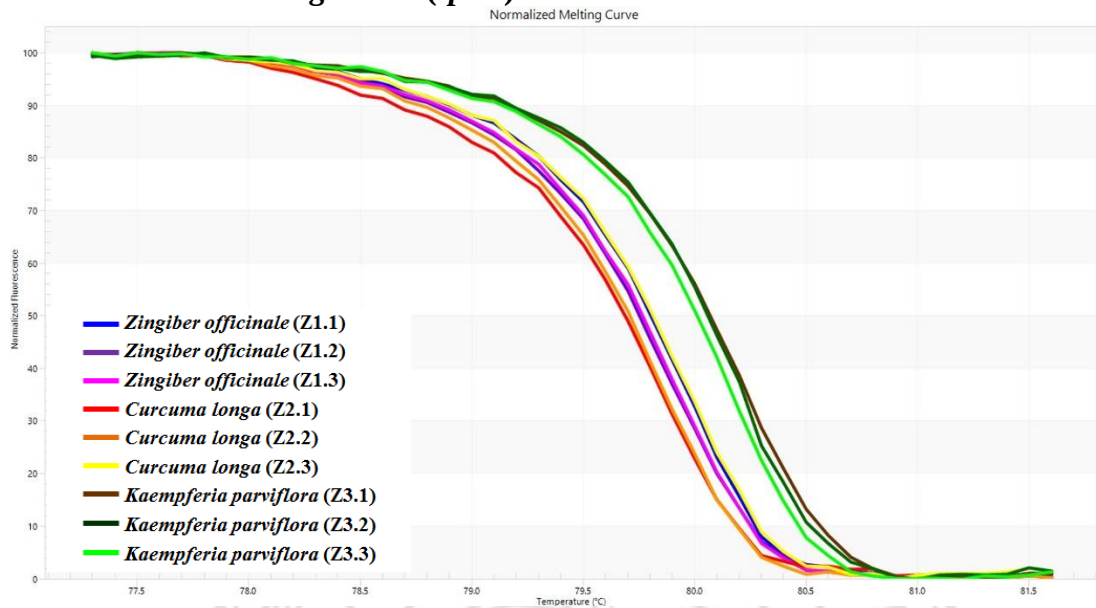


B. Difference Plot Curves (*matK*)

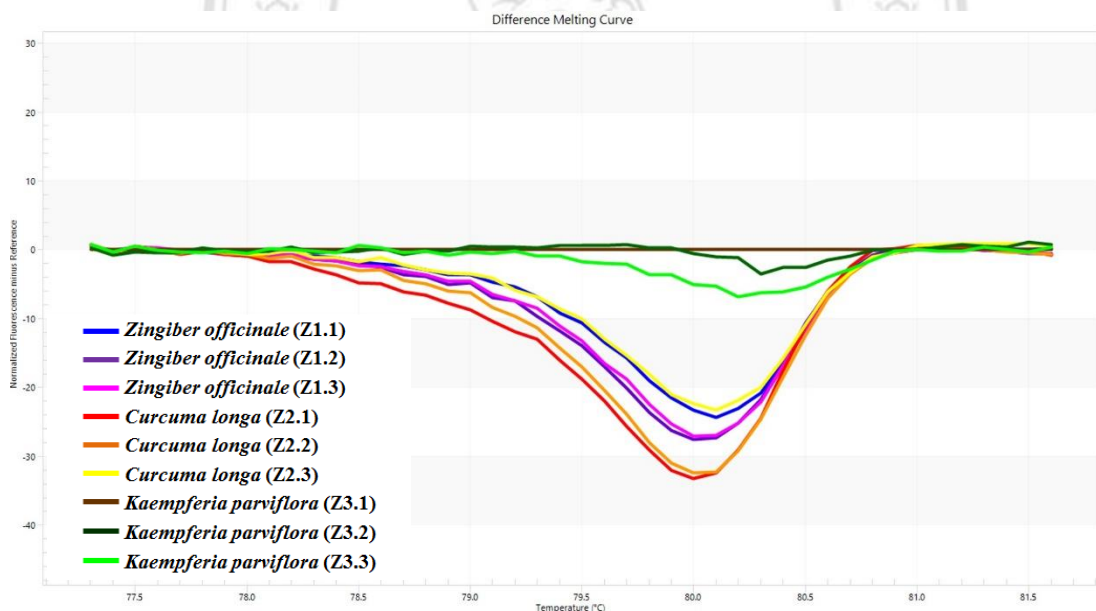


ภาพที่ 4.2 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ *matK* แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของกราฟ melting curves (aligned melt curves) ของ amplicons สำหรับพืช 3 ชนิด (ชนิดละ 3 ซ้ำ) A.แสดงผลแบบ Normalized Melting Curve แกน Y คืออัตราการเรืองแสงของสี Fluorescence แกน X คือ degrees Celsius (°C) B. แสดงผลแบบ Difference Plot Curves เปรียบเทียบความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดโดยใช้ *Kaempferia parviflora* เป็นตัวอ้างอิง โดยใช้ค่าความเชื่อมั่นในการจำแนกพืชแต่ละชนิดที่ 90%

A. Normalized Melting Curve (*rpoC*)

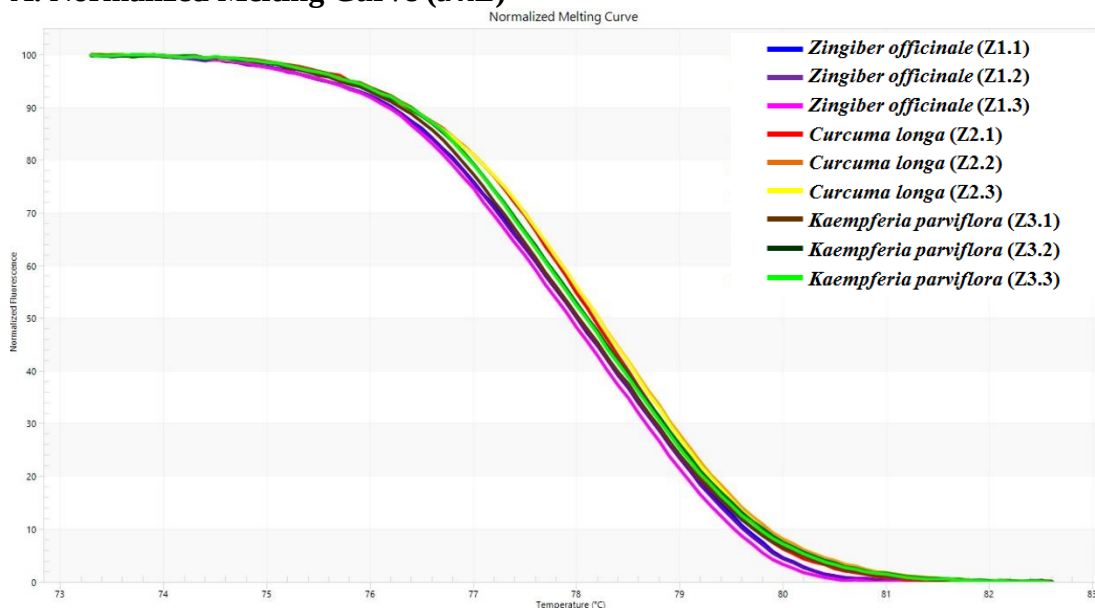


B. Difference Plot Curves (*rpoC*)

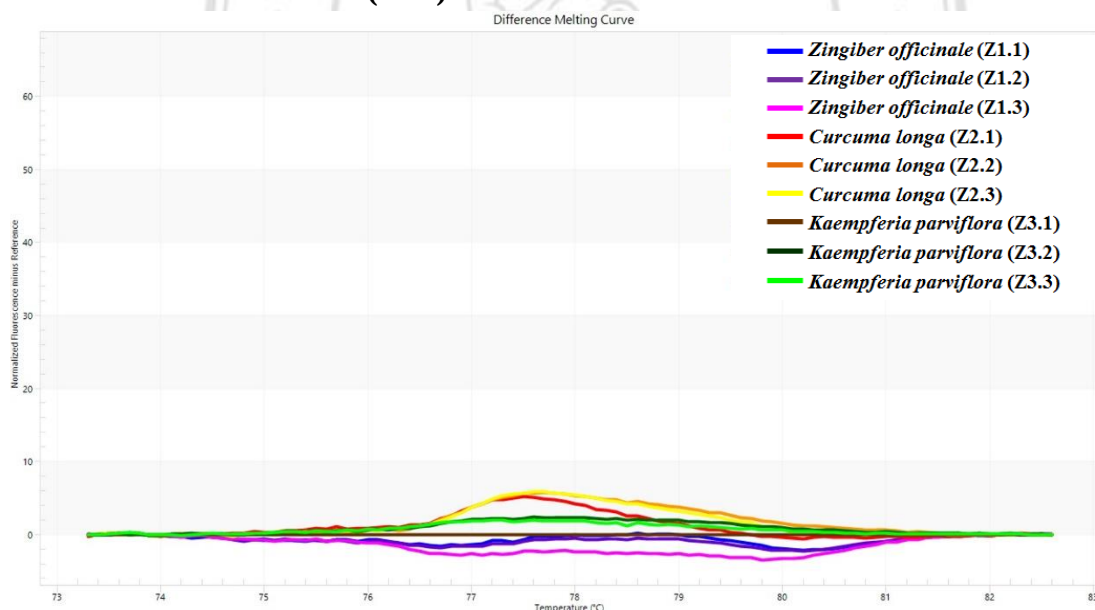


ภาพที่ 4.3 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ *rpoC* แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของกราฟ melting curves (aligned melt curves) ของ amplicons สำหรับพืช 3 ชนิด (ชนิดละ 3 ซ้ำ) A. แสดงผลแบบ Normalized Melting Curve แกน Y คืออัตราการเรืองแสงของสี Fluorescence แกน X คือ degrees Celsius (°C) B. แสดงผลแบบ Difference Plot Curves เปรียบเทียบความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดโดยใช้ *Kaempferia parviflora* เป็นตัวอ้างอิง โดยใช้ค่าความเชื่อมั่นในการจำแนกพืชแต่ละชนิดที่ 90%

A. Normalized Melting Curve (*trnL*)

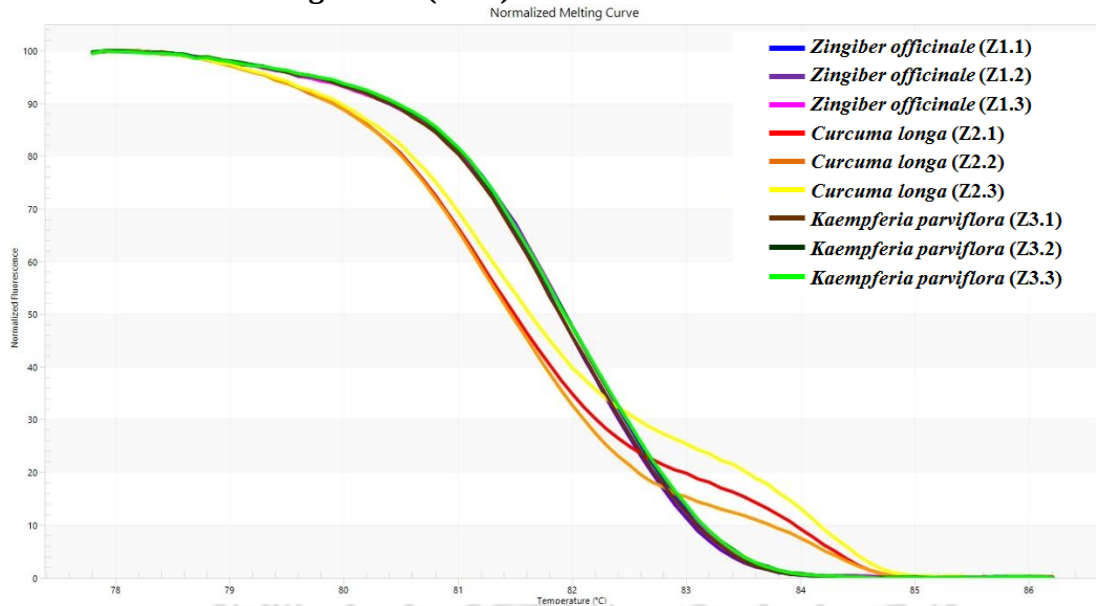


B. Difference Plot Curves (*trnL*)

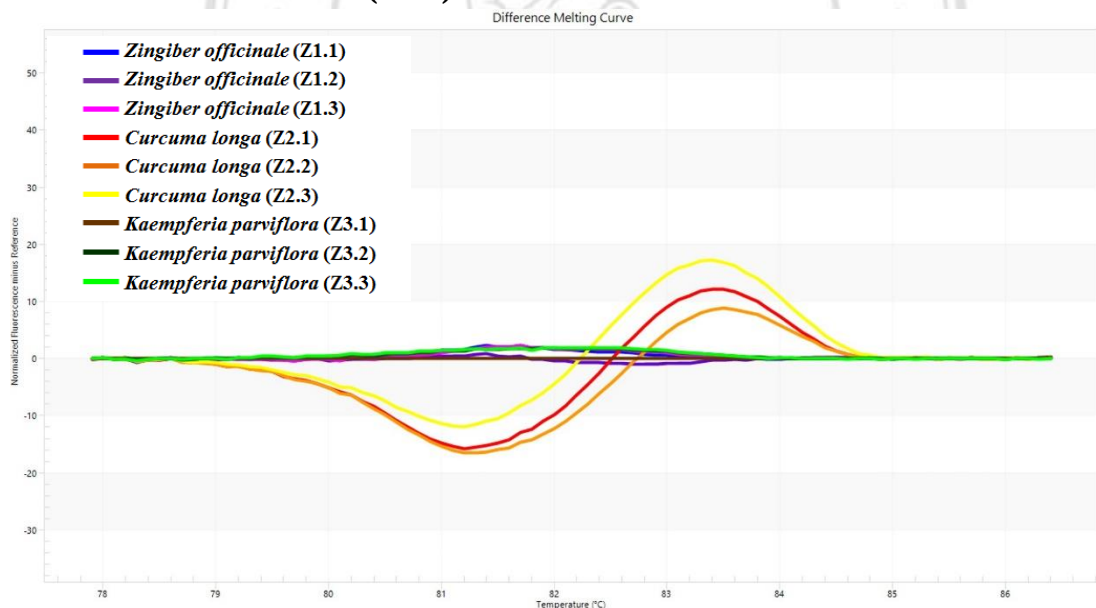


ภาพที่ 4.4 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ *trnL* แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของกราฟ melting curves (aligned melt curves) ของ amplicons สำหรับพืช 3 ชนิด (ชนิดละ 3 ซ้ำ) A.แสดงผลแบบ Normalized Melting Curve แกน Y คืออัตราการเรืองแสงของสี Fluorescence แกน X คือ degrees Celsius (°C) B. แสดงผลแบบ Difference Plot Curves เปรียบเทียบความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดโดยใช้ *Kaempferia parviflora* เป็นตัวอ้างอิง โดยใช้ค่าความเชื่อมั่นในการจำแนกพืชแต่ละชนิดที่ 90%

A. Normalized Melting Curve (*rbcL*)

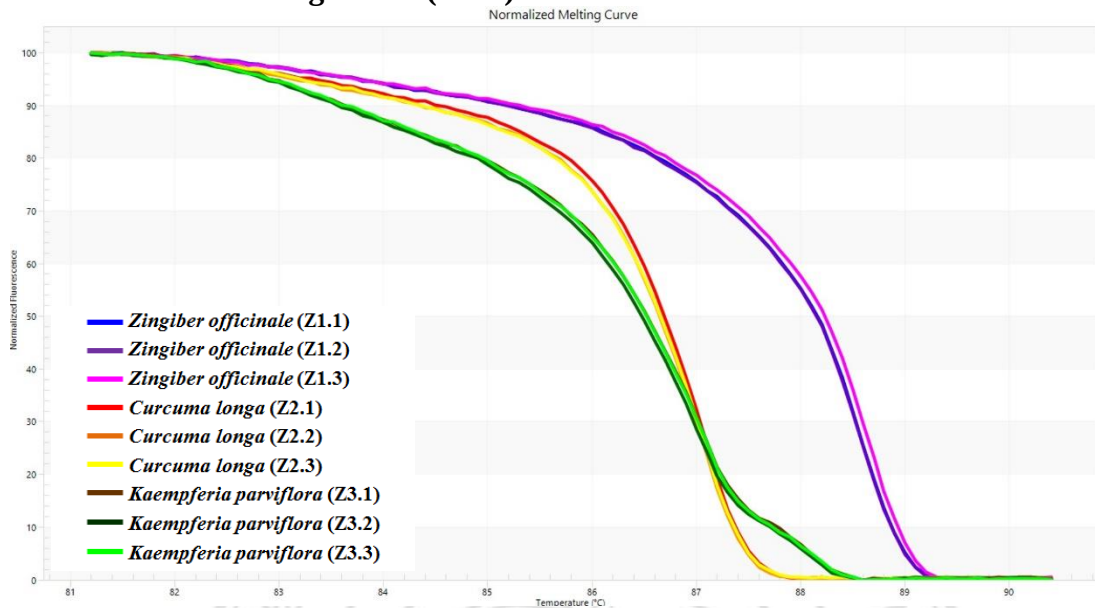


B. Difference Plot Curves (*rbcL*)

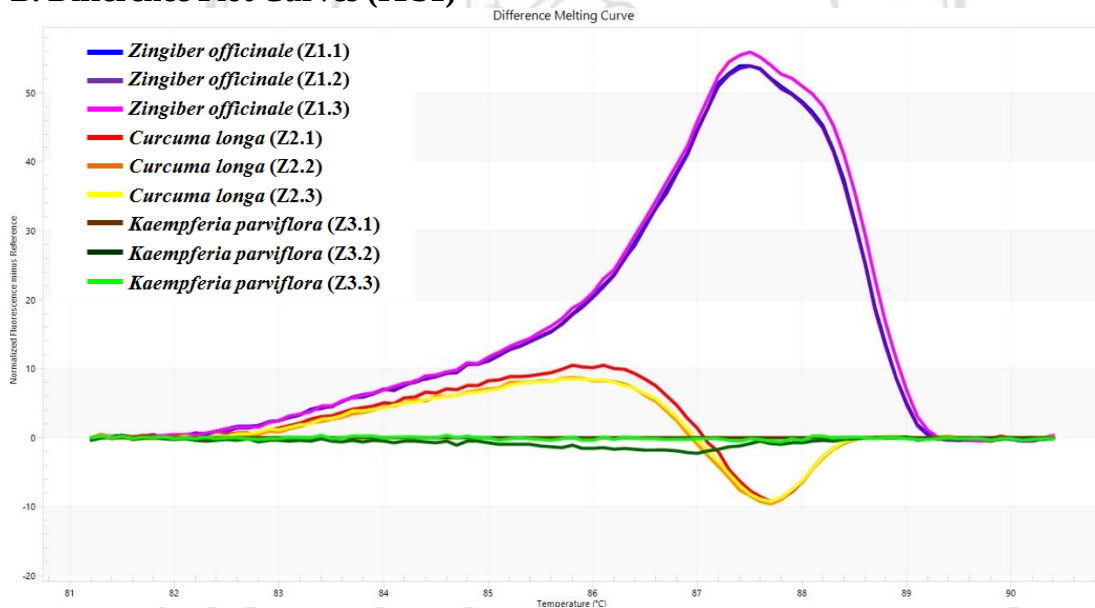


ภาพที่ 4.5 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ *rbcL* แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของกราฟ melting curves (aligned melt curves) ของ amplicons สำหรับพืช 3 ชนิด (ชนิดละ 3 ซ้ำ) A. แสดงผลแบบ Normalized Melting Curve แกน Y คืออัตราการเรืองแสงของสี Fluorescence แกน X คือ degrees Celsius (°C) B. แสดงผลแบบ Difference Plot Curves เปรียบเทียบความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดโดยใช้ *Kaempferia parviflora* เป็นตัวอ้างอิง โดยใช้ค่าความเชื่อมั่นในการจำแนกพืชแต่ละชนิดที่ 90%

A. Normalized Melting Curve (ITS1)

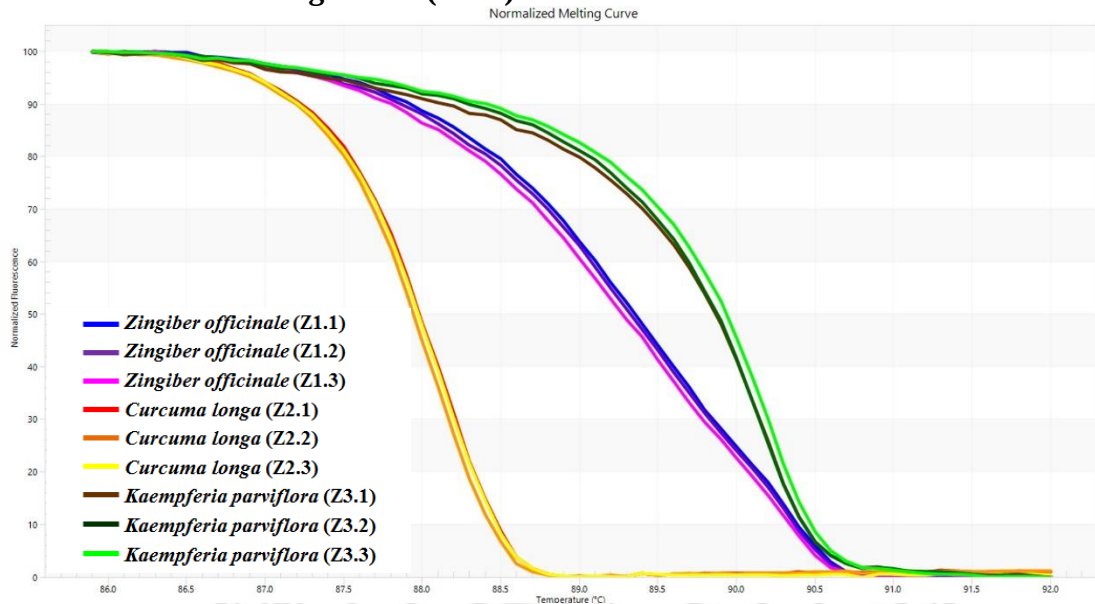


B. Difference Plot Curves (ITS1)

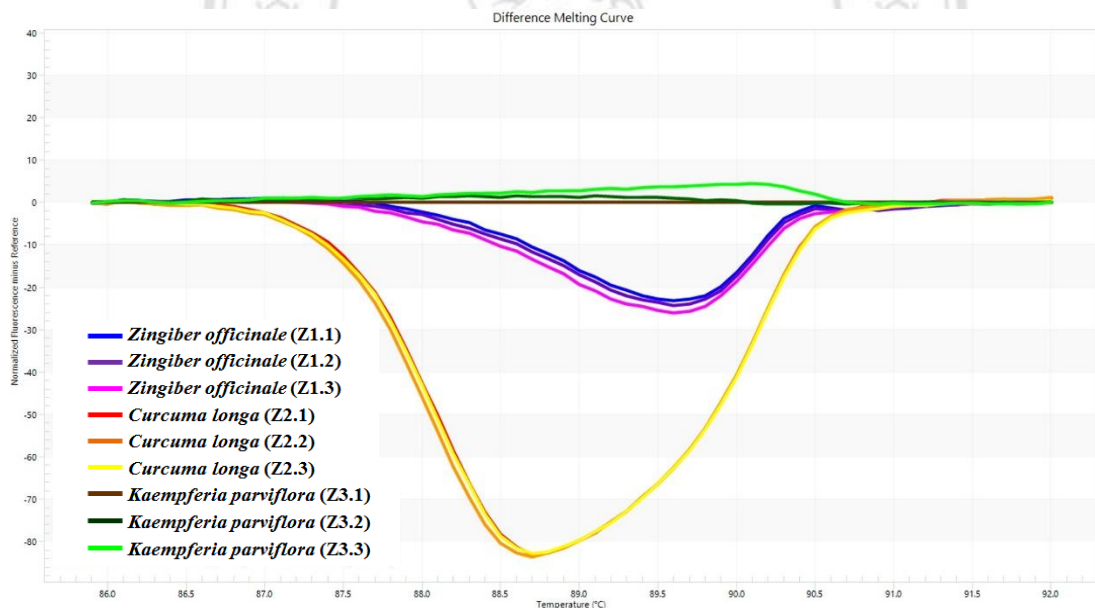


ภาพที่ 4.6 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของกราฟ melting curves (aligned melt curves) ของ amplicons สำหรับพืช 3 ชนิด (ชนิดละ 3 ซ้ำ) A.แสดงผลแบบ Normalized Melting Curve แกน Y คืออัตราการเรืองแสงของสี Fluorescence แกน X คือ degrees Celsius (°C) B. แสดงผลแบบ Difference Plot Curves เปรียบเทียบความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดโดยใช้ *Kaempferia parviflora* เป็นตัวอ้างอิง โดยใช้ค่าความเชื่อมั่นในการจำแนกพืชแต่ละชนิดที่ 90%

A. Normalized Melting Curve (ITS2)

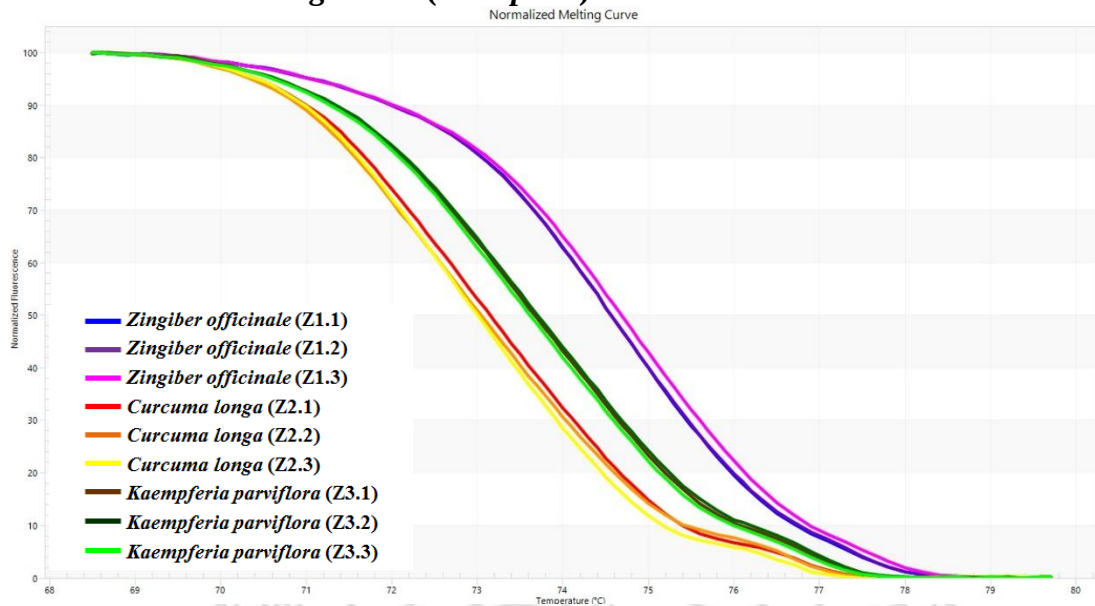


B. Difference Plot Curves (ITS2)

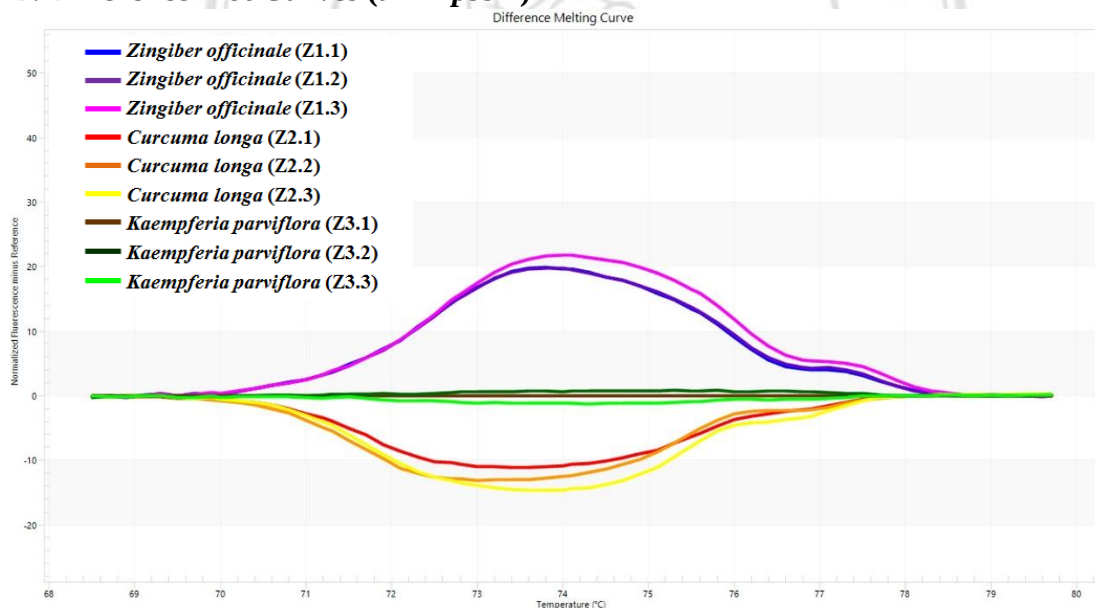


ภาพที่ 4.7 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2 แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของกราฟ melting curves (aligned melt curves) ของ amplicons สำหรับพืช 3 ชนิด (ชนิดละ 3 ซ้ำ) A.แสดงผลแบบ Normalized Melting Curve แกน Y คืออัตราการเรืองแสงของสี Fluorescence แกน X คือ degrees Celsius (°C) B. แสดงผลแบบ Difference Plot Curves เปรียบเทียบความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดโดยใช้ *Kaempferia parviflora* เป็นตัวอ้างอิง โดยใช้ค่าความเชื่อมั่นในการจำแนกพืชแต่ละชนิดที่ 90%

A. Normalized Melting Curve (*trnH-psbA*)



B. Difference Plot Curves (*trnH-psbA*)



ภาพที่ 4.8 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ *trnH-psbA* แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของกราฟ melting curves (aligned melt curves) ของ amplicons สำหรับพืช 3 ชนิด (ชนิดละ 3 ซ้ำ) A. แสดงผลแบบ Normalized Melting Curve แกน Y คืออัตราการเรืองแสงของสี Fluorescence แกน X คือ degrees Celsius (°C) B. แสดงผลแบบ Difference Plot Curves เปรียบเทียบความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดโดยใช้ *Kaempferia parviflora* เป็นตัวอ้างอิง โดยใช้ค่าความเชื่อมั่นในการจำแนกพืชแต่ละชนิดที่ 90%

4.6.2. เลือกใช้ไพรเมอร์ที่ดีที่สุดในการทำ HRM เพื่อจำแนกพืชวงศ์ขิงจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ ขิง (*Zingiber officinale*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*) กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) กระชาย (*Boesenbergia rotunda*) ไพล (*Zingiber montanum*) ข่า (*Alpinia galanga*) และกระวาน (*Amomum krervanh*)

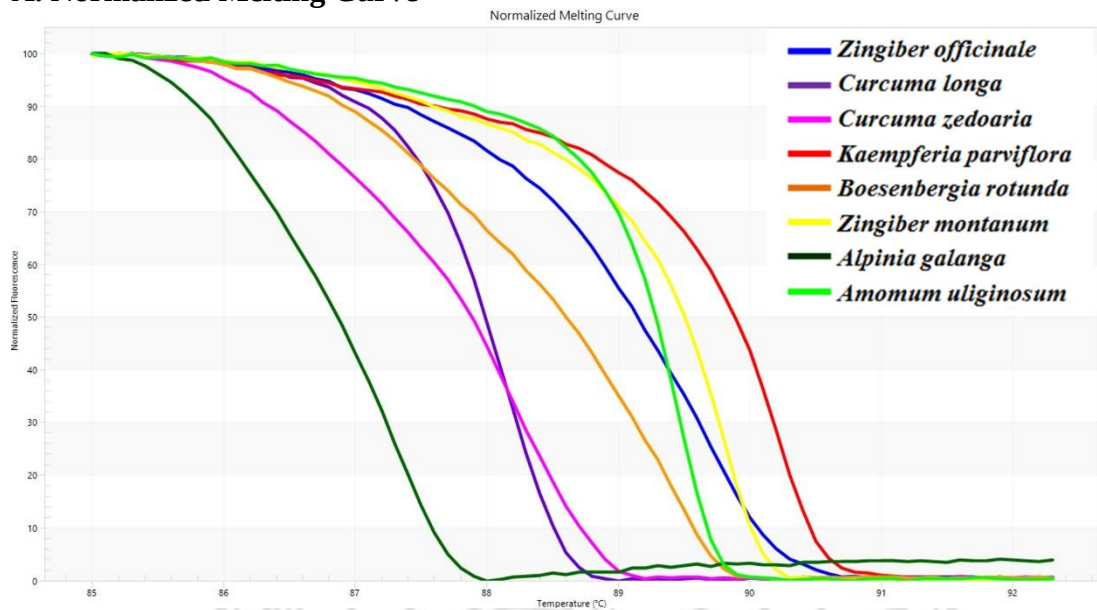
ไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพดีเพียงพอที่จะใช้ในการจัดจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ ได้แก่ ITS1, ITS2 และ *trnH-psbA* เมื่อพิจารณาจากค่าความแตกต่างของค่า T_m ตำแหน่ง Variable site และความแตกต่างของรูปร่างลักษณะของกราฟ จึงเลือกใช้ตำแหน่ง ITS2 มาทำการทดลองในขั้นตอนต่อไปในการทำ HRM เพื่อจำแนกพืชวงศ์ขิงจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ ขิง (*Zingiber officinale*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*) กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) กระชาย (*Boesenbergia rotunda*) ไพล (*Zingiber montanum*) ข่า (*Alpinia galanga*) และกระวาน (*Amomum krervanh*) จากการทดลองพบว่าไพรเมอร์ ITS2 มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกพืชวงศ์ขิงได้ดีมาก เมื่อพิจารณาจากค่า T_m (ตาราง 4.8) และรูปร่างลักษณะของกราฟ (ภาพ 4.9 A และ B) โดยสามารถจัดจำแนกพืชสมุนไพรวงศ์ขิง 8 ชนิด ออกจากกันได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 4.8 ค่า T_m ของพืชสมุนไพรในวงศ์จิงแต่ละชนิดเมื่อทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2

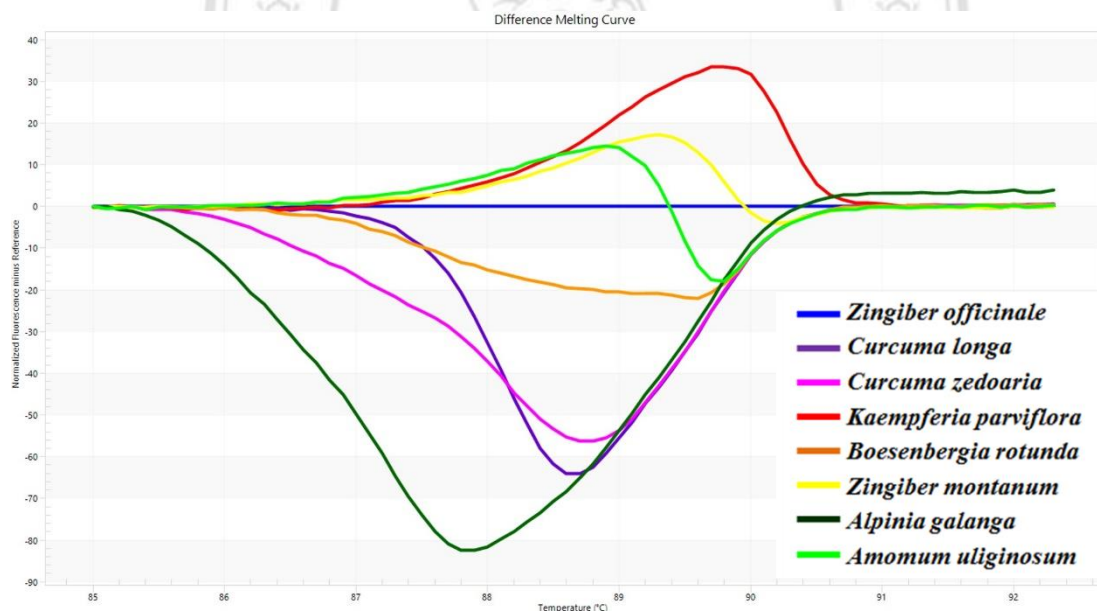
No.	Scientific Name	T_m (°C)
		Dried
1	<i>Zingiber officinale</i>	89.40 ±0.10
2	<i>Curcuma longa</i>	88.00 ±0.10
3	<i>Curcuma zedoaria</i>	88.10 ±0.20
4	<i>Kaempferia parviflora</i>	90.00 ±0.10
5	<i>Boesenbergia rotunda</i>	89.00 ±0.10
6	<i>Zingiber montanum</i>	89.60 ±0.10
7	<i>Alpinia galanga</i>	86.90 ±0.10
8	<i>Amomum uliginosum</i>	89.30 ±0.10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

A. Normalized Melting Curve



B. Difference Plot Curves



ภาพที่ 4.9 ผลการทำ HRM โดยใช้โปรแกรม ITS2 เพื่อแยกความแตกต่างของพืชสมุนไพรวงศ์ขิงจำนวน 8 ชนิด แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของกราฟ melting curves (aligned melt curves) ของ amplicons สำหรับพืช 8 ชนิด A.แสดงผลแบบ Normalized Melting Curve แกน Y คือ อัตราการเรืองแสงของสี Fluorescence แกน X คือ degrees Celsius (°C) B. แสดงผลแบบ Difference Plot Curves เปรียบเทียบความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดโดยใช้ *Zingiber officinale* เป็นตัวอ้างอิง โดยใช้ค่าความเชื่อมั่นในการจำแนกพืชแต่ละชนิดที่ 90%

4.6.3. ทำ HRM เพื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้ตัวอย่างพืชแบบสดและแบบแห้งโดยใช้ตัวอย่างพืชทั้ง 8 ชนิด

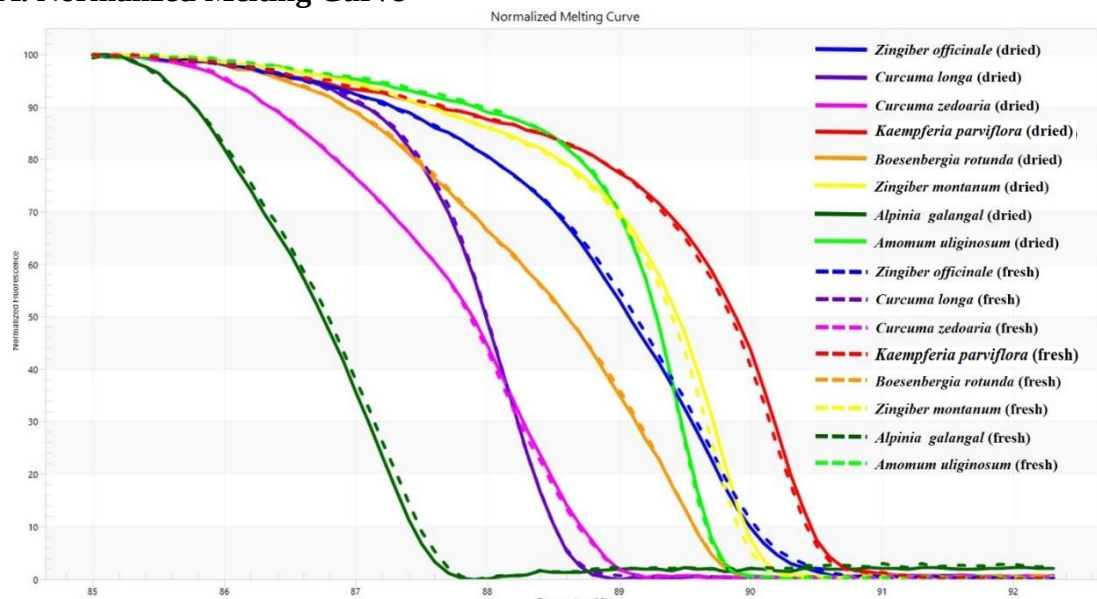
ผลจากการทดลองเปรียบเทียบตัวอย่างสดที่ได้ระบุชนิดพืชด้วยลักษณะพื้นฐานวิทยาถูกต้องแล้ว โดยพิจารณาจากค่า T_m (ตาราง 4.9) และรูปร่างลักษณะของกราฟ (ภาพ 4.10 A และ B) ให้ผลไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบค่า T_m ของพืชสมุนไพรในวงศ์ขิงแบบสดและแบบแห้ง
เมื่อทำ HRM โดยใช้ไพรมอร์ ITS2

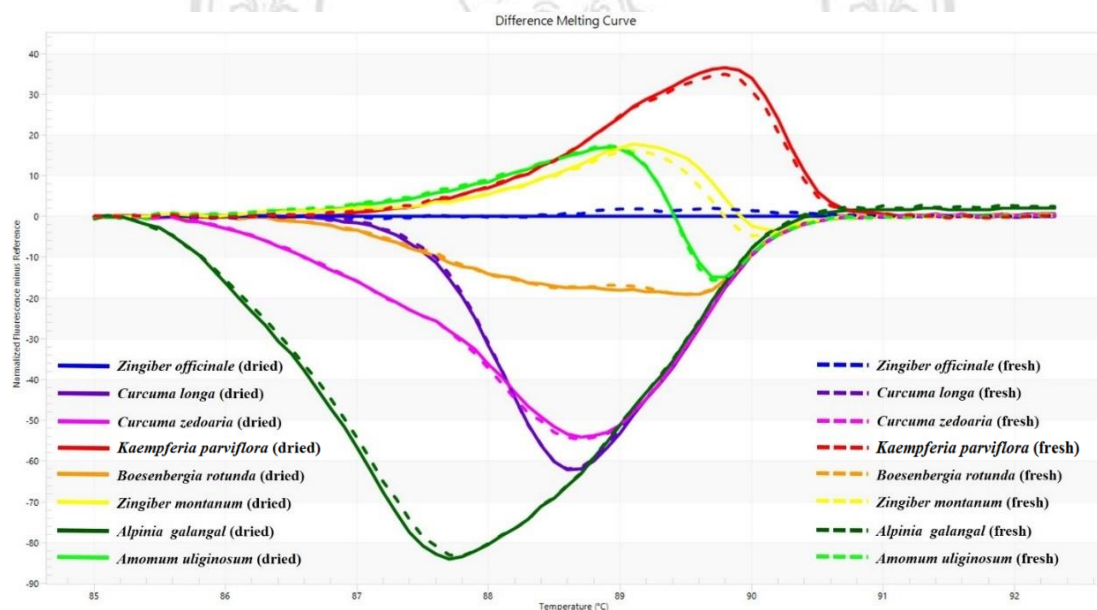
No.	Scientific Name	T_m (°C)	
		Dried	Fresh
1	<i>Zingiber officinale</i>	89.40 ±0.10	89.40 ±0.10
2	<i>Curcuma longa</i>	88.00 ±0.10	87.90 ±0.20
3	<i>Curcuma zedoaria</i>	88.10 ±0.20	88.10 ±0.20
4	<i>Kaempferia parviflora</i>	90.00 ±0.10	90.00 ±0.10
5	<i>Boesenbergia rotunda</i>	89.00 ±0.10	89.00 ±0.10
6	<i>Zingiber montanum</i>	89.60 ±0.10	89.50 ±0.20
7	<i>Alpinia galanga</i>	86.90 ±0.10	86.80 ±0.10
8	<i>Amomum uliginosum</i>	89.30 ±0.10	89.30 ±0.10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

A. Normalized Melting Curve



B. Difference Plot Curves



ภาพที่ 4.10 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของพืชสมุนไพร วงศ์ขิงจำนวน 8 ชนิดแบบสดและแบบแห้ง แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของกราฟ melting curves (aligned melt curves) ของ amplicons สำหรับพืช 8 ชนิด A. แสดงผลแบบ Normalized Melting Curve แกน Y คืออัตราการเรืองแสงของสี Fluorescence แกน X คือ degrees Celsius ($^{\circ}\text{C}$) B. แสดงผลแบบ Difference Plot Curves เปรียบเทียบความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดโดยใช้ *Zingiber officinale* เป็นตัวอ้างอิง โดยใช้ค่าความเชื่อมั่นในการจำแนกพืชแต่ละชนิดที่ 90%

4.6.4. ทำ HRM เพื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างอ้างอิงและตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์ (Commercial product)

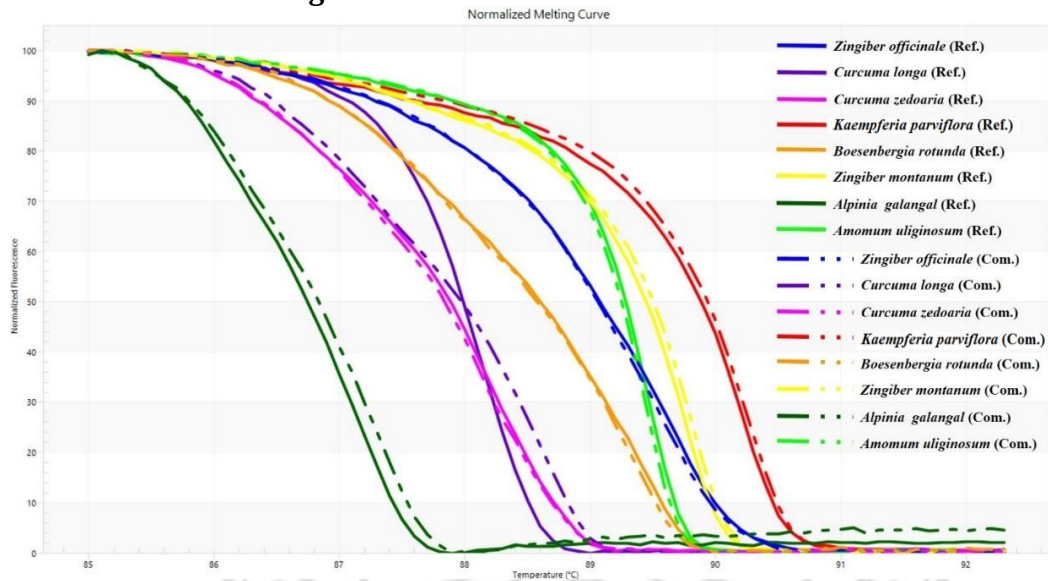
จากการทดลองใช้ไพรเมอร์ ITS2 ในการทำ HRM เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์สมุนไพรในท้องตลาดเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง พบว่าสามารถระบุและจัดจำแนกพืชสมุนไพรได้อย่างถูกต้อง จากการทดลองพบว่าพืชสมุนไพรที่ชื่อมาระบุหน้าซองว่าเป็นชนิด *Curcuma longa* แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี HRM และพิจารณาจากค่า T_m (ตาราง 4.10) และรูปร่างลักษณะของกราฟ (ภาพ 4.11 A และ B) ปรากฏว่าเป็นชนิด *Curcuma zedoaria*

ตารางที่ 4.10 การเปรียบเทียบค่า T_m ของพืชสมุนไพรที่วางขายในท้องตลาดเทียบกับตัวอย่างอ้างอิงเมื่อทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2

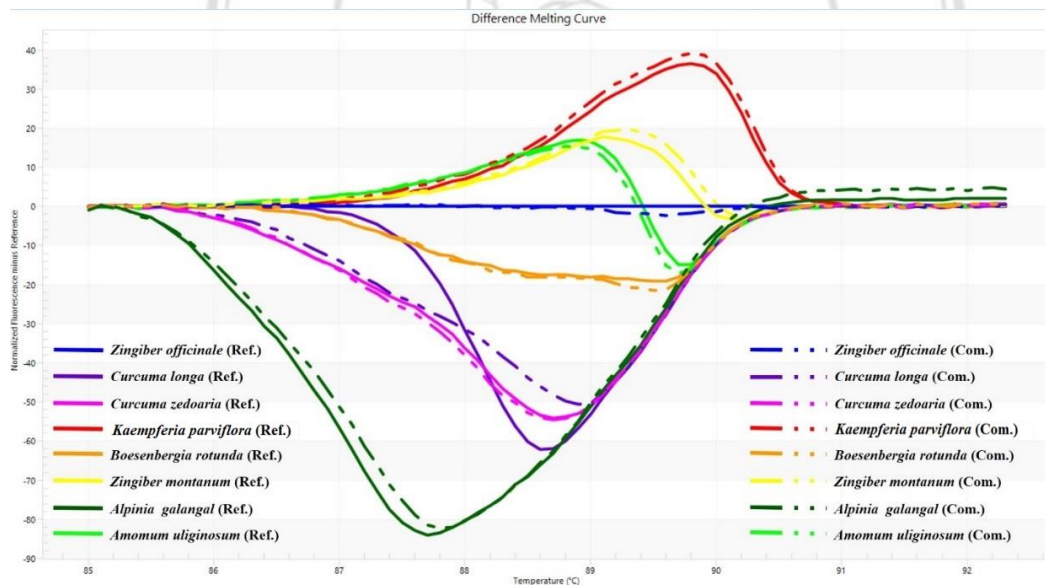
No.	Scientific Name	T_m (°C)	
		Reference	Commercial
1	<i>Zingiber officinale</i>	89.40 ±0.10	89.30 ±0.20
2	<i>Curcuma longa</i>	88.00 ±0.10	88.30 ±0.30
3	<i>Curcuma zedoaria</i>	88.10 ±0.20	88.10 ±0.20
4	<i>Kaempferia parviflora</i>	90.00 ±0.10	90.00 ±0.10
5	<i>Boesenbergia rotunda</i>	89.00 ±0.10	89.00 ±0.20
6	<i>Zingiber montanum</i>	89.60 ±0.10	89.60 ±0.20
7	<i>Alpinia galanga</i>	86.90 ±0.10	86.90 ±0.20
8	<i>Amomum uliginosum</i>	89.30 ±0.10	89.40 ±0.20

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

A. Normalized Melting Curve



B. Difference Plot Curves



ภาพที่ 4.11 ผลการทำ HRM โดยใช้โปรแกรม ITS2 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของพืชสมุนไพรวงศ์ขิงจำนวน 8 ชนิด แบบที่วางขายในท้องตลาดเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของกราฟ melting curves (aligned melt curves) ของ amplicons สำหรับพืช 8 ชนิด A. แสดงผลแบบ Normalized Melting Curve แกน Y คืออัตราการเรืองแสงของสี Fluorescence แกน X คือ degrees Celsius ($^{\circ}\text{C}$) B. แสดงผลแบบ Difference Plot Curves เปรียบเทียบความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดโดยใช้ *Zingiber officinale* เป็นตัวอ้างอิง โดยใช้ค่าความเชื่อมั่นในการจำแนกพืชแต่ละชนิดที่ 90%