

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 Data Mining

จากการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ในบริเวณตำแหน่ง *matK*, *trnH-psbA*, *rbcL*, *trnL* ในคลอโรพลาสต์จีโนม และตำแหน่ง ITS ในนิวเคลียสจีโนม ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกนำเสนอให้ใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการคัดแยกหรือระบุชนิดของพืช (CBOL Plant Working Group, 2009) เนื่องจากบริเวณดังกล่าวข้างต้นมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการจัดจำแนกพืชได้ โดยใช้คำค้นว่า Zingiberaceae + บริเวณที่ต้องการ ได้แก่ ITS, *matK*, *rbcL*, *rpoC*, *trnH-psbA* และ *trnL* พบจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 930, 879, 425, 60, 647 และ 436 ตัวอย่างตามลำดับ พบพืชสกุล *Curcuma* มีจำนวนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุด รองลงมาคือ *Alpinia*, *Amomum*, *Globba*, *Zingiber* และ *Boesenbergia* ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS มีความยาว 208-2661 เบส, บริเวณ *matK* มีความยาว 209-3315 เบส, บริเวณ *rbcL* มีความยาว 153-1548 เบส, บริเวณ *rpoC* มีความยาว 501 เบส, บริเวณ *trnH-psbA* มีความยาว 153-1243 เบส, และบริเวณ *trnL* มีความยาว 188-962 เบส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Maknoi ในปี 2006 พืชสกุล *Curcuma*, *Alpinia*, *Amomum*, *Globba*, *Zingiber* และ *Boesenbergia* เป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดของพืชวงศ์ขิง อีกทั้งพืชในสกุลดังกล่าวส่วนมากเป็นพืชที่มีสรรพคุณเป็นสมุนไพร จึงทำให้มีผู้สนใจและทำให้มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank มาก หลังจากนั้นทำการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank เช่น NCBI, DDBJ และ EMBL ไม่ได้มีความน่าเชื่อถือเสมอไป เพราะอาจมีตัวอย่างที่ระบุชนิดผิดพลาด มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากชนิดอื่น หรือมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกับความจริง (Harris, 2003; Vilgalis, 2003; Valentini *et al.*, 2009) นอกจากนี้ข้อมูลที่ไม่มีความน่าเชื่อถือ เพราะลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บันทึกไว้ไม่มี voucher specimens และ electrophoregrams แสดงไว้ (Chase *et al.*, 2007; Ford *et al.*, 2009) และที่สำคัญคือไม่ทราบว่าผู้ที่นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาบันทึกไว้ ระบุชนิดพืชได้อย่างถูกต้องหรือไม่ เพราะมีรายงานว่าประมาณ 20% ของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank มีการระบุชนิดผิด (Vilgalis, 2003) จึงต้องทำ

การคัดเลือกโดยตัดพืชตัวอย่างที่มี %N มากกว่า 3% ออกไป เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มี %N มากกว่า 3% ถือว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีคุณภาพ จึงไม่เหมาะสมในการนำมาเปรียบเทียบ อีกประการหนึ่งคือบริเวณตำแหน่งต่างๆ มีความยาวค่อนข้างมาก แต่คณะนักวิจัยหลายๆ คณะอาจจะใช้ไพรเมอร์ที่ต่างกันทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความแตกต่างกันถึงแม้ว่าจะใช้ตำแหน่งเดียวกัน หลังจากคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมแล้ว พบตัวอย่างที่เหลือเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป ดังนี้ ITS1 และ ITS2 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 ซึ่งเพียงพอต่อการนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพเพื่อใช้เป็นตำแหน่งในการพัฒนาออกแบบไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพที่ใช้จัดจำแนกพืชวงศ์จิง

5.2 การวิเคราะห์ผ่านคอมพิวเตอร์ (*in silico analysis*)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างพืชวงศ์จิง ทั้ง 6 บริเวณที่คัดเลือก มาวิเคราะห์ผลโดยการทำ alignment (ClustalW; MEGA6 software) โดยพิจารณาจากบริเวณที่มีค่า variable สูงสุด เพราะดีเอ็นเอมาตรฐานที่ดีนั้นจะต้องมีความแปรผันระหว่างสปีชีส์สูงพอจึงจะใช้แยกหรือระบุชนิดที่แตกต่างกันได้ (วุฒิพงษ์, 2554) ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS มีตำแหน่งที่เป็น variable มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *matK*, *trnL*, *rbcL*, *psbA-trnH* และ *rpoC* โดยคิดเป็น 69.07%, 36.88%, 16.49%, 12.95%, 11.69% และ 3.79% ตามลำดับ ซึ่งแต่ละตำแหน่งสามารถนำมาพัฒนาออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้จำแนกพืชวงศ์จิงด้วยเทคนิค HRM ได้ ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูลดังกล่าว

5.3 การวิเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการจำแนกพืชวงศ์จิง

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 7 คู่ ได้แก่ ITS1, ITS2, *trnH-psbA*, *matK*, *rbcL*, *rpoC* และ *trnL* จากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไพรเมอร์ทั้ง 7 คู่ พบว่าไพรเมอร์ ITS1, ITS2, *trnH-psbA*, *rbcL*, *trnL* สามารถเข้าเกาะ DNA template ได้ 100% ทั้งสาย forward และสาย reverse ไพรเมอร์ *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 ในพืชวงศ์จิงเลียดนั้นจึงคาดว่าผลที่ได้จากการทำ HRM ไพรเมอร์ ITS2 จะมีศักยภาพในการจำแนกพืชวงศ์จิงเลียดที่สุด รองลงมาคือ ITS1, *trnH-psbA*, *rpoC*, *matK* และ *rbcL* ส่วนไพรเมอร์ *trnL* คาดว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดในวงศ์จิงได้

5.4 การวิเคราะห์ผล HRM

จากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไพรเมอร์และจากการทำ HRM เพื่อจำแนกพืชสมุนไพรในวงศ์จิงพบว่าค่า T_m มีความสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์ความผันแปรใน sequence หากมีค่าความผันแปรมากจะทำให้ค่า T_m มีความแตกต่างกันมาก ซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการจำแนกพืชมาก ส่วนลักษณะรูปร่างของเส้นกราฟจะขึ้นอยู่กับ Amplicon length และค่า GC content จากการทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 7 คู่ได้แก่ ITS1, ITS2, *trnH-psbA*, *matK*, *rbcL*, *rpoC* และ *trnL* ด้วยวิธีการทำ HRM เพื่อจำแนกพืชสมุนไพร 3 ชนิดได้แก่ *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* และ *Kaempferia parviflora* สามารถจัดแบ่งประสิทธิภาพของไพรเมอร์ออกเป็น 3 ระดับ

ระดับที่ 1 : ไม่ได้ได้แก่ไพรเมอร์ *trnL* กล่าวคือ เมื่อพิจารณาจากค่า T_m และลักษณะรูปร่างของกราฟ (ภาพ 4.1 C1 และ C2) ไม่สามารถจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าความแปรผันภายใน sequence ของบริเวณตำแหน่ง *trnL* มีค่าเท่ากับ 0% จึงทำให้ค่า T_m ใกล้เคียงกันในพืชแต่ละชนิด มีการนำตำแหน่ง *trnL* มาศึกษา และพบว่าสามารถตรวจสอบการกระจายของประชากรและวิวัฒนาการของพืชได้ดี (Taberlet *et al.*, 1991) แต่ในภายหลังมีงานวิจัยที่พบว่าบริเวณตำแหน่ง *trnL* มีขนาดผันแปรตั้งแต่ 990-1090 คู่เบส โดยขนาดที่แตกต่างกันนี้เกิดจากการเพิ่มเข้ามาหรือขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นส่วนใหญ่ และเป็นลักษณะของเบสซ้ำๆ ตั้งแต่ 2-13 คู่เบสทำให้การระบุชนิดมีโอกาสผิดพลาดได้สูง จึงไม่เป็นที่นิยมมากนักเนื่องจากมีประสิทธิภาพ ในการระบุชนิดพืชได้ไม่ดี (Hollingsworth, 2008).

ระดับที่ 2 : พอใช้ ได้แก่ไพรเมอร์ *matK*, *rpoC* และ *rbcL* กล่าวคือ เมื่อพิจารณาจากค่า T_m และลักษณะรูปร่างของกราฟ สามารถจำแนกพืชได้ 2 ชนิดในพืช 3 ชนิด

ไพรเมอร์ *matK* สามารถจำแนกพืช 3 ชนิดออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 ($T_m = 77.90 - 88.00$ °C) : *Zingiber officinale* กลุ่มที่ 2 ($T_m = 78.30 - 78.50$ °C) : *Curcuma longa* และ *Kaempferia parviflora* เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าความแปรผันภายใน sequence ของบริเวณ

ตำแหน่ง *matK* มีค่าความผันแปรภายใน sequence เท่ากับ 1.30% ทำให้ค่า T_m ของพืชแต่ละชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ยังไม่ดีพอที่จะนำมาใช้แยกพืชในวงศ์จิง อีกทั้งยังมีข้อจำกัดคือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีนนี้ให้ผลสำเร็จน้อยมาก (CBOL Plant Working Group, 2009)

ไพรเมอร์ *rpoC* 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* เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าความแปรผันภายใน sequence ของบริเวณตำแหน่ง *rpoC* มีค่าความผันแปรภายใน sequence เท่ากับ 4% ทำให้ค่า T_m ของพืชแต่ละชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ยังไม่ดีพอที่จะนำมาใช้แยกพืชในวงศ์จิงได้

ไพรเมอร์ *rbcL* สามารถจำแนกพืช 3 ชนิดออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 ($T_m = 81.90$ °C) : *Zingiber officinale* และ *Kaempferia parviflora* กลุ่มที่ 2 ($T_m = 81.2$ °C) : *Curcuma longa* เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าความแปรผันภายใน sequence ของบริเวณตำแหน่ง *rbcL* มีค่าความผันแปรภายใน sequence เท่ากับ 0.67% ทำให้ค่า T_m ของพืชแต่ละชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน แม้ว่าประสิทธิภาพในการนำไปใช้แยกและระบุชนิดพืชจะค่อนข้างต่ำ แต่ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพดีมาก (Ford *et al.*, 2009)

ระดับที่ 3 : ดี ได้แก่ไพรเมอร์ ITS1, ITS2 และ *trnH-psbA* กล่าวคือเมื่อพิจารณาจากค่า T_m และลักษณะรูปร่างของกราฟ สามารถจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ทั้งหมด

ไพรเมอร์ ITS1 สามารถจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 ($T_m = 89.60 - 89.70$ °C) : *Zingiber officinale* กลุ่มที่ 2 ($T_m = 88.00$ °C) : *Curcuma longa* กลุ่มที่ 3 ($T_m = 87.80$ °C) : *Kaempferia parviflora*

ไพรเมอร์ ITS2 สามารถจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 ($T_m = 90.60 - 90.70$ °C) : *Zingiber officinale* กลุ่มที่ 2 ($T_m = 88.90 - 90.0$ °C) : *Curcuma longa* กลุ่มที่ 3 ($T_m = 90.90 - 91.00$ °C) : *Kaempferia parviflora*

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าความแปรผันภายใน sequence ของบริเวณตำแหน่ง ITS1 และ ITS2 มีค่าความผันแปรใน sequence เท่ากับ 26.71% และ 44.74% ตามลำดับ จึงให้ค่า T_m ที่มีความแตกต่างกันเพียงพอที่จะจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ มีการนำบริเวณ ITS มาใช้ในการศึกษาทางอนุกรมวิธานและสายสัมพันธ์วิวัฒนาการของพืชอย่างกว้างขวาง ทำให้มีข้อมูลจากพืช

หลากหลายชนิดที่ถูกบันทึกเก็บไว้ในฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์สากล หรือ GenBank จึงทำให้
ง่ายต่อการนำมาพัฒนาสร้างไพรเมอร์ สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Hajibabaei *et al.*, 2007)
นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ยังมีความแปรผันสูงเพียงพอที่จะใช้แยกและระบุชนิดพืชได้ดี
(Kress *et al.*, 2005) โดยพบว่ามีความแปรผันของลำดับ นิวคลีโอไทด์ สูงกว่าคลอโรพลาสต์ดีเอ็น
เอ 3-4 เท่า และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR จากดีเอ็นเอที่สกัดมาจาก
ตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งหรือจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีสามารถทำได้ง่าย (Kress *et al.*, 2005;
Chase *et al.*, 2007)

ไพรเมอร์ *trnH-psbA* สามารถจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยแบ่งออกเป็น 3
กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ($T_m = 74.60 - 74.70^\circ\text{C}$) : *Zingiber officinale* กลุ่มที่ 2 ($T_m = 72.50 -$
 72.60°C) : *Curcuma longa* กลุ่มที่ 3 ($T_m = 73.40 - 73.50^\circ\text{C}$) : *Kaempferia parviflora*
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าความแปรผันภายใน sequence ของบริเวณตำแหน่ง *trnH-psbA* มีค่า
ความผันแปรภายใน 12.59% จึงให้ค่า T_m ที่มีความแตกต่างกันเพียงพอที่จะจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิด
ออกจากกันได้ เช่นเดียวกับ ITS1 และ ITS2 บริเวณตำแหน่ง *trnH-psbA* เป็น intergenic spacer
(non-coding region) ในคลอโรพลาสต์จีโนม มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูง
เพียงพอที่จะนำมาใช้แยกและระบุชนิดของพืชได้ดี (Kress *et al.*, 2005; Kress *et al.*, 2007)

ไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพดีเพียงพอที่จะใช้ในการจัดจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ ได้แก่
ITS1, ITS2 และ *trnH-psbA* เนื่องจากตำแหน่ง *trnH-psbA* มี indel สูงมาก จนทำให้มีความแปร
ผันของความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnH-psbA* ในพืชแต่ละชนิดมาก ซึ่งพบที่มีความ
ยาวตั้งแต่ 200 จนถึงมากกว่า 1,000 คู่เบส (Kress *et al.*, 2005) เมื่อพิจารณาจากค่าความแตกต่าง
ของค่า T_m และความแตกต่างของรูปร่างลักษณะของกราฟ จึงเลือกใช้ตำแหน่ง ITS2 มาทำการศึกษา
ต่อไป

ไพรเมอร์ ITS2 มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกพืชวงศ์ขิงได้ดีที่สุด โดยสามารถจัดจำแนกพืช
สมุนไพรวงศ์ขิง 8 ชนิด ออกจากกันได้อย่างชัดเจนที่ระดับความเชื่อมั่น $\alpha = 0.1$ และเมื่อทดลอง
เปรียบเทียบตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้งให้ผลไม่แตกต่างกัน เป็นเพราะพืชทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่าง
แห้งเป็นพืชชนิดเดียวกัน และดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูง ถึงแม้ว่าพืชตัวอย่างแห้งจะผ่าน
กระบวนการทางเคมี หรือผ่านความร้อนมา จึงไม่มีสารเคมีจากตัวอย่างมารบกวนปฏิกิริยาใน
กระบวนการ PCR และ HRM

จากการทดลองเปรียบเทียบตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้งให้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถพัฒนาเทคนิค HRM มาใช้ระบุและจัดจำแนกพืชวงศ์จิงที่เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรแปรรูปในลักษณะผงแห้งโดยใช้ไพรเมอร์ ITS2 ในการทำ HRM เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์สมุนไพรในท้องตลาด พบว่าสามารถระบุและจัดจำแนกพืชสมุนไพรได้อย่างถูกต้อง มีความแม่นยำสูง แต่จากการทดลองยังพบพืชสมุนไพรที่มีการระบุชื่อในผลิตภัณฑ์ผิดหรือมีการปลอมปนพืชสมุนไพรชนิดอื่น กล่าวคือผลิตภัณฑ์ที่ชื่อมาระบุหน้าซองว่าเป็นชนิด *Curcuma longa* แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี HRM และพิจารณาจากค่า T_m และรูปร่างลักษณะของกราฟ ปรากฏว่าเป็นชนิด *Curcuma zedoaria* ซึ่งจากการทดลองด้วยวิธี HRM ให้ผลที่แม่นยำและน่าเชื่อถือกว่า แสดงว่าในท้องตลาดยังมีการปลอมปนของสมุนไพรบางชนิด ที่อาจเกิดจากความผิดพลาด หรือความไม่รู้ของผู้ขาย

การใช้พืชสมุนไพรส่วนใหญ่มักเป็นภูมิปัญญาชาวบ้าน โดยบางชนิดมีชื่อเรียกที่หลากหลายและในแต่ละท้องถิ่นอาจมีชื่อเรียกต่างกันจึงทำให้เกิดความสับสนได้ง่าย นอกจากนี้ยังพบว่าพืชสมุนไพรที่นิยมใช้หลายชนิดอยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์ที่ถูกแปรรูป ตัวอย่างแห้งที่มีขนาดเล็ก หรือชิ้นส่วนที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้การระบุชนิดด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาทำได้ยาก ระบบ Bar-HRM จึงเป็นเครื่องมือสำคัญที่จะช่วยระบุชนิดพืชให้ได้ผลถูกต้องและรวดเร็วกว่าเทคนิคทางอนุชีววิทยาอื่นๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved