

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพประกอบ	ฐ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ฒ
บทที่ 1 บทนำและวัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพืชวงศ์ขิง	5
2.2 ประวัติการสำรวจพรรณพฤกษชาติในวงศ์ขิงของประเทศไทย	6
2.3 ความก้าวหน้าการศึกษาพืชวงศ์ขิงในประเทศไทย	8
2.4 พืชวงศ์ขิงที่ใช้ในการวิจัย	10
2.5 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcode)	21
2.6 บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่นิยมใช้ในการคัดแยกและระบุชนิดของพืช	30
2.7 การประยุกต์ใช้ DNA barcode กับพืชวงศ์ขิง	34
2.8 ข้อจำกัดในการใช้ DNA barcode	35
2.9 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเทคนิค HRM (High-Resolution Melting analysis)	37
2.10 Barcode DNA-High Resolution Melting (Bar-HRM)	39

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

ส่วนที่ 1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.) อุปกรณ์และเครื่องมือ	40
2.) สารเคมี	41
3.) ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย	42
4.) ดีเอ็นเอไพรเมอร์ <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC</i> และ <i>trnL</i> ที่ใช้ในงานวิจัย	43

ส่วนที่ 2 วิธีการทดลอง

1.) Data mining	44
2.) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยคอมพิวเตอร์ (in silico analysis)	45
3.) การออกแบบไพรเมอร์ ITS1, ITS2 และ <i>trnH-psbA</i> จากฐานข้อมูล	45
4.) การวิเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการจำแนกพืชวงศ์จิง	46
5.) การเก็บ ระบุชนิด และเตรียมตัวอย่างพืช	46
6.) การสกัดดีเอ็นเอ	48
7.) Realtime PCR และ HRM analysis	48

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 Data Mining	51
4.2 การวิเคราะห์ผ่านคอมพิวเตอร์ (in silico analysis)	55
4.3 การออกแบบไพรเมอร์ ITS1, ITS2 และ <i>trnH-psbA</i> จากฐานข้อมูล GenBank	57
4.4 การวิเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการจำแนกพืชวงศ์จิง	58
4.5 การเตรียมดีเอ็นเอพืช	61
4.6 Realtime PCR และ HRM analysis	61

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	78
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	84
เอกสารอ้างอิง	85
ภาคผนวก	95
ประวัติผู้เขียน	102



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1	บริเวณที่ถูกเสนอให้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับการสร้าง ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืช
	29
ตารางที่ 3.1	ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย
	42
ตารางที่ 3.2	ดีเอ็นเอไพรเมอร์ของบริเวณ <i>matK</i> , <i>rpoC</i> , <i>trnL</i> และ <i>rbcL</i>
	43
ตารางที่ 3.3	ข้อมูลของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง
	47
ตารางที่ 3.4	ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR
	49
ตารางที่ 4.1	จำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด และความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ค้นหาได้จากการใช้คำค้น Zingiberaceae + บริเวณที่ต้องการ (ได้แก่ ITS, <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC</i> , <i>trnH-psbA</i> และ <i>trnL</i>)
	52
ตารางที่ 4.2	จำนวนนิวคลีโอไทด์และความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ ถูกคัดเลือกของพืชวงศ์ Zingiberaceae ทั้งหมดจากตำแหน่ง ITS, <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC</i> , <i>trnH-psbA</i> และ <i>trnL</i>
	54
ตารางที่ 4.3	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์ Zingiberaceae จากตำแหน่ง ITS, <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC</i> , <i>trnH-psbA</i> และ <i>trnL</i>
	56
ตารางที่ 4.4	ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากฐานข้อมูลจำนวน 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ <i>trnH-psbA</i> , ITS1 และ ITS2
	57
ตารางที่ 4.5	จำนวนนิวคลีโอไทด์และความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ถูกคัดเลือกเพื่อนำมาวิเคราะห์ของพืชวงศ์ขิง โดยค้นหาเฉพาะ ตัวอย่างพืชใช้ทดลองจำนวน 8 สปีชีส์ จากตำแหน่ง ITS, <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC</i> , <i>trnH-psbA</i> และ <i>trnL</i>
	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ไพรเมอร์ 7 ชนิด ได้แก่ <i>matK</i> , <i>rpoC</i> , <i>trnL</i> , <i>rbcL</i> , ITS1, ITS2 และ <i>trnH-psbA</i>	60
ตารางที่ 4.7 ค่า T_m ของพืชแต่ละชนิดเมื่อทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ <i>matK</i> , <i>rpoC</i> , <i>trnL</i> , <i>rbcL</i> , <i>trnH-psbA</i> , ITS1 และ ITS2	63
ตารางที่ 4.8 ค่า T_m ของพืชสมุนไพรในวงศ์ขิงแต่ละชนิดเมื่อทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2	72
ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบค่า T_m ของพืชสมุนไพรในวงศ์ขิงแบบสดและแบบแห้งเมื่อทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2	74
ตารางที่ 4.10 การเปรียบเทียบค่า T_m ของพืชสมุนไพรที่วางขายในท้องตลาดเทียบกับตัวอย่างอ้างอิงเมื่อทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2	76

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 2.1	การกระจายพันธุ์ของพืชวงศ์ขิง	6
ภาพที่ 2.2	ขิง (<i>Zingiber officinale</i>)	10
ภาพที่ 2.3	ขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i>)	12
ภาพที่ 2.4	ขมิ้นอ้อย (<i>Curcuma zedoaria</i>)	13
ภาพที่ 2.5	กระชายดำ (<i>Kaempferia parviflora</i>)	14
ภาพที่ 2.6	กระชาย (<i>Boesenbergia rotunda</i>)	16
ภาพที่ 2.7	ไพล (<i>Zingiber montanum</i>)	18
ภาพที่ 2.8	ข่า (<i>Alpinia galanga</i>)	19
ภาพที่ 2.9	กระวาน (<i>Amomum uliginosum</i>)	20
ภาพที่ 2.10	ขั้นตอนของการสร้างและการระบุชนิดของพืชตัวอย่างที่สงสัยด้วยเทคนิค DNA barcoding system	25
ภาพที่ 2.11	บริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacer)	30
ภาพที่ 2.12	การเข้าจับของสารเรืองแสง SYBR-Green I Dye	37
ภาพที่ 2.13	การตรวจวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ	38
ภาพที่ 2.14	Normalized Melting Curve	38
ภาพที่ 3.1	ตำแหน่งในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เลือกเป็นไพรเมอร์	45
ภาพที่ 3.2	Condition ในการทำ PCR (A) และเงื่อนไขการทำ HRM (B)	49
ภาพที่ 4.1	ข้อมูลปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่งของพืชวงศ์ Zingiberaceae ที่มีในฐานข้อมูล GenBank	53
ภาพที่ 4.2	ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ <i>matK</i>	64
ภาพที่ 4.3	ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ <i>rpoC</i>	65
ภาพที่ 4.4	ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ <i>trnL</i>	66
ภาพที่ 4.5	ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ <i>rbcL</i>	67
ภาพที่ 4.6	ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1	68

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.7 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2	69
ภาพที่ 4.8 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ <i>trnH-psbA</i>	70
ภาพที่ 4.9 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2 เพื่อแยกความแตกต่างของพืชสมุนไพรวงศ์จันทน์ 8 ชนิด	73
ภาพที่ 4.10 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของพืชสมุนไพรวงศ์จันทน์ 8 ชนิดแบบสดและแบบแห้ง	75
ภาพที่ 4.11 ผลการทำ HRM โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของพืชสมุนไพรวงศ์จันทน์ 8 ชนิด แบบที่วางขายในท้องตลาดเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง	77

อักษรย่อและสัญลักษณ์

μl	Microliter
bp	Base pair
ddH ₂ O	Deionized distilled waster
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleoside 5'-triphosphate
H ₂ O	Water
ml	Milliliter
ng	Nanogram
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction
TAE	Tris-Acetate-EDTA buffer
V	Volt
W	Watt