

การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์ของเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* ในประเทศไทย



นางสาวอรวรรณ ชลวาณิชย์

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1582-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISSR ANALYSIS OF *Croton oblongifolius* IN THAILAND

Miss Orawan Chonvanich



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1582-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์ของเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* ในประเทศไทย
โดย นางสาวอรวรรณ ชลวานิชย์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรภคกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทมหาบัณฑิต

.....รักษาราชการแทนคณบดีคณะ
วิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธราพงษ์ วิทิตสานต์)

รองคณบดีฝ่ายบริหาร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เรืองสำราญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรภคกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิชัย เชิดชูวิทยาศาสตร์)

อรรถวรรณ ชลวานิชย์ : การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์ของเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* ในประเทศไทย. (ISSR ANALYSIS OF *Croton oblongifolius* IN THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สุรัชย์ พรหมคกุล, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. อมร เพชรสม, ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว 116 หน้า. ISBN 974-53-1582-6.

เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (Inter simple sequence repeats, ISSRs) เป็นเทคนิคที่อาศัยพีซีอาร์ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่ง เนื่องจากเทคนิคนี้มีความสามารถในการทำซ้ำ และบอกความแตกต่างได้สูง จึงนำเทคนิคไอเอสเอสอาร์มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*) ในประเทศไทยในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเปล้าใหญ่ 115 ตัวอย่าง เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ 3 ชนิด ประกอบด้วย $A(GA)_7GT$, $CRN_2(CTT)_2$ และ $BSC(GA)_8$ สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอได้ 213 แถบ ไฟโลแกรมจากไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิด แสดงให้เห็นว่าเปล้าใหญ่ 115 ตัวอย่างจำแนกเป็น 83 แบบแผนดีเอ็นเอและจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่มหลัก นอกจากนี้ผลของไอเอสเอสอาร์ แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างภายในสปีชีส์ของเปล้าใหญ่สูง ทำการศึกษาความสัมพันธ์แบบแผนดีเอ็นเอ และองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ โดยเทคนิค ^1H-NMR และ TLC พบว่าเปล้าใหญ่ที่มีแบบแผนดีเอ็นเอต่างกัน องค์ประกอบทางเคมีจะต่างกัน และเปล้าใหญ่ที่มีแบบแผนดีเอ็นเอเหมือนกัน องค์ประกอบทางเคมีจะเหมือนกัน ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างแบบแผนดีเอ็นเอและองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่น่าจะมีความสอดคล้องกัน

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อผู้คิด.....
ปีการศึกษา.....2547.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4572577223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: Inter simple sequence repeats / ISSRs / *Croton oblongifolius* / NMR / TLC

ORAWAN CHONVANICH : ISSR ANALYSIS OF *Croton oblongifolius* IN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SURACHAI PORNPAKAKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D., JITTRA PIAPUKIEW, Ph.D. 116 pp. ISBN 974-53-1582-6.

Inter simple sequence repeats (ISSRs) technique is a PCR based method for amplification of DNA segment between two microsatellite repeats regions. Due to this technique has high reproducibility and polymorphism, ISSRs was employed to study genetic diversity of *Croton oblongifolius* (Plao-Yai) in Thailand. One-hundred and fifteen accessions of Plao-Yai were sampled in this study. Three SSR primers, G(GA)₇GT, CRN₂(CTT)₂ and BSC(GA)₈, generated 213 bands. Phylogram from three primers revealed that 115 accessions of Plao-Yai have identified to 83 DNA patterns and classified as 2 major groups. The results of ISSRs showed high polymorphism within *Croton oblongifolius* species. The relationship of DNA patterns and chemical constituents from bark of Plao-Yai were studied using ¹H-NMR and TLC technique. Plao-Yai with different DNA patterns had different major chemical constituents. Plao-Yai with same DNA patterns had same chemical constituents. Therefore, chemical constituent data were concordant with DNA patterns.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study.....Biotechnology..... Student's signature

Academic year.....2004.....Advisor's signature

Co-advisor's signature

Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่ง ผศ.ดร.สุรัชย์ พรหมคกุล รศ.ดร. อมร เพชรสม และ ดร. จิตรตรา เพ็ญเกียรติว ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่ง รศ.ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้ใช้ห้องปฏิบัติการ และสารเคมีในการทำวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบพระคุณ สำหรับพี่ที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ (IBGE) คุณมะลิวัลย์ และ คุณสุภาพร ที่ให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการทำวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบพระคุณ สำหรับผู้ที่ให้ความกรุณาเก็บตัวอย่างใบ และเปลือกเปลือกไม้ใหญ่ต่างๆ ท่านขอขอบพระคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ ชั้น15 หน่วยวิจัย Research Centre for Bioorganic Chemistry (RCBC)

ขอขอบพระคุณ พี่ๆ และเพื่อนๆ ห้อง 109 ติ๊กพฤษภาคมศาสตร์ ที่ช่วยเป็นกำลังใจในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ไสภณ เรืองสำราญ	ประธานกรรมการ
ผศ.ดร. สุรัชย์ พรหมคกุล	อาจารย์ที่ปรึกษา
รศ.ดร. อมร เพชรสม	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. จิตรตรา เพ็ญเกียรติว	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ.ดร. วิชัย เชิดชูวิศวกรรม	กรรมการ

ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเข้าฟังสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ช่วยในแก้ไข และตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. กาญจนา จันทองจีน สำหรับกำลังใจตลอดการเรียน 3 ปี และการทำงานวิจัยตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ ที่ช่วยเป็นกำลังใจทั้งการเรียน การทำงานวิจัย การสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และการทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 วัตถุประสงค์ในการวิจัย.....	2
บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	3
2.1 ความหลากหลายทางชีวภาพ.....	3
2.2 ลักษณะของต้นเปล้าใหญ่.....	3
2.3 ปฏิกริยาถูกใช้ไฟลีมอเรส.....	6
2.4 ดีเอ็นเอเครื่องหมาย.....	7
2.5 รายงานการศึกษาเกี่ยวกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์.....	10
2.6 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในต้นเปล้าใหญ่.....	13
2.7 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มไดเทอร์ปีนอยด์ที่พบในเปลือก ต้นเปล้าใหญ่.....	14
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	24
3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทดลอง.....	24
3.2 วิธีการทดลอง.....	26
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง.....	38
4.1 ศึกษาความหลากหลายของเปล้าใหญ่โดยเทคนิคอาร์เอฟดี.....	38
4.2 ศึกษาความหลากหลายของเปล้าใหญ่โดยเทคนิคไอเอสเอสอาร์.....	39
4.3 การวิเคราะห์ทางเคมี.....	72

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	84
รายการอ้างอิง.....	85
ภาคผนวก.....	93
ภาคผนวก ก.....	94
ภาคผนวก ข.....	97
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	116



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	แสดงองค์ประกอบทางเคมีที่พบในเปลือกใหญ่.....18
3.1	ตัวอย่างเปลือกใหญ่ที่ศึกษา และแหล่งที่มา.....27
3.2	ลำดับเบสของอาร์เอพีดีไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....32
3.3	ตารางแสดงส่วนประกอบของพีซีอาร์ของเทคนิคอาร์เอพีดี.....33
3.4	ลำดับเบสของเอสเอสอาร์ ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....34
3.5	ตารางแสดงส่วนประกอบของพีซีอาร์ของเทคนิคไอเอสเอสอาร์.....35
4.1	ตารางการแบ่งกลุ่ม 115 ตัวอย่างของไพรเมอร์ 5.....64
4.2	ตารางการแบ่งกลุ่ม 115 ตัวอย่างของไพรเมอร์ 7.....66
4.3	ตารางการแบ่งกลุ่ม 115 ตัวอย่างของไพรเมอร์ 8.....78
4.4	แสดงกลุ่มของตัวอย่าง โดยรวม ไพรเมอร์ 5, ไพรเมอร์ 7 และไพรเมอร์ 8.....72
4.5	แสดงกลุ่มและตัวอย่างที่ได้จากการสร้างแผนภาพ.....73
4.6	แสดงรหัส แหล่งที่มา และกลุ่มของตัวอย่างของ 19 ตัวอย่าง.....75
4.7	แสดงลักษณะของสารสกัดเฮกเซนจากเปลือกเปลือกใหญ่.....77

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ลักษณะต้น ใบ และช่อดอกของเปล้าใหญ่ <i>Croton. Oblongifolius</i>4
2.2	แสดงแผนภาพการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งไอเอสเอสอาร์.....10
4.1	แสดงแถบดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ โดยไพรเมอร์ G-17และ OPC-1138
4.2	แสดงผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ 2, ไพรเมอร์ 4, ไพรเมอร์ 5 และ ไพรเมอร์ 7.....39
4.3	แสดงแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ตัวอย่างที่ 1-115.....40
4.4	แสดงแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 7 ตัวอย่างที่ 1-115.....48
4.5	แสดงแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 8 ตัวอย่างที่ 1-115.....55
4.6	แสดงแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ 1-11 (A) และ 12-22 (B) ที่เป็นตัวแทนใน การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำโดยไพรเมอร์ 5.....62
4.7	แสดงแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ 1-11 (A) และ 12-22 (B) ที่เป็นตัวแทนใน การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำโดยไพรเมอร์ 7.....63
4.8	แสดงแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ 1-11 (A) และ 12-22 (B) ที่เป็นตัวแทนใน การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำโดยไพรเมอร์ 8.....63
4.9	แสดง Phylogram ของเปล้าใหญ่ 115 ตัวอย่าง โดยใช้ neighbour-join, Phylip 3.63.....72
4.10	แสดงแถบดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ 19 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 5, ไพรเมอร์ 7 และ ไพรเมอร์ 8.....75
4.11	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของกลุ่มเปล้าใหญ่ที่สร้าง Cembrane diterpenoids เป็นองค์ประกอบหลัก.....79
4.12	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของกลุ่มเปล้าใหญ่ที่สร้าง Labdane diterpenoids เป็นองค์ประกอบหลัก.....80
4.13	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของกลุ่มเปล้าใหญ่ที่สร้าง Clerodane diterpenoids เป็นองค์ประกอบ.....81
4.14	แสดงผลการตรวจสอบตำแหน่งสารที่ได้จากสารสกัดเฮกเซน ภายใต้รังสียูวี ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร.....82
4.15	แสดงผลการตรวจสอบตำแหน่งสารที่ได้จากสารสกัดเฮกเซน โดยย้อมไอโอดีน.....82

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
1.46	แสดงผลการตรวจสอบตำแหน่งสารที่ได้จากสารสกัดเฮกเซน โดยย้อม vanillin / H ₂ SO ₄ reagent83
ข.1	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง KY3.....97
ข.2	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง KY7.....98
ข.3	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง P1.5.....99
ข.4	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง PK.....100
ข.5	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง PU101
ข.6	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง KA2.....102
ข.7	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง SB1.....103
ข.8	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง TA1.....104
ข.9	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง CHE1.....105
ข.10	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง UD1.....106
ข.11	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง QA.....107
ข.12	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง QB.....108
ข.13	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง QC.....109
ข.14	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง QD.....110
ข.15	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง QE.....111
ข.16	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง QF112
ข.17	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง QG.....113
ข.18	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง QH.....114
ข.19	แสดงสเปกตรัม ¹ H-NMR ของตัวอย่าง QI115

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

mM	มิลลิโมลาร์
μ M	ไมโครโมลาร์
ng	นาโนกรัม
NMR	นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี
$^1\text{H-NMR}$	proton nuclear magnetic resonance
TLC	โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง
Hex	เฮกเซน
EtOAc	เอทิลอะซิเตท
ppm	part/million



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่บริเวณเขตร้อนชื้น และในแต่ละภาคก็มีลักษณะภูมิอากาศที่ต่างกั น ทำให้พืชบางชนิดที่อยู่ในจังหวัด หรือแหล่งต่างกั นมีรูปร่างภายนอกต่างกั น ซึ่งแต่เดิมการ จำแนกพืชจะทำโดยดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) เป็นหลัก แต่เนื่องจากอาจได้รับ ปัจจัยภายนอก เช่น อิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม อายุพืช และอื่น ๆ ดังนั้นลักษณะภายนอกจึงไม่เพียงพอที่จะใช้จำแนกพืชเหล่านี้ได้อย่างถูกต้อง จึงนำเทคนิคระดับโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบซึ่ง เป็นวิธีที่สามารถให้ข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่า คือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดส่วนหนึ่ง ของพืชก็ได้โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม ทั้งยังสามารถ ตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีน และส่วนที่ไม่ใช่ยีน และนอกจากนี้ยังสามารถจัดกลุ่มพืชด้วยกลุ่มของ องค์ประกอบทางเคมีที่พบในพืช (chemotaxonomy) พืชที่เลือกในการศึกษาคั้งนี้คือ เปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius* Roxb.) เป็นหนึ่งในสมุนไพรที่น่าสนใจ เนื่องจากแทบทุกส่วนของต้นเปล้า ใหญ่สามารถพบสารประกอบประเภทไดเทอร์ปีนอยด์ (diterpenoids) ซึ่งต้นไม้นี้ชนิดนี้สามารถพบ ได้ทั่วไปตามแหล่งต่างๆของประเทศไทย จึงเป็นตัวอย่างที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษา

เทคนิคระดับโมเลกุลในปัจจุบันมีหลากหลายวิธีที่นำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลาย ของพืช เช่น อาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA, RAPDs), อาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphisms, RFLPs), เอเอฟแอลพี (amplifies fragment length polymorphisms, AFLPs), ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite หรือ simple sequence repeat, SSRs หรือ short tandem repeats, STRs) และ ไอเอสเอสอาร์ (inter simple sequence repeats, ISSRs) เป็นต้น ซึ่งแต่ละเทคนิคก็มีข้อดีและข้อด้อยต่างกั นออกไป ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้ได้ทำการศึกษาโดยเทคนิค ไอเอสเอสอาร์ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้เป็นแบบสุ่มคล้ายกับ เทคนิคอาร์เอพีดีแต่มีความจำเพาะมากกว่า มีความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) เกิด ความแตกต่าง (polymorphism) สูง ใช้เวลาน้อย วิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน

เปล้าใหญ่ จัดอยู่ในสกุล *Croton* วงศ์ Euphorciaceae ซึ่งประเทศไทยมีชื่อเรียกพืชที่ นำหน้าว่า เปล้า พบได้ประมาณ 7 ชนิด ประกอบด้วย เปล้า (*Croton argyratus* Bl หรือ *Croton budopensis* Gagnep), เปล้าน้ำเงิน (*Croton cumimigiis* Arg., *Croton cascarilloides* Raeusch หรือ *Croton pierrei* Gagnep), เปล้าคำ (*Croton columnaris* Airy), เปล้าแพะ (*Croton hutchinsonianus* Hoss), เปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz., *Croton longissimus*

Airy หรือ *Croton joufra* Roxb.), เปล้าเลือด (*Croton robustus* Horz.) และเปล้าใหญ่ หรือเปล้าหลวง (*Croton oblongifolius* Roxb.)

ได้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ โดยกลุ่มวิจัยของ ศ.ดร. ไสภณ เริงสำราญ จากหลายแหล่งในประเทศไทย พบสารประกอบ cembranoid 2 ชนิดคือ crotocebraneic acid และ neocrotocebraneic acid จากอำเภอวิเชียรบุรี จังหวัดเพชรบูรณ์ พบสารประกอบ labda-7,12(E),14-triene-17-al , labda-7,12(E),14-triene-17-ol และ labda-7,12(E),14-triene-17-oic acid จากอำเภอปรานบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบสารประกอบ labdane 2 ชนิด คือ Labda-7,13(Z)-diene-17,12-olide และ labda-7,13-(Z)-diene-17,12-olide-5-ol และพบสารประกอบ clerodane 2 ชนิดคือ (—)-20-benzyloxyhardwickiic acid และ hardwickiic acid จากอำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี พบสารประกอบ 4 ชนิดคือ (—)-pimara-9(11),15-diene-19-oic acid, (—)-pimara-9(11),15-diene-19-ol, (2E,7E,11E)-1-isopropyl-1,4-dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-2,7,11-triene-12-carboxylic acid และ methyl-15,16-epoxy-12-oxo-3,13(16),14-clerodatriene-20,19-olide-17-oate จากอำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี พบสารประกอบ labdane 3 ชนิด คือ 3-acetoxy-labda-8(17),12(E)-triene-2-ol , 2-acetoxy-labda-8(17),12(E)-triene-3-ol และ labda-8(17)-12(E)-triene-2,3-diol จากอำเภอยางชุมน้อย จังหวัดเลย เป็นต้น จากความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมีในเปล้าใหญ่อ้างกล่าว อีกทั้งการศึกษาด้านพันธุวิศวกรรมของเปล้าใหญ่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้เกิดงานวิจัยขึ้นนี้ขึ้น โดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุลเป็นตัวบอกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างเปล้าใหญ่ และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบบแผนดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี และเทคนิคไอเอสเอสอาร์ กับองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่

1.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของเปล้าใหญ่จากแหล่งต่างๆในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD)
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายของเปล้าใหญ่จากแหล่งต่างๆในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค inter simple sequence repeats (ISSRs)
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบบแผนดีเอ็นเอ กับองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity)

ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) แบ่งออกเป็น 3 ระดับ

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) เป็นพื้นฐานของความหลากหลายทางชีวภาพ ความหลากหลายขององค์ประกอบทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของหน่วยพันธุกรรม หรือยีน (mutation) ซึ่งเป็นสาเหตุเบื้องต้นของความหลากหลายทางพันธุกรรม และเมื่อรวมกับปัจจัยต่างๆ ก็ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต และระบบนิเวศได้ ระดับความแตกต่างนี้ใช้กำหนดความใกล้ชิด หรือความห่างของสิ่งมีชีวิตในสายวิวัฒนาการ เทคนิควัดความหลากหลายทางพันธุกรรมมีหลายวิธี แต่ทุกวิธีอาศัยความแตกต่างขององค์ประกอบทางพันธุกรรมเป็นดัชนีในการวัด หากสิ่งมีชีวิตชนิดใดมีองค์ประกอบทางพันธุกรรมเป็นแบบเดียวกันทั้งหมด ย่อมแสดงว่าสิ่งมีชีวิตนั้นไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายของชนิด หรือชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต (species diversity) เกิดจากกระบวนการวิวัฒนาการที่ค่อยๆ สะสมองค์ประกอบทางพันธุกรรมทีละน้อยๆ ในเวลาหลายชั่วรุ่น จนกระทั่งสิ่งมีชีวิตมีความสามารถในการปรับตัวได้ดีต่อสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงที่ทำให้เกิดสิ่งมีชีวิตใหม่ จึงเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต

ความหลากหลายของระบบนิเวศ (ecological diversity) ระบบนิเวศแต่ละระบบเป็นแหล่งของถิ่นที่อยู่อาศัย (habitat) ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ซึ่งมีปัจจัยทางกายภาพ และชีวภาพที่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดในระบบนิเวศนั้น ความหลากหลายของระบบนิเวศขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนประชากรของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศนั้นๆ

2.2 ลักษณะของต้นเปล้าใหญ่

เปล้าใหญ่ เป็นพืชในสกุล *Croton* จัดอยู่ในวงศ์ Euphorciaceae สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย เช่น ป่าดงดิบ ป่าผลัดใบหรือป่าละเมาะ เหนือระดับน้ำทะเลไม่เกิน 700 เมตร

ชื่อสามัญ เปล้าใหญ่ เปล้าหลวง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Croton oblongifolius* Roxb.

ชื่อพ้อง ควะรุ (กระเหรียง-กาญจนบุรี)

เซ่งเค้คัง สะกาวา ส่ากัวะ (กระเหรียง-แม่ฮ่องสอน)

เปาะ (กำแพงเพชร)

ห้าแย่ง (เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน)



รูปที่ 2.1 ลักษณะต้น ใบ และช่อดอกของเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius*.

2.2 .1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเปล้าใหญ่

เป็นไม้ผลัดใบขนาดเล็ก สูงประมาณ 8-20 เมตร กิ่งก้านค่อนข้างใหญ่ ยอดอ่อน ใบอ่อน และช่อดอกมีเกล็ดสีเทาเป็นแผ่นเล็กๆ ปกคลุมทั่วไป

ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับกันรูปขอบขนาน รูปไข่ หรือรูปหอก โคนใบและปลายใบแหลม หรือมน ขอบใบหยักกว้าง 5-10 เซนติเมตร ยาว 9-30 เซนติเมตร มีเส้นแขนงใบ 12-16 คู่ ใบแก่ค่อนข้างเกลี้ยง ก้านใบยาว 1.3-6 เซนติเมตร ที่ฐานดอกมีต่อม 2 ต่อม

ดอกจะออกเป็นช่อหลายช่อที่ปลายกิ่งยาว 12-22 เซนติเมตร จะทยอยบานจากโคนไปหาปลายช่อ ดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน หรือต่างต้นกันก็ได้ ดอกเพศผู้จะมีกลีบรองกลีบดอกเป็นรูปขอบขนานกว้างๆ มีเกล็ด กลีบดอกยาวเท่ากับกลีบรองดอก มีขนหนาแน่น ที่ฐานรองดอกมีต่อมกลมเล็กๆ 5 ต่อม มีเกสรตัวผู้ 12 อัน เกลี้ยง ดอกเพศเมีย กลีบรองกลีบดอกเล็ก รูปยาวแคบ ขอบมีขน รังไข่มีรูปขอบขนาน มีเกล็ด ท่อรังไข่มี 2 แฉก

ผลกลมมี 3 พู เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ด้านบนแบน และมีเกล็ด (เต็ม สมิตินันท์, 2523 และ ลีนา ผู้พัฒนพงศ์, 2530)

2.2.2 สรรพคุณของเปล้าใหญ่

ราก	แก้ น้ำเหลืองเสีย แก้โรคผิวหนัง รักษาคุณตะราด แก้มะเร็ง แก้โรคเรื้อน แก้คัน ขับระดู ขับลม แก้ลมในท้องเป็นก้อนเถาตาน บำรุงกำลัง แก้กระหายน้ำ แก้เสมหะและลม
เปลือก	ช่วยย่อยอาหาร ทำให้เลือดเย็น ลดไข้ ทำให้อาหารงวด แก้เสมหะให้ตก ขับเสมหะ ขับลม แก้โลหิตในท้องให้ตก แก้โรคผิวหนัง และแก้ดีพิการ
กระพี้	ช่วยย่อยอาหาร ทำให้เลือดเย็น ลดไข้ และแก้เสมหะให้ตก
แก่น	ขับเลือด หนองให้ตก ขับพยาธิไส้เดือน ขับลม แก้ลม และกระจายลม
ใบ	แก้ธาตุไม่ปกติ บำรุงธาตุ แก้คันตามตัว รักษา มะเร็งเพลิง แก้ลมจุกเสียด บำรุงกำลัง และแก้กระหาย
ดอก	แก้พยาธิ และทำลายเชื้อโรค
ผล	แก้ไข้สตรีในเรือนไฟ ขับโลหิตระดู และขับหนองให้กระจาย
เมล็ด	เป็นยาถ่าย
ลูก	ดองสุราดื่ม ขับโลหิตในเรือนไฟ
เนื้อไม้	แก้ริดสีดวงลำไส้ และริดสีดวงทวารหนัก
ต้น	น้ำต้มเปลือก กินเป็นยาลดไข้ แก้ตับอักเสบ ปวดข้อ และปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ

แต่เดิมการศึกษา และการจำแนกพืชจะทำโดยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา(morphology) เป็นหลัก แต่เนื่องจากความแตกต่างที่เกิดขึ้น อาจได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม อายุพืช ซึ่งยากที่จะจำแนก (Jou-ann, Wei-chen และ Ju-ying, 2001) จึงนำเทคนิคระดับโมเลกุลซึ่งเป็นวิธีที่สามารถให้ข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่า และยังมีผลกระทบจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมน้อย

ในปัจจุบันนิยมใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) จัดอยู่ในกลุ่มของ genetic marker หรือ molecular marker ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ morphological markers (chlorophyll deficiency) , biochemical markers (isozyme, terpenes) และ DNA markers (RFLPs, RAPDs, SSRs, ISSRs) ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องชี้บอก จัดจำแนก ตรวจสอบสายพันธุ์ และเปรียบเทียบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตสามารถศึกษาทั้งในระดับโปรตีน และดีเอ็นเอ แต่การศึกษาในระดับดีเอ็นเอจะมีข้อได้เปรียบกว่าคือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชก็ได้โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม ทั้งยังสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีน และส่วนที่ไม่ใช่ยีน เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบพื้นฐานที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด สามารถจำลองโมเลกุลถ่ายทอดสู่เซลล์ลูก และคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่

บางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวแล้วอาจมีการเปลี่ยนแปลงของซันดีเอ็นเอได้ หรือการหายไปของซันดีเอ็นเอ (deletion) การมีซันส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้น (insertion) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของซันส่วนดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซม หรือต่างโครโมโซม (transposition) ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอยังคงเป็นตัวแทนที่เหมาะสมในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์ต่างๆ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่าง ปัจจุบันเทคนิคในการศึกษาในด้านชีวโมเลกุล บางเทคนิคอยู่บนหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)

Polymerase chain reaction หรือ PCR หรือ พีซีอาร์ เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ในระยะเวลาสั้น ปัจจุบันนี้เทคนิคพีซีอาร์ได้รับการปรับปรุง และพัฒนาในหลายๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคนิคที่สำคัญมากต่องานด้านชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุล และพันธุวิศวกรรม เช่น การโคลนนิ่ง (cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) เป็นต้น

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมากขึ้นเป็นหลายเท่าโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบเพียงเล็กน้อย ซึ่งจะเพิ่มเป็นทวีคูณจนมีปริมาณนับล้านชุด ซึ่งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้ทันทีโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วดูผลภายใต้แสงยูวี

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ

1. Denature: การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพจากเกลียวคู่แยกตัวเป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อนโดยใช้อุณหภูมิ 92-95 องศาเซลเซียส
2. Annealing: การลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งมีเบสคู่สมกับบริเวณของซันดีเอ็นเอที่ต้องการ จะเข้าจับคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอุณหภูมิส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 25-65 องศาเซลเซียส ขึ้นกับขนาด และองค์ประกอบของเบสในไพรเมอร์ที่ใช้ อุณหภูมิที่ใช้เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกเป็นสายเดี่ยว 50 เปอร์เซ็นต์ เรียกว่า Melting point หรือ T_m คำนวณได้จากสูตร $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ โดยที่ G, C, A และ T คือ จำนวนเบสแต่ละชนิดที่มีในสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ ค่าที่ได้จะมีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมแต่ละไพรเมอร์จะอยู่ที่ $T_m \pm 4$ องศาเซลเซียส

3. Extension: การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยเอ็นไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส จะทำงานโดยเติมนิวคลีโอไทด์เข้าไปปลาย 3' ของไพรเมอร์ สายดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใหม่จะยาวไปเรื่อยๆ จากบริเวณที่ปลายทั้งสองของไพรเมอร์ที่จับคู่อยู่บนสายดีเอ็นเอแม่แบบทั้งสองสาย ทำให้บริเวณที่ต้องการจะถูกจำลองได้โดยสมบูรณ์ โดยอุณหภูมิที่ 70-75 องศาเซลเซียส

เมื่อสิ้นสุดการทำปฏิกิริยาจากขั้นที่ 1-3 รวมกันเป็นหนึ่งรอบ (one cycle) จะได้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอ 2 สายที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่หมุนเวียนไปอีกหลายรอบ จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวนมาก (วิจิตรา สมรรคณัฐ, 2543) ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่นิยมใช้ เช่น

2.4 ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA markers)

1. อาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA, RAPDs) เทคนิคนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่นได้อีกเช่น arbitrary primers PCR (AR-PCR) DNA amplification fingerprinting (DAF) หรือ Multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP) จะแตกต่างกันที่ขนาดไพรเมอร์ที่ใช้ และวิธีการวิเคราะห์ผล อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่เพิ่มขยายจีโนมิก ดีเอ็นเอ (genomic DNA) โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primer) ซึ่งจะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน โดยไม่จำเป็นต้องทราบตำแหน่งที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายว่าเป็นส่วนใด โอกาสที่จะพบลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์คือ 1 ใน 4^{10} ส่วนใหญ่ไพรเมอร์ที่ใช้จะมีความยาวประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ แต่มี % CG มากกว่าหรือเท่ากับ 50 (Williams และคณะ, 1990) ความแตกต่าง (polymorphism) ที่เกิดขึ้นจะเกิดขึ้นในลักษณะการมีแถบ และไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอของพืชพลั๊งจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรีย ซึ่งในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์อาร์เอพีดี พบว่าแถบดีเอ็นเอบางส่วนประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของไมโทคอนเดรีย และน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ มาจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ดังนั้นส่วนใหญ่จึงมาจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสซึ่งมีการถ่ายทอดมาจากทั้งพ่อ และแม่ (วิจิตรา สมรรคณัฐ, 2543) อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ราคาถูก ข้อเสียคือ เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่แสดงเฉพาะลักษณะเด่น (dominance marker) (อัญชลี ทัศนชาจร, วิเชียร ริมพนิชขยกิจ และ ศิราวุธ กลิ่นบุหงา) มีความสามารถในการทำซ้ำได้ต่ำ (low reproducibility) ทำให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์หนึ่งๆ ไม่มีความสม่ำเสมอ (non-inconsistency)

2. อาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphisms, RFLPs) เป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะ (restriction enzyme) ตัดดีเอ็นเอ และอาศัยความแตกต่าง หรือความ

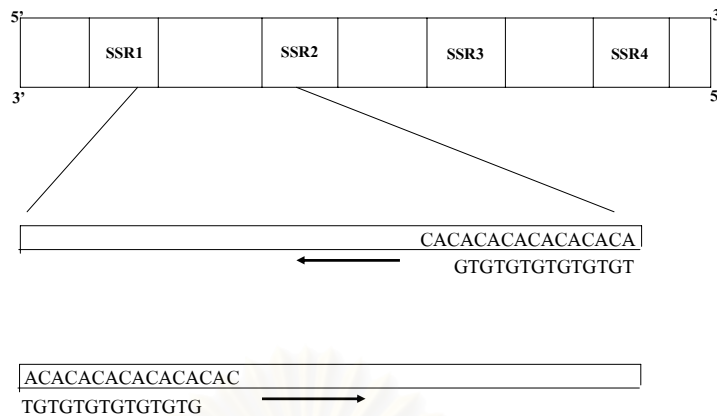
หลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำเพาะที่ตัดได้ตามชนิดของเอนไซม์ ใช้ในการสร้าง genetic linkage map สามารถใช้ติดตามการถ่ายทอดยีนที่สนใจไปยังรุ่นลูกหลาน และยังสามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืช สัตว์ และมนุษย์ เพื่อตรวจสอบความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม ข้อเสียคือต้องมีprobe และในบางครั้งติดฉลากของ probe ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี นอกจากนี้ยังต้องใช้เวลานาน และเสียค่าใช้จ่ายสูง

3. เอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphisms, AFLPs) ความแตกต่าง (polymorphism) ที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอเหมือนในอาร์เอฟแอลพี แต่จะเกิดจากการมี และไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้น ใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร เอกลักษณะของสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ และใช้ทำแผนที่ของจีโนมได้เป็นอย่างดี เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่แสดงเฉพาะลักษณะเด่น ข้อดีคือ ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายเหมือนกับอาร์พีดี รวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย เป็นเทคนิคที่มีความสามารถในการทำซ้ำได้ดีปานกลาง (Medium reproducibility) แต่มีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ไม่เหมาะสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่าง หรือเหมือนกันมากๆ (อัญชลี ทศนาขจร และคณะ)

4. ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite หรือ simple sequence repeat, SSRs หรือ short tandem repeats, STRs) เป็นดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำช่วงสั้นๆ ในหนึ่งหน่วยซ้ำ ประกอบด้วยลำดับเบส 1-6 คู่เบส พบได้ 10^3 - 10^5 ตำแหน่ง กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของยูคาริโอต ความผันแปรของไมโครแซทเทลไลท์เกิดจากการเพิ่มขึ้น หรือลดลงจำนวนซ้ำ เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีข้อดีคือ มีความผันแปรของจำนวนซ้ำสูง มีความหลากหลายของจำนวนอัลลีล (allele) ที่สำคัญคืออยู่กระจายหลายตำแหน่งในจีโนม จึงสามารถใช้เลือกตรวจความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ที่หลายตำแหน่ง ทำให้การตรวจมีความละเอียดมาก (อัญชลี ทศนาขจร และคณะ) เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่แสดงแบบซ่มร่วมกัน (codominance) มีความจำเพาะเจาะจง และสามารถบอกความแตกต่างได้ดี (specific and highly polymorphus) (Karp และคณะ, 1997) แต่เป็นเทคนิคที่ต้องทราบถึงลำดับเบสของตัวอย่างก่อน เพื่อที่จะออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

5. ไอเอสเอสอาร์ (inter simple sequence repeats, ISSRs หรือ microsatellite primer PCR, MP-PCR หรือ SSR-anchored PCR, inter-SSR amplification หรือ single primer amplification reaction, SPAR หรือ random amplified microsatellite polymorphisms, RAMPs หรือ randomly amplified microsatellite, RAMs หรือ anchored microsatellite primer PCR, AMP-PCR หรือ Anchored simple sequence repeats, ASSR) เป็นตำแหน่งที่อยู่ระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่ง (Beckman และ Soller, 1990; Lagercrantz, Ellegren

และ Anderson, 1993; Tautz และ Renz, 1984) เป็นเทคนิคปรับปรุงมาจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ (Bao และ Jonathan, 2001) เป็นเทคนิคที่รวมเอาข้อดีของ ไมโครแซทเทลไลท์ เอเอฟแอลพี และอาร์เอพีดี และปัจจุบันนิยมกันอย่างกว้างขวาง โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่บริเวณระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่ง (รูปที่ 2.1) ใช้ลำดับไมโครแซทเทลไลท์เป็นไพรเมอร์ (SSR primer) โดยส่วนใหญ่จะมีความยาวประมาณ 16-25 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะเป็นแบบ unanchored (Gupta และคณะ, 1994; Myer และคณะ, 1993) จะเป็นไดนิวคลีโอไทด์ (dinucleotide) เช่น $(GA)_8$, $(CT)_4$, $(AG)_6$ ไตรนิวคลีโอไทด์ (tri-nucleotide) เช่น $(ATA)_2$, $(CGT)_4$, $(CTT)_7$ เตตระนิวคลีโอไทด์ (tetra-nucleotide) เช่น $(CTCA)_2$, $(ATTA)_2$, $(CGTG)_7$ หรือ เพนตะนิวคลีโอไทด์ (penta-nucleotide) เช่น $(CTCAT)_2$, $(ATGTA)_2$, $(CGTTG)_7$ ก็ได้ (Pradeep, Sarla และ Siddig, 2002) หรือจะเป็น ไพรเมอร์ที่ถูกเติมด้วย 1-4 เบส ได้แก่ 3'-anchored เช่น $(CTT)_7GC$, $(AG)_6AT$ หรือเป็น 5'-anchored เช่น $CA(CGTG)_7$, $GC(ATA)_2$ ถ้าเติมที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ จะทำให้เกิดจำนวนแถบดีเอ็นเอมากขึ้น และเกิดความแตกต่างมากขึ้นด้วย (highly polymorphic) ถ้าเติมที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ จะทำให้แถบดีเอ็นเอที่เกิดมีความชัดเจนขึ้นเมื่อเทียบกับ 5'-anchored ไพรเมอร์ (Pradeep และคณะ, 2002) ไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่แสดงเฉพาะลักษณะเด่น เป็นเทคนิคที่มีความคล้ายคลึงกับเทคนิคอาร์เอพีดี แต่ใช้ไพรเมอร์ที่ใช้มีความยาวมากกว่า จึงทำให้อุณหภูมิ annealing ที่ใช้สูงกว่าเพราะอุณหภูมิขึ้นกับ GC content ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 45-65 องศาเซลเซียส (Pradeep และคณะ, 2002) จึงมีความหลากหลายมากกว่า และมีความสามารถในการทำซ้ำ ดีกว่า (Fang และ Roose, 1997; GE and Sun, 1999; Ratnaparke, Tekeoglu และ Muehlbauer, 1998) ข้อดีของเทคนิคนี้คือไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราต้องการศึกษาก่อน ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสีเพื่อติดฉลาก (Probe) มีความสามารถในการทำซ้ำสูง เกิดความแตกต่างสูง (Bao และ Jonathan, 2001) ใช้เวลาในการตรวจสอบผลสั้น สามารถตรวจสอบได้ทั้งอะกาโรสเจล และโพลีครีลาไมด์เจล ราคาถูก ซึ่งความสามารถของไอเอสเอสอาร์จะขึ้นอยู่กับความหลากหลาย และความถี่ของไมโครแซทเทลไลท์ โดยจะแตกต่างกันไปตามแต่ละสปีชีส์ (Morgante และ Olivieri, 1993)



รูปที่ 2.2 แสดงแผนภาพการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งไอเอสเอสอาร์

2.5 รายงานการศึกษาเกี่ยวกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์

Yang และคณะ (1996) และ Nagaoka และ Olihara (1997) ได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคอาร์เอพีดี และ ไอเอสเอสอาร์ พบว่า ไอเอสเอสอาร์ บอกความแตกต่าง และมีความสามารถในการทำซ้ำดีกว่า อาร์เอพีดี

Hiromi และคณะ (1996) ได้ศึกษา closely linked ของ nuclear restore gene (*Rf-1*) ของข้าว โดยศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง near-isogenic lines ที่มี *Rf-1* gene คือ MTC-10R และไม่มี *Rf-1* gene คือ MTC-10A โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ ซึ่งในการทดลองได้ใช้ไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ทั้งหมด 76 ตัว พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ตัวเดียวที่คือ $(GA)_8YC$ ที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง MTC-10R และ MTC-10A ได้ แถบดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่าง 2 แถบ จากนั้นนำไปโคลนเข้าพาหะ(vector) แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อสร้างไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบความแตกต่างระหว่างยีน 2 ตัวนี้

Ge and Sun (1999) ได้ศึกษา genetic diversity ของ cryptovovoparous mangrove *Aegiceras corniculatum* โดยใช้เทคนิค allozyme และ ISSR พบว่า เทคนิค ISSR เป็นเทคนิคที่มี polymorphism สูง และเป็น fingerprinting method ที่ดีสำหรับศึกษา สายพันธุ์ของพืช

Lai และคณะ (2001) ได้ศึกษา genetic relationships ของชา (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze) ระหว่างสายพันธุ์โคลน กับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยใช้เทคนิค อาร์เอพีดี และ ไอเอสเอสอาร์ ทั้งหมด 37 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย สายพันธุ์โคลนของจีน 21 ตัวอย่าง สายพันธุ์โคลนของฮัสซัม 3 ตัวอย่าง สายพันธุ์ลูกผสมระหว่างจีน และแคว้นฮัสซัม และ สายพันธุ์พื้นเมืองจากไต้หวัน 6 ตัวอย่าง พบว่าเกิดแถบที่บอกความแตกต่าง (polymorphic band) ของ อาร์เอพีดี และ ไอเอสเอสอาร์ คือ 53 และ 56 แถบ ตามลำดับ พบว่าจาก แผนภาพของอาร์เอพีดี สามารถ

แบ่งกลุ่มชาติที่ศึกษาออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ สายพันธุ์โคลนของจีน กับ สายพันธุ์ลูกผสมระหว่างจีน และอัสสัม, สายพันธุ์โคลนของอัสสัม และ สายพันธุ์พื้นเมืองจากไต้หวัน ส่วนผลจากแผนภาพของไอเอสเอสอาร์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ สายพันธุ์โคลนของจีน กับ สายพันธุ์ลูกผสมระหว่างจีน และอัสสัม และ สายพันธุ์โคลนของอัสสัม กับ สายพันธุ์ดั้งเดิมจากไต้หวัน และ เมื่อนำผล ของ อาร์เอฟดีดี และ ไอเอสเอสอาร์ มาสร้างแผนภาพรวมกัน ผลที่ได้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ เหมือนกับผลที่ได้จาก ไอเอสเอสอาร์ สามารถกล่าวได้ว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์ สามารถจำแนกได้ดีกว่า และสามารถบอกความแตกต่างได้ดีสูงกว่าอาร์เอฟดีดี และได้กล่าวว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์ เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษา genetic relationship และ genetic diversity ของสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน

Raina และคณะ (2001) ได้ศึกษาความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม, ความสัมพันธ์ระหว่างภายในสปีชีส์, ความหลากหลายของสายพันธุ์ถั่วลิสง และ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) และ สายพันธุ์พื้นเมือง โดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดีดี และไอเอสเอสอาร์ พบว่าเกิดเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง (%polymorphism) เป็น 42.7 และ 54.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และผลจากแผนภาพของอาร์เอฟดีดี , ไอเอสเอสอาร์ และ อาร์เอฟดีดี รวมกับ ไอเอสเอสอาร์ พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 13 ตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มทาง taxonomic สามารถบอกความแตกต่างภายในสปีชีส์ได้ และยังสามารถบอกถึงบรรพบุรุษของสายพันธุ์ถั่วลิสงได้ด้วย

Bornet และคณะ (2002) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันฝรั่งในยุโรปและอาร์เจนตินา ทั้งหมด 28 ตัวอย่าง แบ่งเป็นยุโรป 24 ตัวอย่าง และ อาร์เจนตินา 4 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ ใช้เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ (GAG(CAA))₅ , CTG(AG)₈ และ (AG)₈ พบว่าสามารถเกิดแถบที่บอกความแตกต่างได้ 25 , 26 และ 26 แถบตามลำดับ เมื่อนำมาจัดกลุ่มสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้ตามแหล่งพื้นที่คือ ยุโรป และอาร์เจนตินา

Paulo และคณะ (2003) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Genetic relationship) ของสายพันธุ์กาแฟ และ ตรวจหาบรรพบุรุษ (Parantage determination) ของลูกผสมระหว่างสปีชีส์ (interspecific hybrid) โดยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ ใช้เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ในการศึกษา 14 ชนิด จะมีทั้งการใช้ไพรเมอร์ตัวเดียว หรือผสมกัน 2 ไพรเมอร์ เมื่อทำการทดลองแล้วพบว่า มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่เกิดขึ้น 230 แถบ และไพรเมอร์ที่ดีที่สุดคือ ไดนิวคลีโอไทด์ คือ (GA)₉T ร่วมกับ ไตร- และเตตระ- นิวคลีโอไทด์ จะทำให้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragments) มากขึ้น และยังสามารถบอกความแตกต่างได้ดีที่สุดด้วย ทำให้ทราบว่า เทคนิคไอเอสเอสอาร์มีประสิทธิภาพที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กาแฟ และ ยังสามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหาบรรพบุรุษของสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างสปีชีส์ได้

Gang และคณะ (2002) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Korean *Allium* sect. *Sacculiferum* โดยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ ศึกษา 34 ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวแทน 6 taxa พบว่าความแตกต่างกันอย่างมากระหว่าง taxa ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ 23 กับ 11 ตัวอย่าง ภายใน 11 ตัวอย่างแบ่งออกเป็น 6 กับ 5 ตัวอย่าง ภายใน 23 ตัวอย่างแบ่งออกเป็น 18 กับ 5 ตัวอย่าง และใน 18 ตัวอย่างแบ่งออกเป็น 14 กับ 4 ตัวอย่าง และใน 14 ตัวอย่างแบ่งออกเป็น 2 กับ 12 ตัวอย่าง และใน 12 ตัวอย่างแบ่งออกเป็น 6 กับ 6 ตัวอย่าง

Adams และคณะ (2003) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารเทอร์ปีนอยด์ โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ อาร์เอพีดี และไอทีเอส (internal transcribed spacer, ITS) ระหว่างต้นสน (*Juniperus*) 12 จีโนไทป์ ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมากระหว่าง 3 เทคนิค ซึ่งตรงข้ามกับสารเทอร์ปีนอยด์ มีความสัมพันธ์กันน้อยมาก เนื่องจากทั้ง 12 จีโนไทป์มาจากสปีชีส์ที่แตกต่างกัน

Rakhee และคณะ (2004) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Trigonella foenum-graecum* และ *Trigonella caerulea* โดยเทคนิคอาร์เอพีดี และ ไอเอสเอสอาร์ ทั้งหมด 26 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากประเทศต่างกัน พบว่า *Trigonella foenum-graecum* มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของอาร์เอพีดี และไอเอสเอสอาร์ คือ 70.12 และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน *Trigonella caerulea graecum* มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของอาร์เอพีดี และไอเอสเอสอาร์ คือ 94.83 และ 93.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลจากการศึกษาแผนภาพ (Dendrogram) ของอาร์เอพีดี, ไอเอสเอสอาร์ และ อาร์เอพีดี รวมกับ ไอเอสเอสอาร์ พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่าง geographic distance กับ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Trigonella foenum-graecum* และ *Trigonella caerulea* ไม่สอดคล้องกัน

Terzopoulos และคณะ (2005) โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ จำแนกความแตกต่างระหว่างมะกอก (*Olea europaea* L.) 31 พื้นที่ ซึ่งเจริญเติบโตในประเทศกรีซ เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษามี 2 ชนิดคือ UBC-818 และ UBC-849 ซึ่งสามารถสร้าง 51 และ 33 แถบดีเอ็นเอตามลำดับ เมื่อนำมาสร้างแผนภาพของทั้ง 31 พื้นที่จากการรวมไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกัน พบว่าทั้ง 31 พื้นที่แตกต่างกันทั้งหมด

Cano และคณะ (2005) ใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ในการจำแนก *Microsporus canis* strains ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกลาก ทั้งหมด 24 ไอโซเลต (Isolated) มาจากคนไข้ที่เป็นคนผู้ป่วย และสัตว์เลี้ยง (สุนัข และแมว) ที่อยู่ใกล้ชิดกับผู้ป่วย โดยใช้เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ACA(5'BDB(ACA)₅) และ CAA(5'DDB(CAA)₅) สามารถจัดออกเป็น 21 จีโนไทป์ จาก 24 ไอโซเลต ซึ่งพบว่าตัวที่มีจีโนไทป์เดียวกัน คือ ผู้ป่วย และสัตว์เลี้ยงที่มีความใกล้ชิดกัน เทคนิคไอเอสเอสอาร์สามารถจำแนก *Microsporus canis* strains ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงเป็นเหตุผลที่เลือกเทคนิคไอเอสเอสอาร์ เพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายของเปล้าใหญ่ในประเทศไทย และยังไม่มีรายงานการศึกษาเปล้าใหญ่ในประเทศไทยในระดับชีวโมเลกุล นอกจากนี้มีรายงานก่อนหน้านี้ว่า องค์ประกอบของสารจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ ที่มาจากพื้นที่แตกต่างกัน จะมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันด้วย จึงเป็นมูลเหตุจูงใจในการทำการศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลทางชีวโมเลกุลของเปล้าใหญ่ กับองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่

2.6 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในต้นเปล้าใหญ่

จากการรวบรวมข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของเปล้าใหญ่ ตั้งแต่ปี ค.ศ.1968 ถึง 2004 แสดงในตารางที่ 2.1

Rao, Sachdev และ Singh (1968) ได้พบ diterpene alcohol, oblongifolol ซึ่งรวมอยู่กับ β -sitosterol จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่

Aiyar, Rao, Sachdev และ Seshadri (1969) ได้พบ deoxyoblongifolol จาก เปลือกต้นเปล้าใหญ่

Aiyar และ Seshadri (1971) ได้พบ 3 ชนิด ได้แก่ *ent-isopimara-7,15-diene* 19-hydroxy-*ent-isopimara-7,15-diene* และ *ent-isopimara-7,15-diene-19-aldehyde* จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่

Aiyar และ Seshadri (1971) ได้พบ oblongifolol และ deoxyoblongifolol ซึ่งระบุได้ว่าเป็น *ent-isopimara-7,15-diene-3 β -ol* และ *ent-isopimara-7,15-diene-3 β ,19-diol* ตามลำดับ

Aiyar และ Seshadri (1971) ได้พบ Acetyl aleuritic acid และ 3 β -acetoxy-olean-14(15)-ene-28-oic acid พบ จาก เปลือกต้นเปล้าใหญ่

Aiyar และ Seshadri (1972) ได้พบสาร 2 ชนิดที่ใกล้เคียงกับ furanoid diterpenes จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ ตัวแรกได้แก่ *ent-15,16-epoxy-3,11,13(16),14-clerodatetraen-19-oic acid* ซึ่งมีชื่อสามัญคือ 11-dehydro-(—)-hardwickiic acid และอีกตัวคือ (—)-hardwickiic acid

โสภณ เริงสำราญ และคณะ (1998) ได้พบ cembranoid 2 ชนิด คือ crotocebraneic acid และ neocrotocebraneic acid จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ จังหวัด เพชรบูรณ์

โสภณ เริงสำราญ และคณะ (1999) ได้พบสารประกอบ labdane diterpene ได้แก่ labda-7,12(*E*),14-triene labda-7,12(*E*),14-triene-17-al labda-7,12(*E*)-14-triene-17-ol และ

labda-7,12(*E*),14-triene-17-oic acid จาก เปล้าใหญ่ อำเภอปรานบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และในปีเดียวกัน

โสภณ เรืองสำราญ และคณะ (1999) ได้พบ cembranoid diterpenoids และ neocrotocembranal จากเปลือกลำต้นเปล้าใหญ่ อำเภอบึงสามพัน จังหวัดเพชรบูรณ์

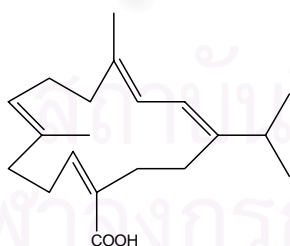
โสภณ เรืองสำราญ และคณะ (1999) ได้พบ labdane diterpenoids 3 ชนิด ได้แก่ 2-acetoxy-3-hydroxy-labda-8(17),12(*E*),14-triene, 3-acetoxy-2-hydroxy-labda-8(17),12(*E*),14-triene และ 2,3-dihydroxy-labda-8(17),12(*E*),14-triene จากเปลือกลำต้นเปล้าใหญ่ อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย

โสภณ เรืองสำราญ และคณะ (2003) ได้พบ halimane diterpenoids 3 ชนิด ได้แก่ crotohalimaneic acid, crotohalimoneic acid และ 12-benzoyloxycrotohalimaneic acid จากเปลือกลำต้นเปล้าใหญ่ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

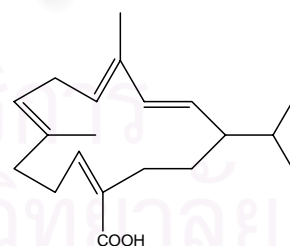
สารประกอบที่เป็นองค์ประกอบหลักในเปลือกต้นเปล้าใหญ่เป็นสารประกอบประเภทไดเทอร์ปีนอยด์ แบ่งออกเป็น 10 กลุ่ม คือ cembrane diterpenoids, pimarane diterpenoids, clerodane diterpenoids, isopimarane diterpenoids, labdane diterpenoids, halimane diterpenoids, cleistanthane diterpenoids, kaurane diterpenoids, trachylobane diterpenoids และ abeitane diterpenoids (พัชรา บุญญามณี, 2001 และ Praworada chonsuk, 2004)

2.7 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มไดเทอร์ปีนอยด์ที่พบในเปลือกต้นเปล้าใหญ่

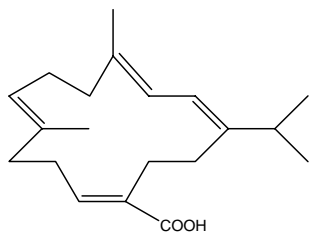
1. Cembrane diterpenoid



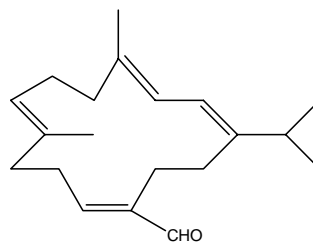
crotoembraneic acid



poilaneic acid

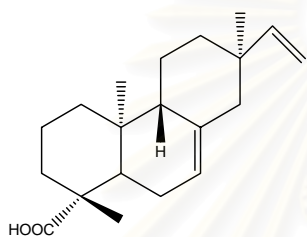


neocrotocembraneic acid

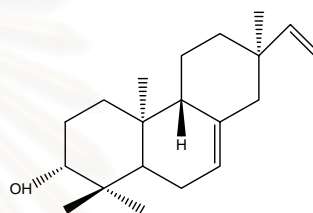


neocrotocembranal

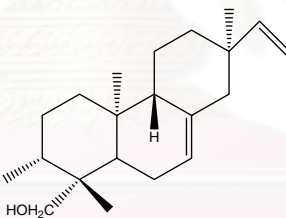
2. Pimarane diterpenoids



oblongofolic acid

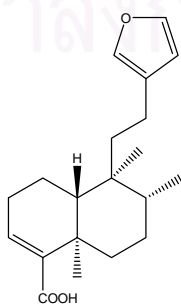


19-deoxyoblongifolol

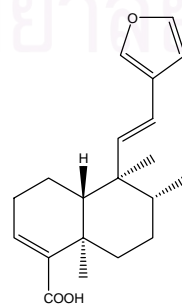


oblongifolol

3. Clerodane diterpenoids

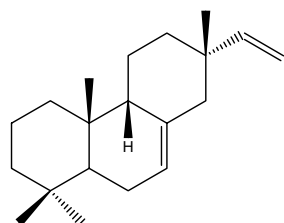


(-)-Hardwickiic acid

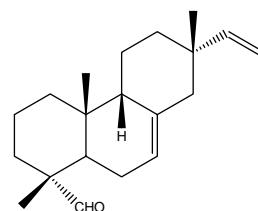


11-dehydro(-)-hardwickiic acid

4. Isopimarane diterpenoids

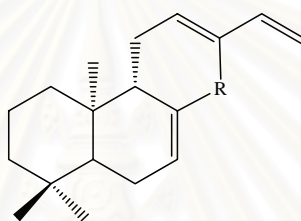


ent-isopimara-7,15-diene

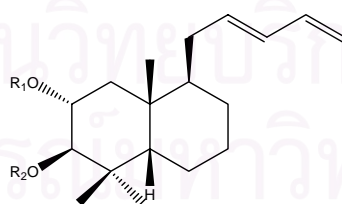


ent-isopimara-7,15-diene-19-aldehyde

5. Labdane diterpenoids

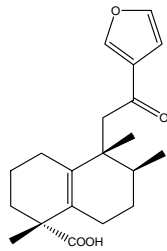


R = CH ₃	labda-7,12(E),14-triene
CH ₂ OH	labda-7,12(E),14-triene-17-ol
CHO	labda-7,12(E),14-triene-17-al
CO ₂ H	labda-7,12(E),14-triene-17-oic acid

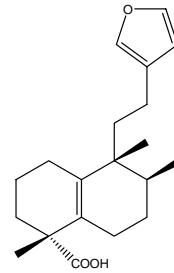


R ₁	R ₂	
CH ₃ CO	H	2-acetoxy-labda-8(17),12(E),14-triene-3-ol
H	CH ₃ CO	3-acetoxy-labda-8(17),12(E),14-triene-2-ol
H	H	labda-8(17),12(E),14-triene-2,3-diol

6. Halimane diterpenoids

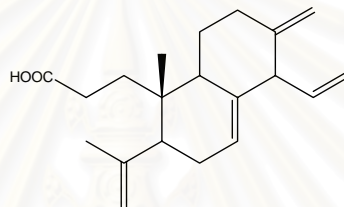


crotohalimoneic acid



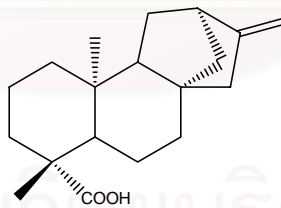
crotohalimaneic acid

7. Cleistanthane diterpenoids



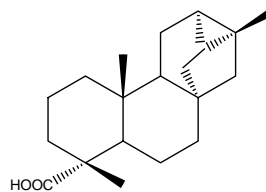
cleistantha-4,13,15-triene-3-oic acid

8. Kaurane diterpenoids



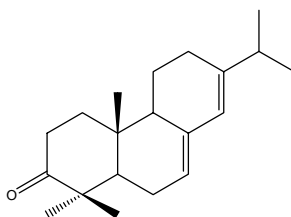
ent-kaur-16-en-19-oic acid

9. Trachylobane diterpenoids



trachyloban-19-oic-acid

10. Abeitane diterpenoids



abeita-7,13-dien-3-one

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของต้นเปล้าใหญ่

องค์ประกอบทางเคมี	บริเวณ	เอกสารอ้างอิง
<u>Diterpenoids</u>		
1. Cembrane diterpenoid		
crotocebraneic acid	เปลือกลำต้น	Surachetthapan, 1996; Roengsumran และคณะ., 1998
neocrotocebraneic acid	ใบ เปลือกลำต้น	Achayindee, 1996 Roengsumran และคณะ., 1998
neocrotocebranal	เปลือกลำต้น	Roengsumranและคณะ., 1998b
polianeic acid	เปลือกลำต้น	Boontha, 2000
(2 <i>E</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)1-isopropyl-1,4-dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-2,7,11-triene-12-carboxylic acid	เปลือกลำต้น	Tanwattanakun, 1999
2. Pimarane diterpenoids		
oblongifoliol	เปลือกลำต้น เปลือกราก, ไม้	Rao และคณะ., 1968 Aiyar และ Seshadri ,1972b
19-Deoxyoblongifoliol	เปลือกลำต้น เปลือกราก, ไม้	Rao และคณะ., 1968 Aiyar และ Seshadri ,1972b
oblongifolic acid	เปลือกลำต้น เปลือกราก, ไม้	Aiyar และ Seshadri ,1970 Aiyar และ Seshadri ,1972b

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของต้นเปล้าใหญ่ (ต่อ)

องค์ประกอบทางเคมี	บริเวณ	เอกสารอ้างอิง
<i>ent</i> -isopimara-7,15-diene	เปลือกลำต้น เปลือกราก,ไม้	Aiyar และ Seshadri ,1971b Aiyar และ Seshadri ,1972b
<i>ent</i> -isopimara-7,15-diene-19-aldehyde	เปลือกลำต้น เปลือกราก,ไม้	Aiyar และ Seshadri ,1971b Aiyar และ Seshadri ,1972b
19-hydroxy- <i>ent</i> -Isopimara-7,15-diene	เปลือกลำต้น	Aiyar และ Seshadri ,1971b
3-Deoxyoblongifoliol	เปลือกลำต้น เปลือกราก,ไม้	Aiyar และ Seshadri ,1971a Aiyar และ Seshadri ,1972b
(—)-Pimara-9(11),15-diene-19-oic acid (Acanthoic acid)	เปลือกลำต้น	Tanwattanakun, 1999
(—)-Pimara-9(11),15-diene-19-ol	เปลือกลำต้น	Tanwattanakun, 1999
3. Clerodane diterpenoids		
isokolavenol	เปลือกลำต้น	Singtothong P,1999
nasimalun A	เปลือกลำต้น	Hasan C.M,2000: Ruangraweewat N,2001
crovatin	เปลือกลำต้น	Siriwat, 2000
croblongifolin	เปลือกลำต้น	Roengsumran และคณะ., 2002
(—)-hardwickiic acid	เปลือกราก,ไม้	Aiyar และ Seshadri ,1972b
	เปลือกลำต้น	Aiyar และ Seshadri ,1972a; Surachethapan, 1996; Baigern, 1999; Sirimongkun, 2000; Sriyagnok, 2000
11-dehydro-(—)- hardwickiic acid	เปลือกลำต้น เปลือกราก,ไม้	Aiyar และ Seshadri ,1972a Aiyar และ Seshadri ,1972b

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของต้นเปล้าใหญ่ (ต่อ)

องค์ประกอบทางเคมี	บริเวณ	เอกสารอ้างอิง
(—)-20benxyloxyhardwickiic acid	เปลือกลำต้น	Baiagern, 1999
methyl-15,16-epoxy-12-oxo-3,13(16),14-clerodatriene-20,19-olide-17-oate	เปลือกลำต้น	Tanwattanakun, 1999
4. Isopimarane diterpenoids		
<i>ent</i> -isopimara-7,15-diene	เปลือกลำต้น	Aiyar และ Seshadri, 1971b
<i>ent</i> -isopimara-7,15-diene-19-aldehyde	เปลือกลำต้น เปลือกกราก	Aiyar และ Seshadri, 1972b Aiyar และ Seshadri, 1971b
5. Labdane diterpenoid		
labda-7,12(<i>E</i>),14-triene	เปลือกลำต้น	Roengsumran และคณะ, 1999a
labda-7,12(<i>E</i>),14-triene-17-al	เปลือกลำต้น	Roengsumran และคณะ, 1999a
labda-7,12(<i>E</i>),14-triene-17-ol	เปลือกลำต้น	Roengsumran และคณะ, 1999a
labda-7,12(<i>E</i>),14-triene-17-oic acid	เปลือกลำต้น	Roengsumran และคณะ, 1999a
3-acetoxy-labda-8,(17),12(<i>E</i>),14-triene-2-ol	เปลือกลำต้น	Kuptiyanuwat, 1999; Roengsumran และคณะ, 2001
2-acetoxy-labda-8,(17),12(<i>E</i>),14-triene-3-ol	เปลือกลำต้น	Kuptiyanuwat, 1999; Roengsumran และคณะ, 2001
labda-8(17),12(<i>E</i>),14-triene-2,3-diol	เปลือกลำต้น	Kuptiyanuwat, 1999; Roengsumran และคณะ, 2001
labda-7,13(<i>Z</i>)-diene-17,12-olide	เปลือกลำต้น	Baiagern, 1999
labda-7,13(<i>Z</i>)-diene-17,12-olide-15-ol	เปลือกลำต้น	Baiagern, 1999
6-acetoxy-12(<i>E</i>),14-labdadiene-7,8-diol	เปลือกลำต้น	Boontha, 2000
12(<i>E</i>),14-labdadiene-6,7,8-triol	เปลือกลำต้น	Boontha, 2000
nidorellol	เปลือกลำต้น	Roengsumran และคณะ., 2002

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของต้นเปล้าใหญ่ (ต่อ)

องค์ประกอบทางเคมี	บริเวณ	เอกสารอ้างอิง
<i>ent</i> -8(17),12 <i>E</i> ,14-labdatrien-18-oic acid	เปลือกลำต้น	Pattamadilok, 1998
12,15-epoxy-8(17),12,14-labdatriene	เปลือกลำต้น	Pattamadilok, 1998
12(<i>E</i>),14-labdadiene-7,8-diol	เปลือกลำต้น	Boontha, 2000
(5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>S</i>)-8,13-epoxy-12-hydroxy-labda-1,14-dien-3-	เปลือกลำต้น	Permpanya, 2003
(5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>S</i>)-8,13-epoxy-12-hydroxy-labda-1,-14-dien-3-one	เปลือกลำต้น	Permpanya, 2003
6. Halimane diterpenoids		
cotohalimaneic acid	เปลือกลำต้น	Roengsumran และคณะ Singtothong P , 1999
bnzoyl crotohalimaneic acid	เปลือกลำต้น	Roengsumran และคณะ และ Singtothong P , 1999
crotohalimoneic acid	เปลือกลำต้น	Singtothong P , 1999
7. Cleistanthane diterpenoids		
cleistantha-4,13(17),15-triene-3-oic acid	เปลือกลำต้น	Siriwat, 2000
3,4-seco-cleistantha-4(18),13(17),15-trien-3-oic acid	เปลือกลำต้น	Siriwat, 2000; Sriyangnok, 2000
8. Kaurane diterpenoids		
kaur-16-en-19-oic acid	เปลือกลำต้น	Sirimongkhon, 2000
kuar-16-en-19-ol	เปลือกลำต้น	Sirimongkhon, 2000
16,17-epoxy-kuar-19-oic acid	เปลือกลำต้น	Sirimongkhon, 2000
17-hydroxykaur-15-en-19-oic acid	เปลือกลำต้น	Sirimongkhon, 2000

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของต้นเปล้าใหญ่ (ต่อ)

องค์ประกอบทางเคมี	บริเวณ	เอกสารอ้างอิง
9. Trachylobane diterpenoids		
trachyloban-19-oic acid	เปลือกลำต้น	Boontha, 2000
10. Abeitane diterpenoids		
aeita-7,13-diene-3-one	เปลือกลำต้น	Sirimongkhon, 2000
Triterpenoids		
acetyl aleuritolic acid	เปลือกลำต้น	Aiyar และคณะ., 1971c
Coumarin		
7-hydroxy-6-methoxycoumarin	ไม้	Chaicharoenpong, 1996
Steroids		
β -sitosterol	เปลือกลำต้น ไม้ ใบ	Rao และคณะ., 1968 Chaicharoenpong, 1996 Achayindee, 1996
campesterol	ไม้ เปลือกลำต้น	Chaicharoenpong, 1996 Patamadilok, 1998
stigmasterol	ไม้ ใบ เปลือกลำต้น	Chaicharoenpong, 1996 Achayindee, 1996 Patamadilok, 1998
Steroid Glucoside		
β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside	ไม้ เปลือกลำต้น	Chaicharoenpong, 1996 Surachethapan, 1996
campesteryl 3-O- β -D-glucopyranoside	ไม้ เปลือกลำต้น	Chaicharoenpong, 1996 Surachethapan, 1996
stigmateryl-3-O- β -D-glucopyranoside	ไม้ เปลือกลำต้น	Chaicharoenpong, 1996 Surachethapan, 1996

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของต้นเปล้าใหญ่ (ต่อ)

องค์ประกอบทางเคมี	บริเวณ	เอกสารอ้างอิง
<u>Miscellaneous</u> Mixture of long chain aliphatic hydrocarbon (C ₂₇ -C ₃₃)	ไม้ ใบ	Chaicharoenpong, 1996 Achayindee, 1996
Mixture of long chain aliphatic carboxylic acids (C ₁₈ , C ₂₂ -C ₃₄)	ไม้	Chaicharoenpong, 1996
Mixture of long chain alcohols (C ₂₈ -C ₂₉ , C ₃₁ -C ₃₂ , C ₃₄)	ใบ	Achayindee, 1996
6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone	ใบ	Achayindee, 1996
potassium chloride	ใบ	Achayindee, 1996

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทดลอง

3.1.1 วัสดุ และเครื่องมือ

- 3.1.1.1 เครื่อง PCR T Gradient software version4.220 ของบริษัท Whatman Biometra
- 3.1.1.2 เครื่อง Electrophoresis รุ่น AE-6111 ของบริษัท ATTO
- 3.1.1.3 เครื่อง Micro centrifuge 220 VAC
- 3.1.1.4 เครื่อง Water bath
- 3.1.1.5 เครื่อง Mini Sub DNA cell ของบริษัท BIO-RAD
- 3.1.1.6 เครื่อง Microwave ของบริษัท Sharp
- 3.1.1.7 เครื่อง Rotary vacuum evaporator ของบริษัท Buchi
- 3.1.1.8 เครื่อง Power supply Model 200/2.0 ของบริษัท Bio-rad
- 3.1.1.9 เครื่อง UV Transilluminator ของบริษัท Bio-rad
- 3.1.1.10 เครื่อง Vortex-Genie 2 ของบริษัท Scitific industries
- 3.1.1.11 เครื่อง Autoclave
- 3.1.1.12 เครื่อง UV-Lamp
- 3.1.1.13 เครื่อง Varian NMR spectrometer 400 MHz
- 3.1.1.14 กระจกบอกตวง
- 3.1.1.15 หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (1.5 mL Microcentrifuge tube)
- 3.1.1.16 ถังมือยางผ่าตัด
- 3.1.1.17 ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sharp
- 3.1.1.18 ตู้เย็น ของบริษัท Sharp
- 3.1.1.19 โกร่งบดยา (Mortar)
- 3.1.1.20 หลอดพีซีอาร์ ขนาด 200 ไมโครลิตร (200 μ L PCR)
- 3.1.1.21 หลอด NMR (NMR tube)
- 3.1.1.22 ปิเปตต์ทิป (Pipette tip)
- 3.1.1.23 แผ่น TLC aluminum sheets 20x20 mm silica gel 60F₂₅₄ ของบริษัท Merck
- 3.1.1.24 ไมโครไปเปตต์ (Micro pipette) ของบริษัท Gilson

ไพรเมอร์ GR(TC) ₅	5'- GRTCTCTCTCTC -3'
ไพรเมอร์ CRN2(CTT) ₅	5'- CRNNCTTCTTCTTCTTCTT -3'
ไพรเมอร์ BSC(GA) ₈	5'- BSCGAGAGAGAGAGAGAGA -3'
ไพรเมอร์ G-02	5'- GGGAGTGAGG -3'
ไพรเมอร์ G-06	5'- GTGCTTAAGC -3'
ไพรเมอร์ G-08	5'- TCACGTCCAC -3'
ไพรเมอร์ G-13	5'- GTCTCCGCGA -3'
ไพรเมอร์ G-17	5'- GTATCAGAGC -3'
ไพรเมอร์ OPD-05	5'- TGAGCGGACA -3'
ไพรเมอร์ OPC-02	5'- GTGAGGCGTC -3'
ไพรเมอร์ OPC-05	5'- GATGACCGGC -3'
ไพรเมอร์ OPC-11	5'- AAAGCTGCGG -3'

หมายเหตุ R = G หรือ A ; S = C หรือ G ; B = C และ G หรือ T ; N = A และ C และ G และ G หรือ T

- 3.1.2.19 โพลีไวนิล ไพโรลิโดน 6000 (Polyvinyl pyrrolidone 6000, PVP) ของบริษัท Serva
- 3.1.2.20 โรโบนิวคลีเอส (Ribonuclease, RNase)
- 3.1.2.21 แทค โพลีเมอเรส (Tag DNA polymerase (recombinant) concentration 5U/ μ L) ของบริษัท Fermentas
- 3.1.2.22 ทริส เบส Tris-base ของบริษัท Scharlau
- 3.1.2.23 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ของบริษัท Sibenzynce
- 3.1.2.24 2- เมอร์แคปโทเอทานอล (2- mercapthoethanol) ของบริษัท Scharlau
- 3.1.2.25 ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ของบริษัท Scharlau
- 3.1.2.26 แอสคอร์บิก แอซิด (Ascorbic acid) ของบริษัท Scharlau

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

3.2.1.1 ไบ

ในการวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างไบเปล้าใหญ่จากแหล่งต่างๆในประเทศไทย (ตารางที่

- 3.1) เช่น เชียงใหม่ ชัยภูมิ กาฬสินธุ์ ขอนแก่น กาญจนบุรี มหาสารคาม นครราชสีมา ประจวบคีรีขันธ์ พะเยา เพชรบูรณ์ ราชบุรี สระแก้ว สกลนคร สระบุรี อุตรดิตถ์ เป็นต้น เก็บ

ตัวอย่างโดยตัดใบปล้ำใหญ่เป็นชิ้นขนาด 1 x 1 เซนติเมตร ทำให้แห้งโดยเก็บในถุงพลาสติกที่บรรจุซิลิกาเจล เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

3.2.1.2 เปลือก

ในการวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างเปลือกต้นปล้ำใหญ่จากแหล่งต่างๆ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยใช้เปลือกที่บริเวณลำต้น นำมาบดด้วยเครื่องบด แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง แล้วนำมาใช้ในการวิเคราะห์ (ถ้าหากยังไม่ใช้ . ในทันทีจะเก็บตัวอย่างเปลือกไว้ในตู้ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำมาวิเคราะห์)

ตารางที่3.1 ตัวอย่างปล้ำใหญ่ที่ศึกษา และแหล่งที่มา

ตัวอย่างที่	รหัส	แหล่งที่มา
1	CH1	วัดทุ่งหลวง ตำบลแม่แตง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่
2	CP1	ตำบลภูพระ อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
3	CP2	ตำบลภูพระ อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
4	CP3	ตำบลภูพระ อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
5	CP4	ตำบลภูพระ อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
6	CP5	ตำบลภูพระ อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
7	CP6	ตำบลภูพระ อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
8	CI1	บ้านหินหนับ ตำบลท่าไทม อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
9	CI2	บ้านหินหนับ ตำบลท่าไทม อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
10	CI3	บ้านหินหนับ ตำบลท่าไทม อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
11	KA1	หมู่13 ตำบลยางตลาด อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์
12	KA2	บ้านเปือย ตำบลหัวงัว อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์
13	KH3	อำเภอเมือง ตำบลศิลา จังหวัดขอนแก่น
14	KY1	บ้านยางโทน จังหวัดกาญจนบุรี
15	KY3	บ้านยางโทน จังหวัดกาญจนบุรี
16	KY4	บ้านยางโทน จังหวัดกาญจนบุรี
17	KY5	บ้านยางโทน จังหวัดกาญจนบุรี
18	KY6	บ้านยางโทน จังหวัดกาญจนบุรี
19	KY7	บ้านยางโทน จังหวัดกาญจนบุรี
20	KY8	บ้านยางโทน จังหวัดกาญจนบุรี
21	KS1	อำเภอไทรโยคน้อย จังหวัดกาญจนบุรี

ตัวอย่างที่	รหัส	แหล่งที่มา
22	MA1	ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม
23	MA2	ตำบลปะหลาน อำเภอพยัคฆภูมิพิสัย จังหวัดมหาสารคาม
24	UN1	จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
25	UN2	จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
26	PK	เขาแดง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
27	PU1	ค่ายพระมงกุฎ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
28	P1.5	ค่ายพระมงกุฎ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
29	P400	ค่ายพระมงกุฎ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
30	PA1	277 หมู่5 ตำบลห้วยลาน อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา
31	PA2	277 หมู่5 ตำบลห้วยลาน อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา
32	PL1	น้ำตกป่าละอู ตำบลห้วยสัตว์ใหญ่ อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
33	PL2	น้ำตกป่าละอู ตำบลห้วยสัตว์ใหญ่ อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
34	PM1	อ่าวมะนาว จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
35	PM2	อ่าวมะนาว จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
36	PH1	บ้านปรางไม้ ตำบลสระประดู่ อำเภอวิเชียรบุรี จังหวัดเพชรบูรณ์
37	PH2	อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์
38	PH3	อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์
39	PH4	อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์
40	PH5	อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์
41	RA1	อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี
42	SA1	ป่าชุมชนบ้านน้ำล้อม ตำบลท่าแยก อำเภอเมือง จังหวัดสระแก้ว
43	SK1	จังหวัดสกลนคร
44	SU1	อำเภอเมือง จังหวัดสิงห์บุรี
45	CA1	ตำบลนาเสียว อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
46	CA2	ตำบลนาเสียว อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
47	CA3	ตำบลนาเสียว อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
48	UD1	บ้านหนองบัว จังหวัดอุดรธานี

ตัวอย่างที่	รหัส	แหล่งที่มา
49	NP	บ้านปอแดง จังหวัดนครราชสีมา
50	NR3	อำเภอปักธงชัย สระแก้ว จังหวัดนครราชสีมา
51	NR4	อำเภอปักธงชัย สระแก้ว จังหวัดนครราชสีมา
52	NR5	อำเภอปักธงชัย สระแก้ว จังหวัดนครราชสีมา
53	NR7	อำเภอปักธงชัย สระแก้ว จังหวัดนครราชสีมา
54	NR8	อำเภอปักธงชัย สระแก้ว จังหวัดนครราชสีมา
55	NR10	อำเภอปักธงชัย สระแก้ว จังหวัดนครราชสีมา
56	TA1	อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร
57	TA2	อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร
58	TA3	อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร
59	TA5	อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร
60	TA6	อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร
61	TA7	อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร
62	TA24	กองบิน 56 อ่าวมะนาว จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
63	CHe1	อำเภอบึงสามพัน จังหวัดเพชรบูรณ์
64	SN1	อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร
65	SB1	อำเภอแก่งคอย ตำบลบ้านผักแพว จังหวัดสระบุรี
66	KH1	หมู่ 6 บ้านหนองใหญ่ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น
67	JA	บ้านสามพันตา อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
68	JB	บ้านสามพันตา อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
69	JC	บ้านสามพันตา อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
70	JD	บ้านสามพันตา อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
71	JE	บ้านสามพันตา อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
72	JF	บ้านสามพันตา อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
73	JG	บ้านสามพันตา อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
74	JH	บ้านสามพันตา อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
75	JI	บ้านสามพันตา อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
76	JJ	บ้านสามพันตา อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
77	JK	บ้านสามพันตา อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ

ตัวอย่างที่	รหัส	แหล่งที่มา
107	QB	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
108	QC	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
109	QD	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
110	QE	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
111	QF	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
112	QG	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
113	QH	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
114	QI	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ
115	QJ	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ

3.2.2 วิเคราะห์ดีเอ็นเอ

3.2.2.1 สกัดดีเอ็นเอ (Zhou และคณะ, 1999)

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบเปล้าใหญ่ ซึ่งใบเปล้าใหญ่แห้ง 20–50 มิลลิกรัม บดใบโดยใช้โกร่งเติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร จนละเอียด แล้วถ่ายลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร (1.5 mL microcentrifuge tube) ปั่นเหวี่ยงที่ 15000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนในทิ้ง เติม สารละลาย washing buffer แล้วทำตามขั้นตอนซ้ำอีก 2 ครั้ง เติมสารละลาย CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติมสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม กับ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Chloroform : Isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้วอร์เทค (Vortex) ปั่นเหวี่ยงที่ 15000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม ต่อ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร อีกครั้งผสมให้เข้ากันโดยใช้วอร์เทค ปั่นเหวี่ยงที่ 15000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลายเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งให้ตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม RNase 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม PEG 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 15000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายส่วนใสทิ้ง เติม เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 15000 รอบต่อ

นาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้ตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.2.2 เทคนิคอาร์เอพีดี

3.2.2.2.1 คัดเลือกอาร์เอพีดีไพรเมอร์ (RAPD primers) ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของเปลือกใหญ่

ทำการคัดเลือกเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบทั้งหมด 9 ชนิด (ตารางที่ 3.2) เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการบอกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างเปลือกใหญ่นำมาศึกษา โดยอาศัยหลักการคัดเลือกจาก ความสามารถในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และมีความสามารถในการบอกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ศึกษา

ตารางที่ 3.2 ลำดับเบสของอาร์เอพีดีไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	ลำดับเบส
G-02	GGGAGTGAGG
G-06	GTGCTTAAGC
G-08	TCACGTCCAC
G-13	GTCTCCGCGA
G-17	GTATCAGAGC
OPD-05	TGAGCGGACA
OPC-02	GTGAGGCGTC
OPC-05	GATGACCGGC
OPC-11	AAAGCTGCGG

3.2.2.2.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี

ทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเปลือกใหญ่ในจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้ อาร์เอพีดีไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้วว่าเป็นไพรเมอร์ที่เหมาะสม

ทำสารละลายพีซีอาร์โดยมีปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร โดยมี ส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3.3 โดยใช้ เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้ว สภาวะในการทำพีซีอาร์ดังแสดงใน 3.2.2.2.3

ตารางที่ 3.3 ตารางแสดงส่วนประกอบของพีซีอาร์ของเทคนิคอาร์เอพีดี

สารประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2X PCR Master mix	1X	5.0
20 μ M Primer	0.2 μ M	0.2
DNA template	10-50 ng	1.0
Distilled water		3.8
ปริมาตรรวม		10

3.2.2.2.3 สภาวะในการทำพีซีอาร์

เริ่มต้นที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที 47 องศาเซลเซียส 1 นาที 70 องศาเซลเซียส 1 นาที 30รอบของ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 47 องศาเซลเซียส 1 นาที 70 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 47 องศาเซลเซียส 1 นาที (แผนภูมิที่1)

แผนภูมิที่ 3.1 แสดงสภาวะในการทำพีซีอาร์สำหรับเทคนิคอาร์เอพีดี

94 องศาเซลเซียส	3 นาที	
47 องศาเซลเซียส	1 นาที	
70 องศาเซลเซียส	1 นาที	
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	} 30รอบ
47 องศาเซลเซียส	1 นาที	
70 องศาเซลเซียส	1 นาที	
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	
47 องศาเซลเซียส	1 นาที	
70 องศาเซลเซียส	8 นาที	

3.2.2.2.4 ตรวจสอบผลพีซีอาร์โดยอีเล็กโตรโฟรีซิส

ตรวจสอบผลพีซีอาร์โดยวิธีอีเล็กโตรโฟรีซิส โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ เวลา 210 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV

3.2.2.3 เทคนิคไอเอสเอสอาร์

3.2.2.3.1 คัดเลือกเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของเปป้าใหญ่

ทำการคัดเลือกเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบทั้งหมด 8 ชนิด (ตารางที่ 3.4) เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการบอกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างเปป้าใหญ่ที่นำมาศึกษา โดยอาศัยหลักการคัดเลือกจาก ความสามารถในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และมีความสามารถในการบอกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ศึกษา

ตารางที่ 3.4 ลำดับเบสของเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5' → 3'	
1	GTGTGTGTGTGTGTGTC	(GT) ₈ C
2	TCTCTCTCTCTCTCC	(TC) ₈ C
3	ACCACACACACACACYG	AC(CA) ₆ CYG
4	CACACACACACACAG	(CA) ₈ G
5	AGAGAGAGAGAGAGT	A(GA) ₇ GT
6	GRTCTCTCTC	GR(TC) ₅
7	CRNNTCTTCTTCTTCTT	CRN ₂ (CTT) ₂
8	BSCGAGAGAGAGAGAGA	BSC(GA) ₈

หมายเหตุ ไพรเมอร์ที่ 6, 7 และ 8 R = G หรือ A ; S = C หรือ G ; B = C และ G หรือ T ; N = A และ C และ G และ G หรือ T

3.2.2.3.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์

ทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเปป้าใหญ่ที่ บริเวณตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่ระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่ง โดยใช้ เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้วว่าเป็นไพรเมอร์ที่เหมาะสม

ทำสารละลายพีซีอาร์โดยมีปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3.5 โดยใช้ เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้ว สภาวะในการทำพีซีอาร์ดังแสดงใน 3.2.2.3.3

ตารางที่ 3.5 ตารางแสดงส่วนประกอบของพีซีอาร์ของเทคนิคไอเอสเอสอาร์

สารประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X PCR buffer without MgCl ₂	1x	1.0
10 mM dNTP mix	0.2 μM	0.2
500 uTaq DNA polymerase	5 unit / μL	0.1
50 mM MgCl ₂	2.5 mM	1.0
Bovin Serum Albumin	400 ng	0.6
20μM Primer	1.0 μM	0.5
DNA template	10-50 ng	1.0
Distilled water		6.1
ปริมาตรรวม		10

3.2.2.3.3 สภาวะในการทำพีซีอาร์

เริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที 10 รอบของ 57 องศาเซลเซียส 1 นาที 70 องศาเซลเซียส 2 นาที 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (แต่ละรอบอุณหภูมิของ annealing ลดลง 0.5 องศาเซลเซียส) 30 รอบของ 52 องศาเซลเซียส 1 นาที 70 องศาเซลเซียส 2 นาที 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 70 องศาเซลเซียส 8 นาที (แผนภูมิที่ 2)

แผนภูมิที่ 3.2 แสดงสภาวะในการทำพีซีอาร์สำหรับเทคนิคไอเอสเอสอาร์

Preheat	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	}	10รอบ
Annealing *	57 องศาเซลเซียส	1 นาที		
Extension	70 องศาเซลเซียส	2 นาที		
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที		
*อุณหภูมิ Annealing ลดลง 0.5 องศาเซลเซียส ทุกๆ รอบ				→ 56.5 → 56.0
→ 55.5 → 55.0 → 54.5 → 54.0 → 53.5 → 53.0 → 52.5				
Annealing	52 องศาเซลเซียส	1 นาที	}	30รอบ
Extension	70 องศาเซลเซียส	2 นาที		
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที		
Final Extension	70 องศาเซลเซียส	8 นาที		

3.2.2.3.4 ตรวจสอบผลพีซีอาร์โดยอเล็กโตรโฟรีซิส

ตรวจสอบผลพีซีอาร์โดยวิธีอเล็กโตรโฟรีซิส โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ เวลา 210 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV

3.2.2.3.5 ทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

ทดสอบโดยการนำตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาบางตัวอย่างมาเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ สภาวะพีซีอาร์ และสภาวะอเล็กโตรโฟรีซิสเดิม เพื่อดูความสามารถของเทคนิคไอเอสเอสอาร์ และเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่ใช้

3.2.2.3.6 การวิเคราะห์ผลไอเอสเอสอาร์

ทำการวิเคราะห์ผลไอเอสเอสอาร์ ได้จากใช้ผลของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนในตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ จากไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่คัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.2.3.1 โดยจัดกลุ่มตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแต่ละกลุ่มที่จัดขึ้น โดยใช้โปรแกรม neighbour-join, Phylip 3.63

3.2.3 การวิเคราะห์ทางเคมีจากเปลือกเปล้าใหญ่

ทำการศึกษาองค์ประกอบของสารเคมีจากเปลือกของต้นเปล้าใหญ่ โดยนำเปลือกต้นเปล้าใหญ่มาบดให้ละเอียด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดด้วยเฮกเซน โดยใช้อัตราส่วนเปลือกเปล้าใหญ่ต่อเฮกเซนเป็น 1:12 แช่ทิ้งไว้ 3 คืน จากนั้นนำมากรอง แล้วนำมาระเหยเฮกเซนออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) จนได้สารสกัดเฮกเซน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย เทคนิค นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) และโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

3.2.3.1 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)

ทำโดยนำสารสกัดเฮกเซนที่ได้จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ ประมาณ 15-20 มิลลิกรัมมาละลายใน $CDCl_3$ ประมาณ 0.75 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^1H-NMR ด้วย Mercury+400NMR spectrometer, varian ซึ่งทำงานที่ 400 MHz

3.2.3.2 โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

วิเคราะห์สารสกัดเฮกเซนที่ได้จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ด้วย TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นเฮกเซน-เอทิลอะซิเตท (Hex-EtOAc) อัตราส่วน 60:40 แล้วตรวจสอบตำแหน่งสารด้วยเครื่อง UV-Lamp ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร, ไอของไอโอดีน และ Vanillin/ H_2SO_4 ตามลำดับ

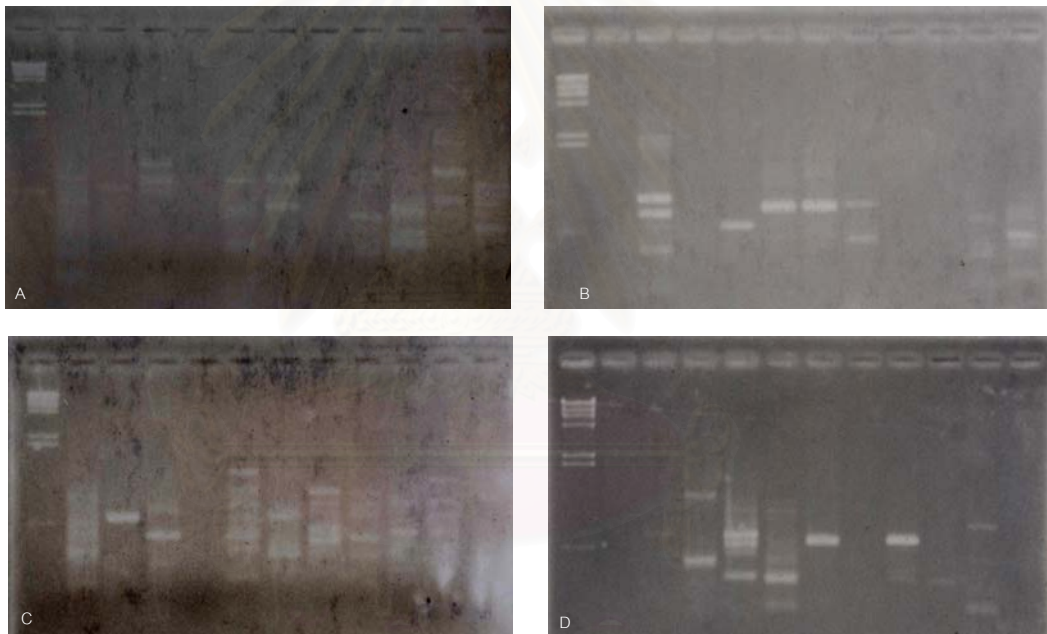
บทที่ 4

ผลการทดลอง และ วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาความหลากหลายของเป็ล้าใหญ่โดยเทคนิคอาร์เอพีดี

4.1.1 คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของเป็ล้าใหญ่

ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยใช้อาร์เอพีดี ไพรเมอร์ 9 ชนิด (ตารางที่ 3.2) พบว่าไพรเมอร์ที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างเป็ล้าใหญ่ได้ คือ ไพรเมอร์ G-2 [GGGAGTGAGG], ไพรเมอร์ G-17 [GTATCAGAGC] และไพรเมอร์ OPC-11 [AAAGCTGCGG]



รูปที่ 4.1 แสดงแถบดีเอ็นเอของเป็ล้าใหญ่ โดยไพรเมอร์ G-17(A และ B) และ OPC-11(C และ D)

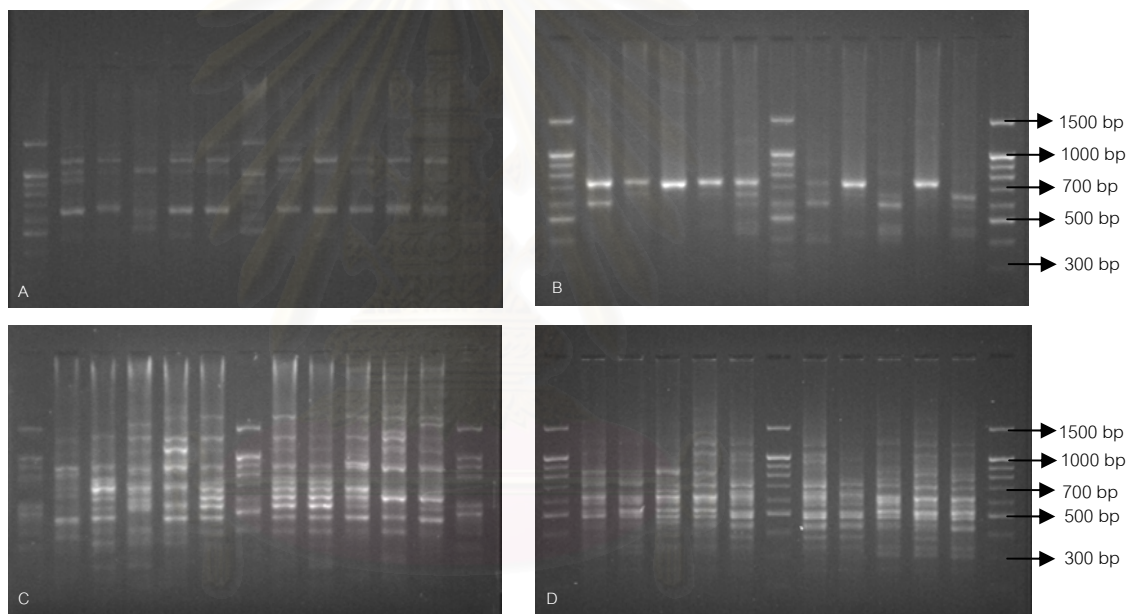
การศึกษาคความหลากหลายของเป็ล้าใหญ่ในประเทศไทย โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ซึ่งเทคนิคอาร์เอพีดี เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีราคาถูก ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม พบว่าผลแถบดีเอ็นเอของเป็ล้าใหญ่ 10 ตัวอย่างที่ถูกเพิ่มจำนวนโดยใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์ G-17 และ OPC-11 ศึกษาใน (รูปที่ 4.1A และ C) และการทำซ้ำในครั้งที่ 2 (รูปที่ 4.1B และ D) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมาก เมื่อทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ ผลการทดลองเปรียบเทียบกับเทคนิคอาร์เอพีดีพบว่า ไอเอสเอสอาร์มีความสม่ำเสมอของแถบดีเอ็นเอมากกว่า และมีการทำซ้ำที่ดีกว่า

เทคนิคอาร์เอพีดี (Yang และคณะ, 1996 และ Nagaoka และ Olihara, 1997) จึงได้ใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ในการศึกษาความหลากหลายของเปล้าใหญ่ในประเทศไทย

4.2 ศึกษาความหลากหลายของเปล้าใหญ่โดยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

4.2.1 คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่

จากการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ โดยใช้เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.3) พบว่าไพรเมอร์ 1 $(GT)_8C$ และ ไพรเมอร์ 3 $AC(CA)_6CYG$ ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ได้ (ไม่ได้แสดงผล) ส่วนไพรเมอร์ 2 $[(TC)_8C]$, ไพรเมอร์ 4 $[(CA)_8G]$, ไพรเมอร์ 5 $[A(GA)_7GT]$, ไพรเมอร์ 7 $[CRN_2(CTT)_2]$ และ ไพรเมอร์ 8 $[BSC(GA)_8]$ สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ได้ (รูปที่ 4.2)



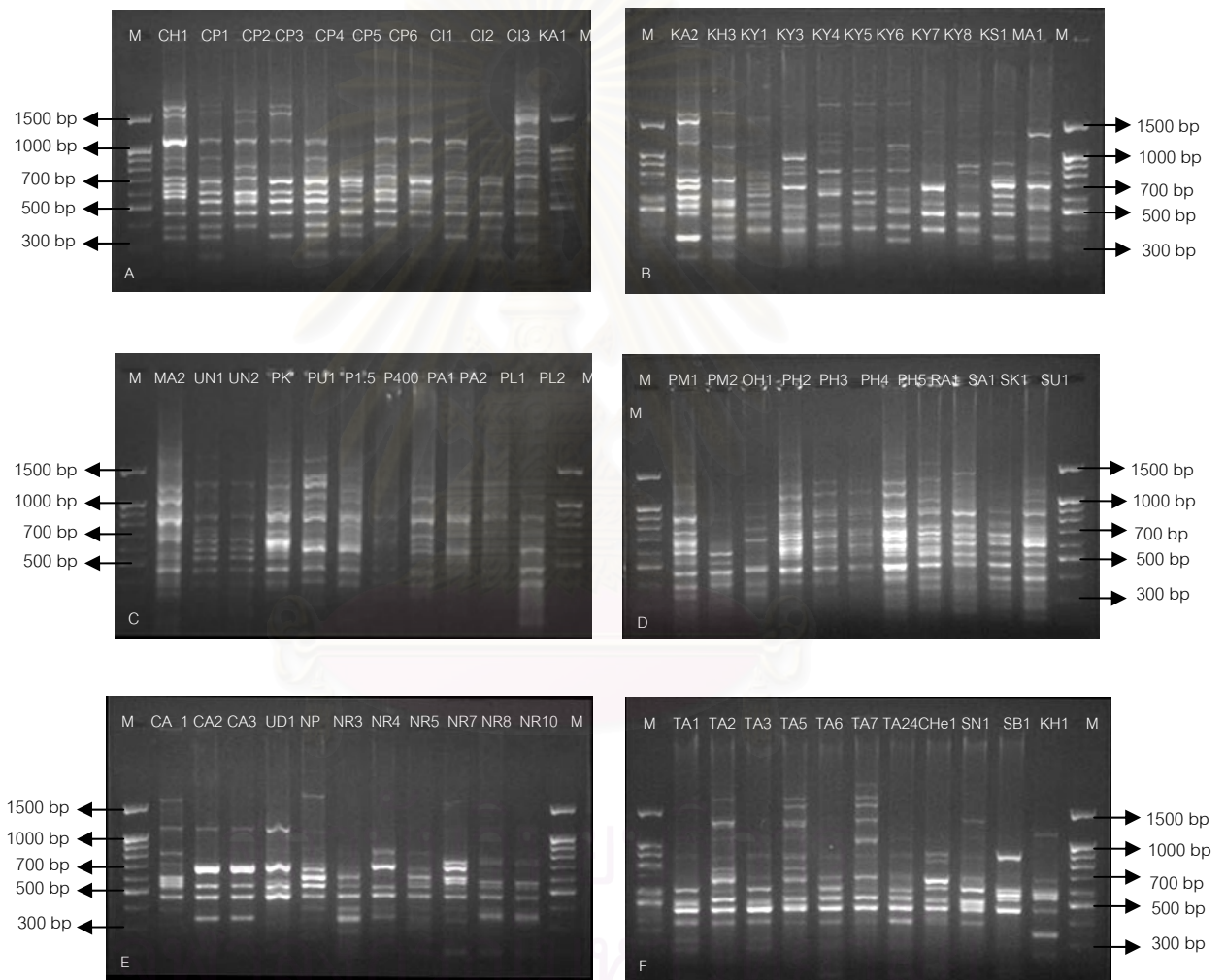
รูปที่ 4.2 แสดงผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 (A), ไพรเมอร์ 4 (B), ไพรเมอร์ 5 (C) และ ไพรเมอร์ 7 (D)

การคัดเลือกเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ คัดเลือกจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ความชัดเจน และสามารถบอกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ทำการศึกษาได้ พบว่า ไพรเมอร์ 2 (รูปที่ 4.2A) และ ไพรเมอร์ 4 (รูปที่ 4.2B) สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้ แต่แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อย และไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ทำการศึกษาได้ จึงไม่นำมาใช้ ส่วนไพรเมอร์ 5 (รูปที่ 4.2C) , ไพรเมอร์ 7 (รูปที่ 4.2D) และ ไพรเมอร์ 8 ดังนั้นในการศึกษางานวิจัยชิ้นนี้ได้คัดเลือกเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ 3 ตัวใน

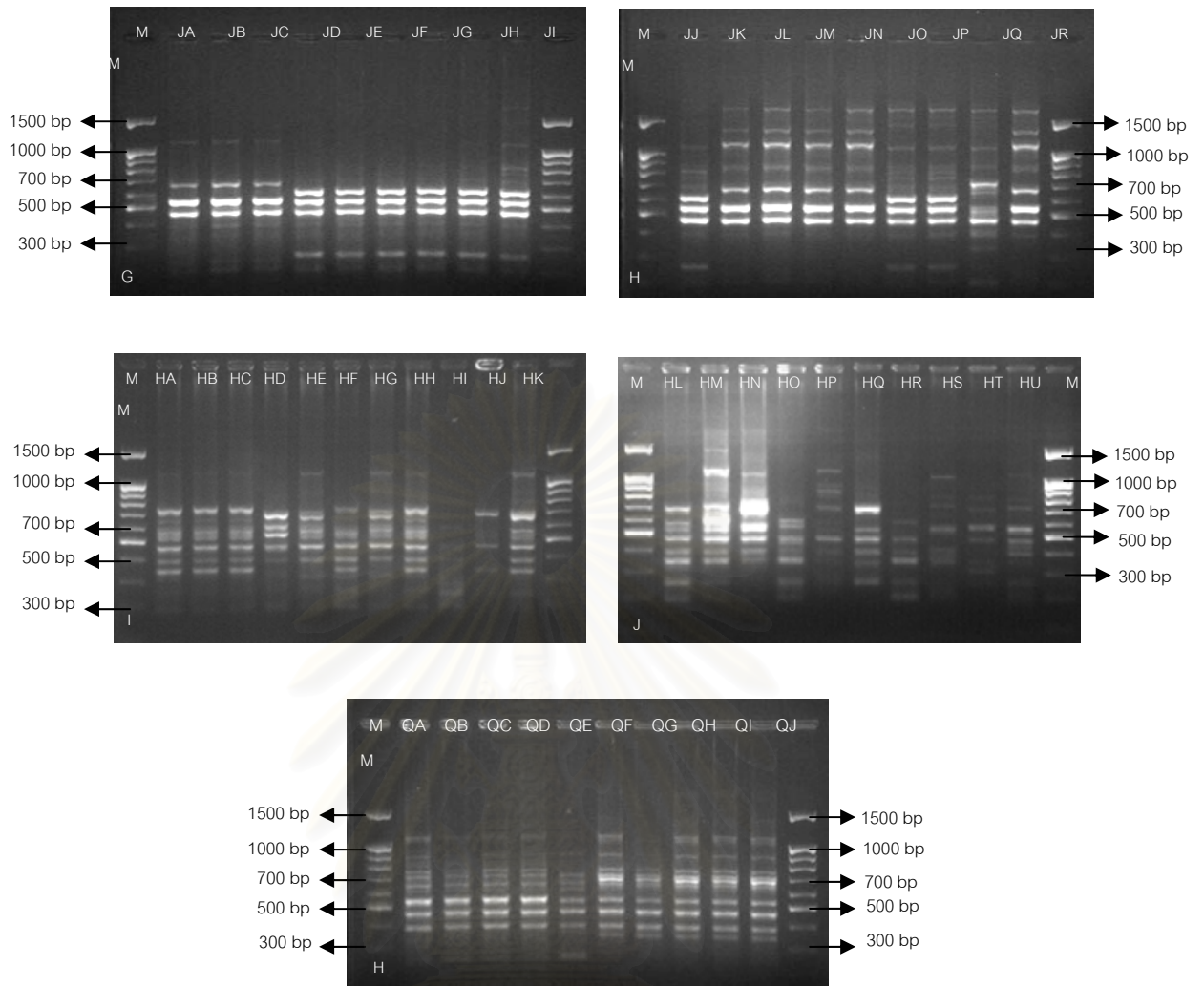
การศึกษาคือ ไพรเมอร์ 5 , 7 และ 8 (Frank และคณะ, 2001) เมื่อนำดีเอ็นเอของตัวอย่างทั้งหมด มาเพิ่มจำนวน (รูปที่ 4.3 – 4.21)

4.2.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT]

ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 แสดงดังรูปที่ 4.3-4.8 พบว่า สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 64 แถบ และสามารถแบ่งกลุ่มของเปล้าใหญ่ออกเป็น 72 กลุ่ม แสดงตารางที่ 4.1

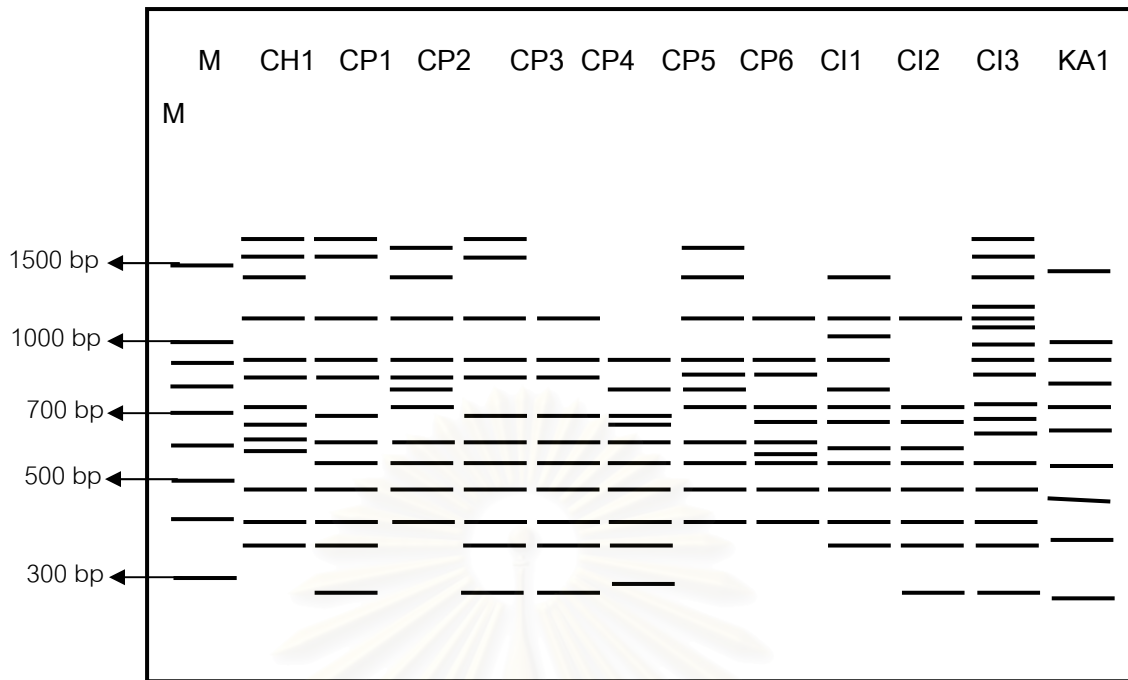


รูปที่ 4.3 แสดงแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] โดย M คือ 100 bp + 1.5kb ladder; A: ตัวอย่างที่ 1-11; B: ตัวอย่างที่ 12-22; C: ตัวอย่างที่ 23-33; D: ตัวอย่างที่ 34-44; E: ตัวอย่างที่ 45-55 และ F: ตัวอย่างที่ 56-66

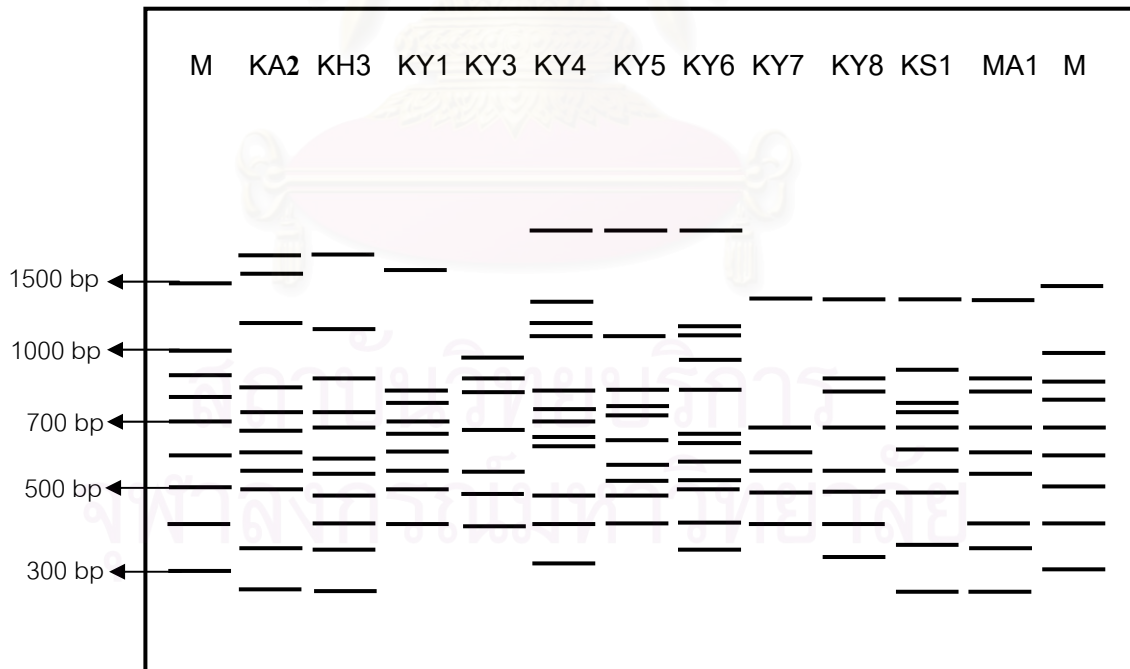


รูปที่ 4.3 (ต่อ) แสดงแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] โดย M คือ 100 bp + 1.5kb ladder; G: ตัวอย่างที่ 67-75; H: ตัวอย่างที่ 76-84; I: ตัวอย่างที่ 85-95; J: ตัวอย่างที่ 96-105 และ K: ตัวอย่างที่ 106-115

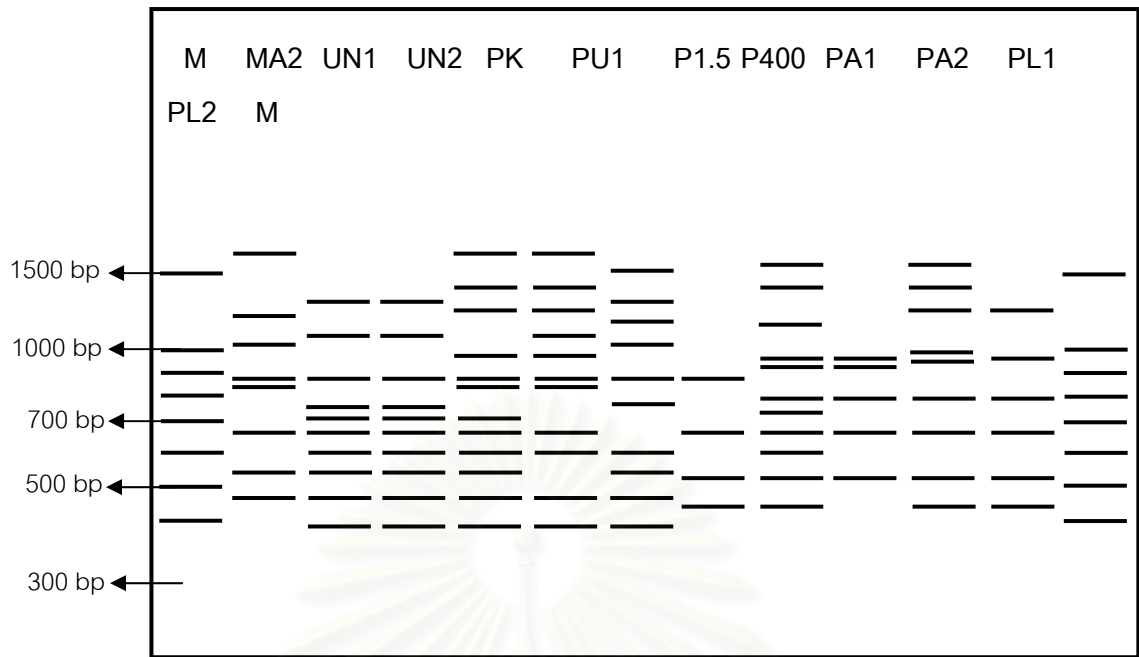
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



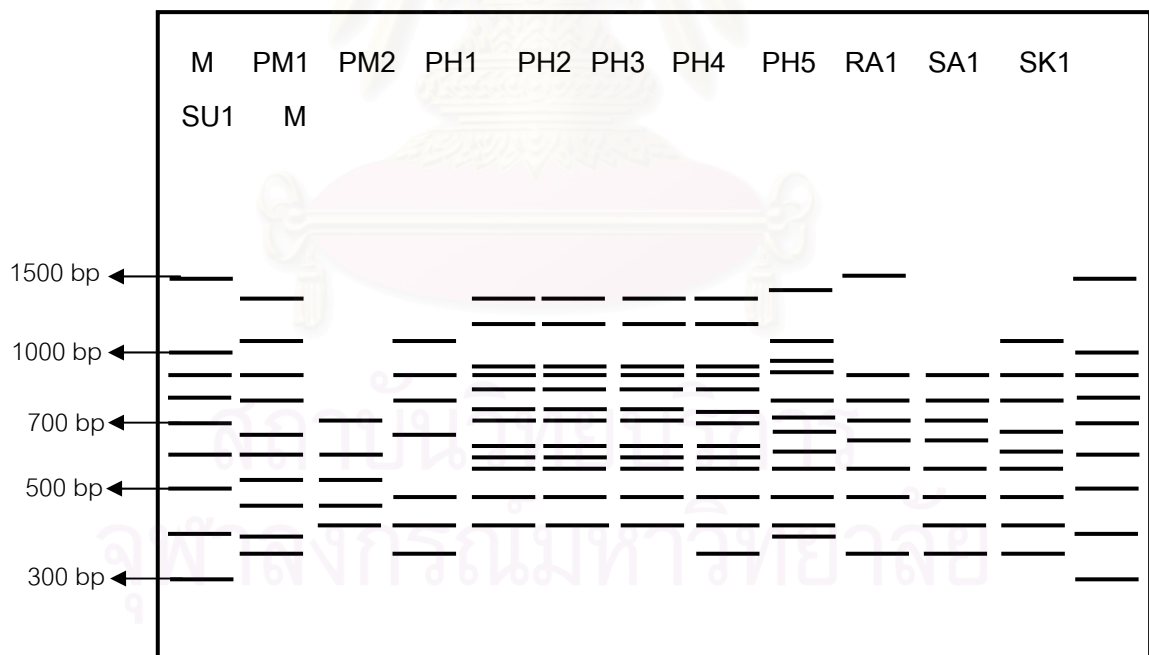
รูปที่ 4.3A แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปป้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] ตัวอย่างที่ 1-11



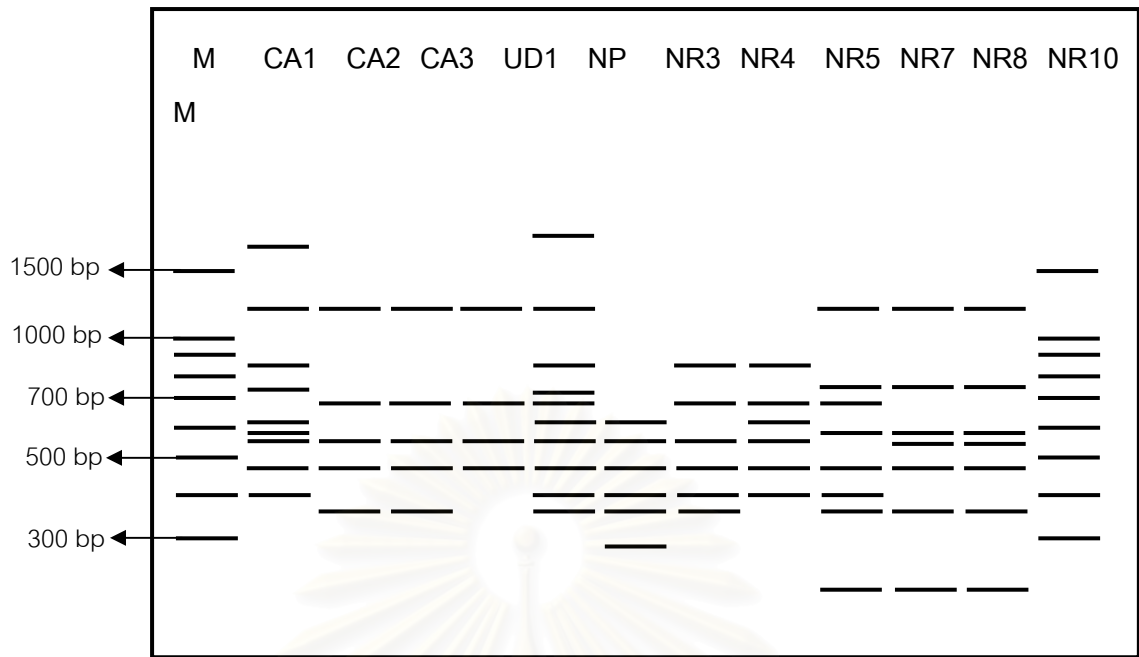
รูปที่ 4.3B แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปป้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] ตัวอย่างที่ 12-22



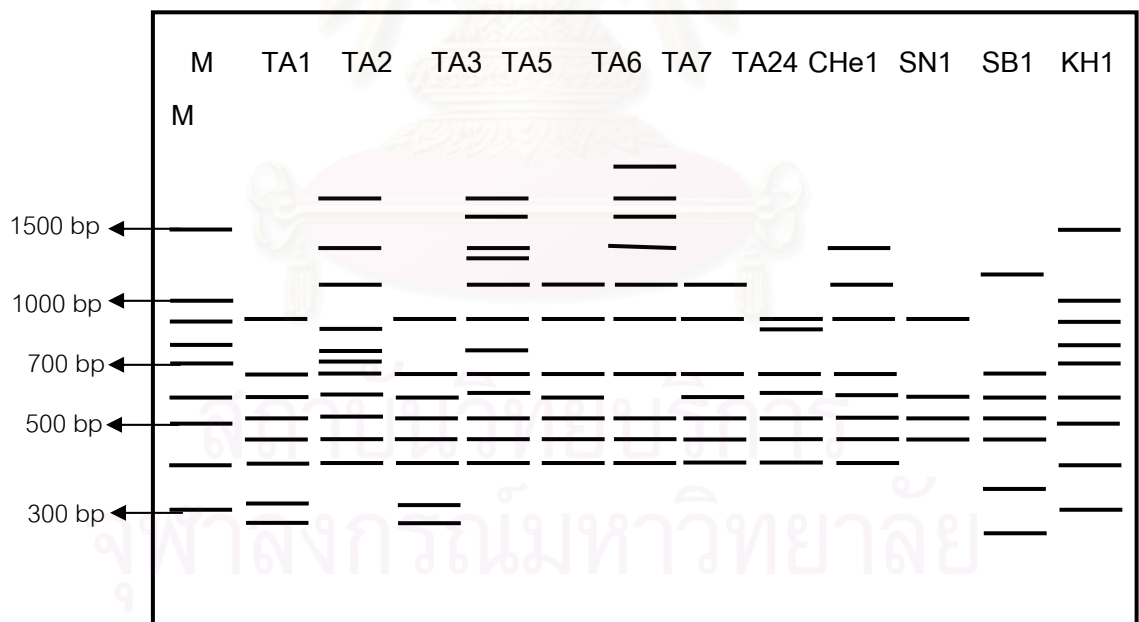
รูปที่ 4.3C แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] ตัวอย่างที่ 23-33



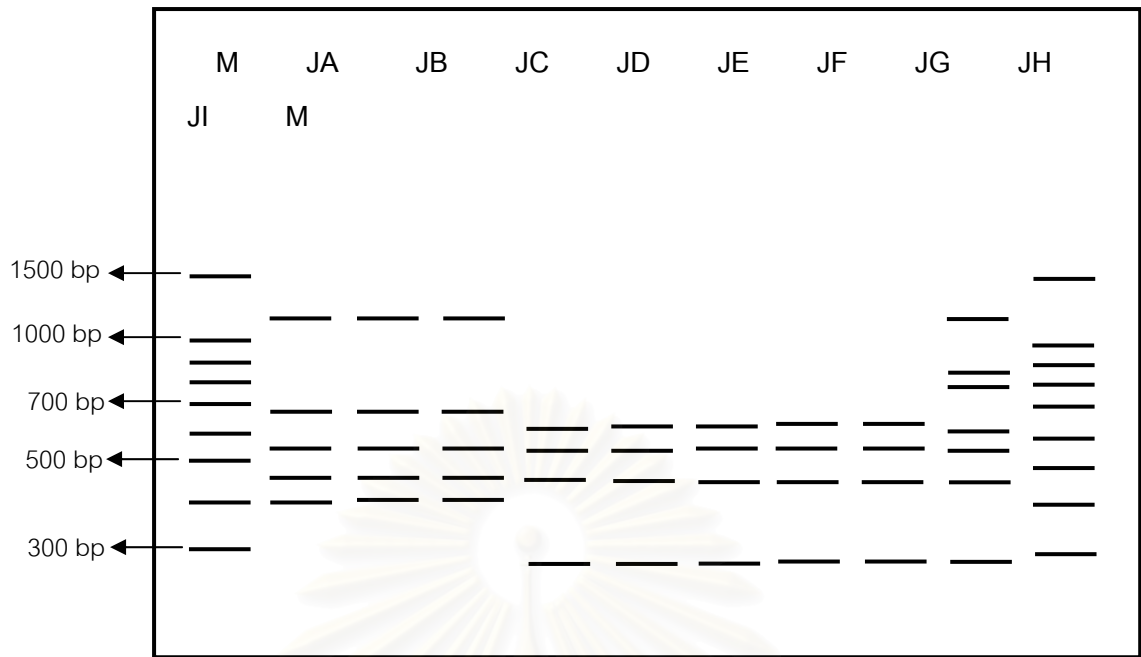
รูปที่ 4.3D แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] ตัวอย่างที่ 34-44



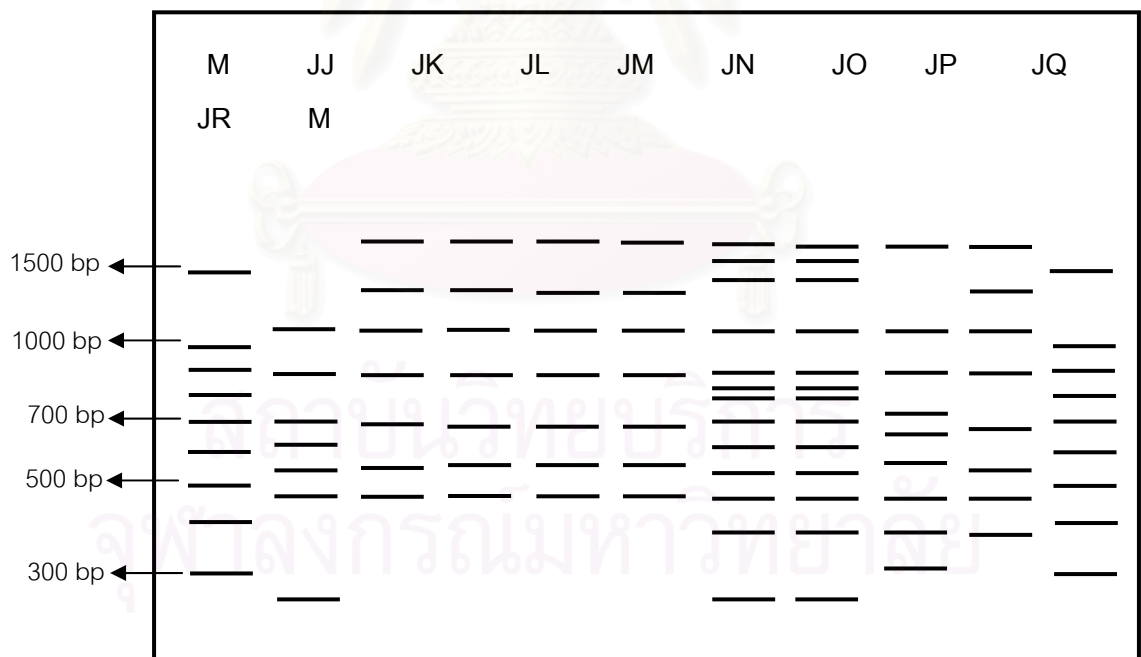
รูปที่ 4.3E แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] ตัวอย่างที่ 45-55



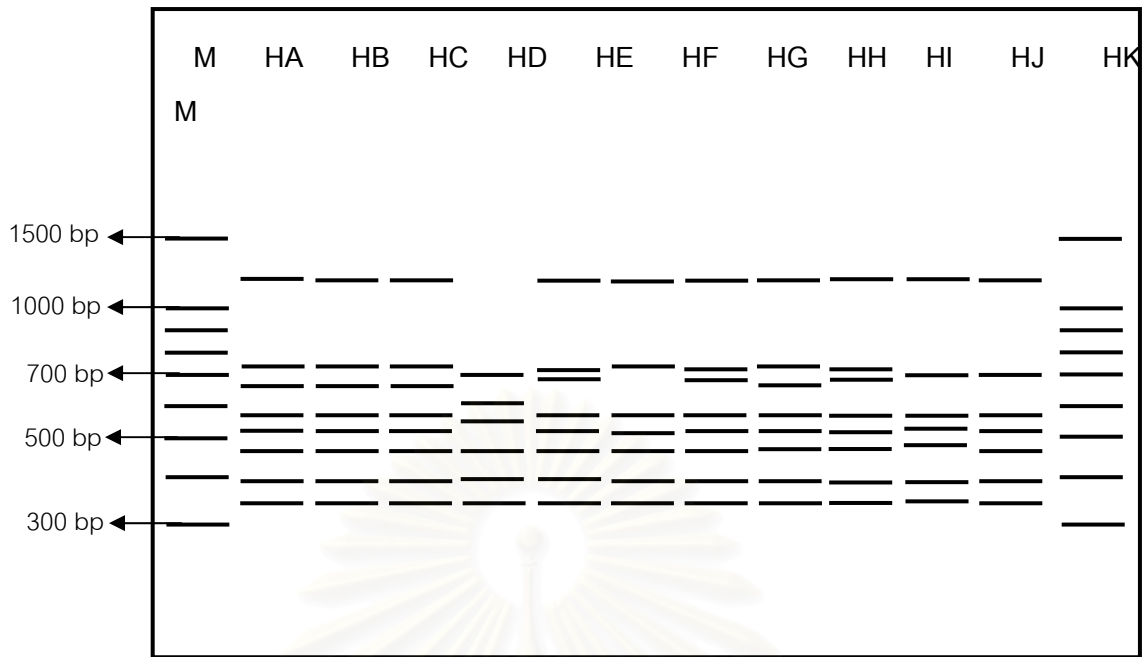
รูปที่ 4.3F แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] ตัวอย่างที่ 56-66



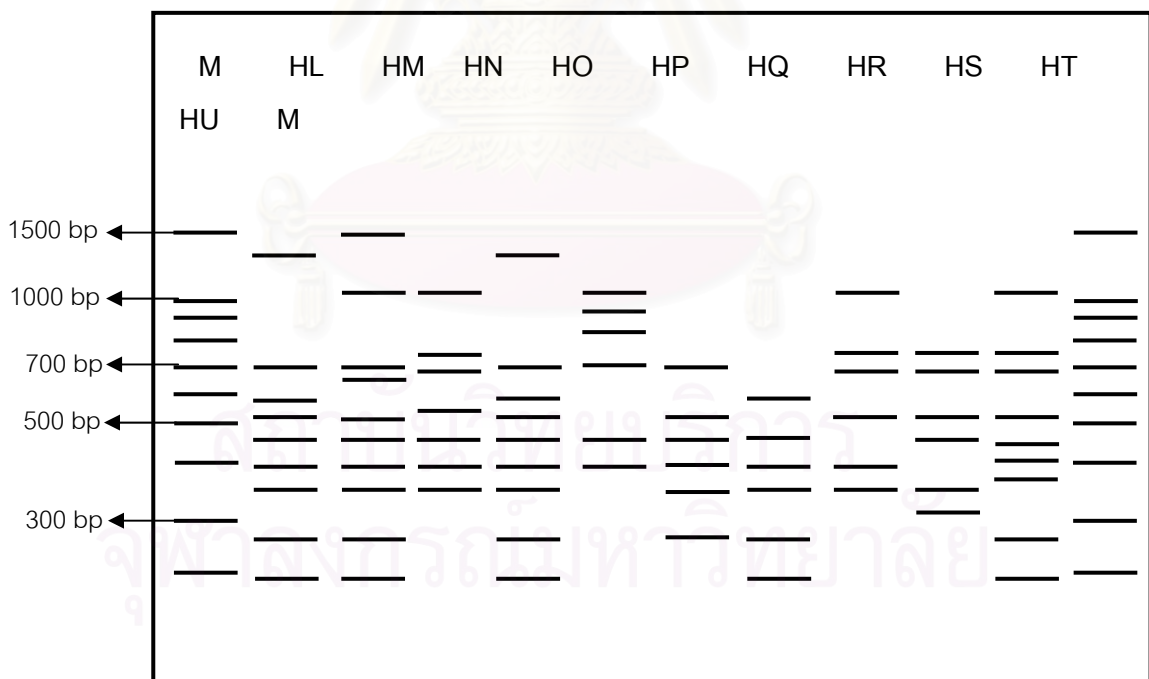
รูปที่ 4.3G แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] ตัวอย่างที่ 67-75



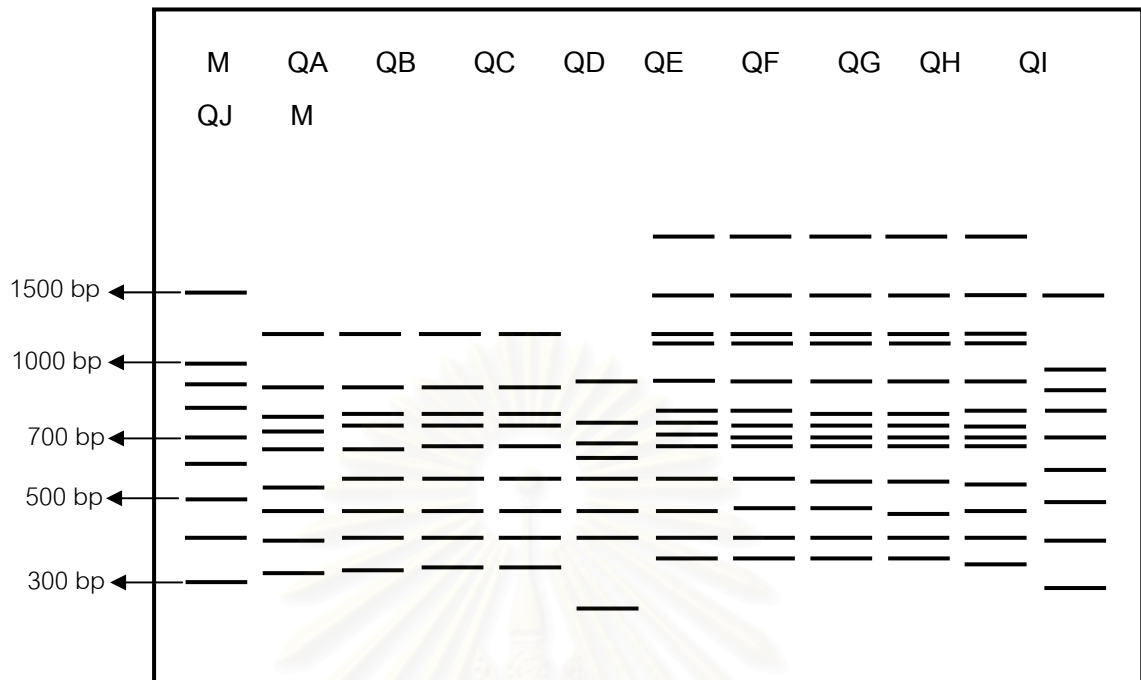
รูปที่ 4.3H แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] ตัวอย่างที่ 76-84



รูปที่ 4.3I แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] ตัวอย่างที่ 85-95



รูปที่ 4.3J แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] ตัวอย่างที่ 96-105

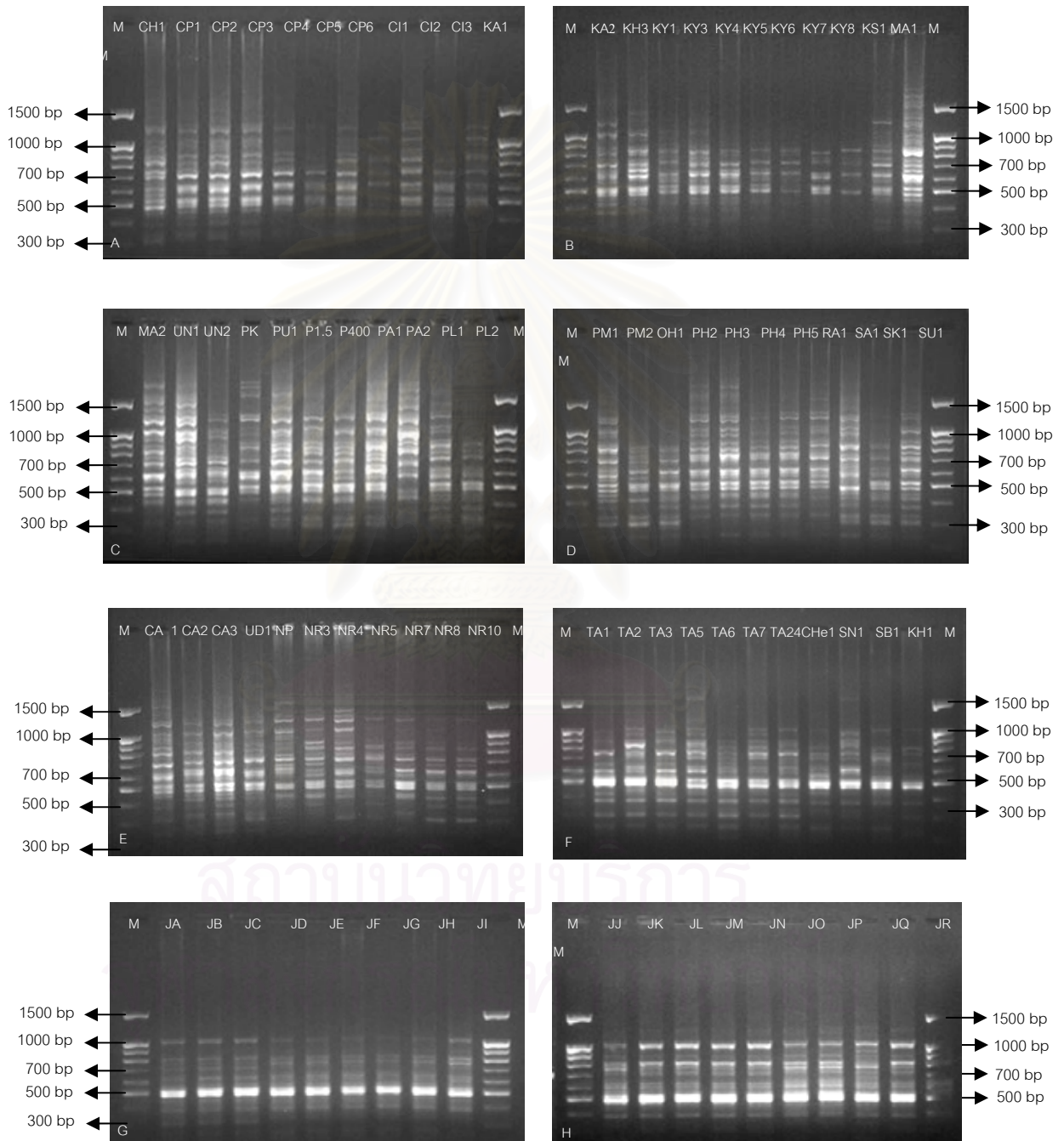


รูปที่ 4.3K แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปล่าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5
[A(GA)₇GT] ตัวอย่างที่ 106-115

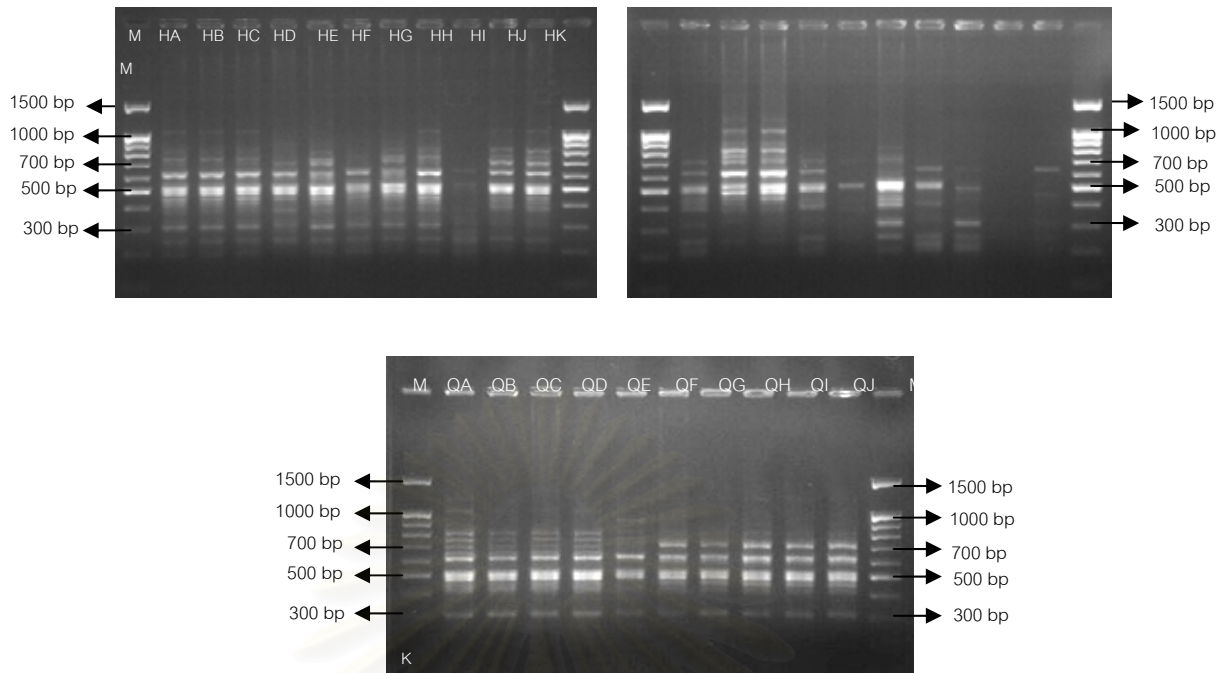
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไพรเมอร์ 7 [CRN₂(CTT)₂]

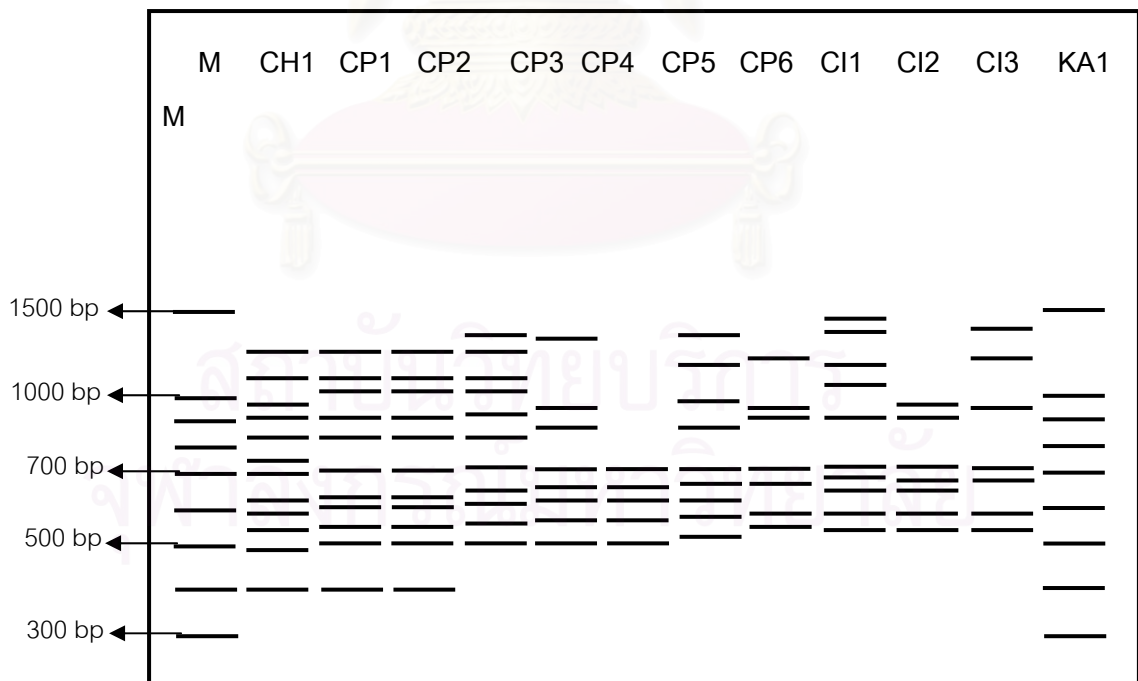
ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 แสดงดังรูปที่ 4.3-4.8 พบว่าสามารถสร้างแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 93 แถบ และสามารถแบ่งกลุ่มของเปล้าใหญ่ออกเป็น 75 กลุ่ม แสดงตารางที่ 4.2



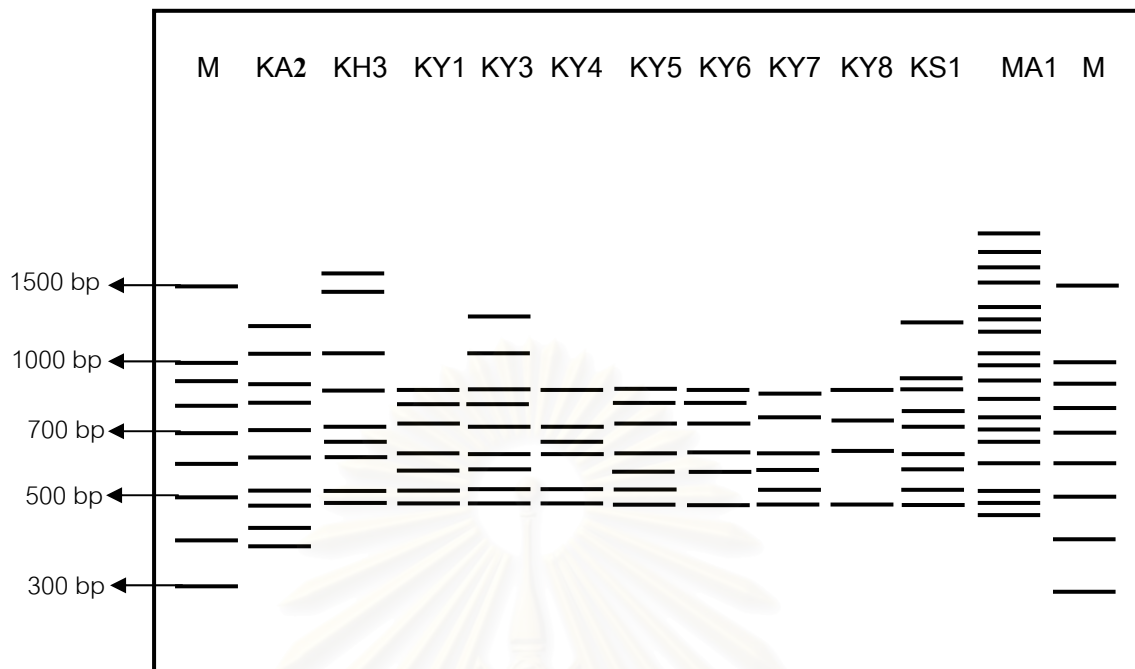
รูปที่ 4.4 แสดงแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 7 [CRN₂(CTT)₂] โดย M คือ 100 bp + 1.5kb ladder; A: ตัวอย่างที่ 1-11; B: ตัวอย่างที่ 12-22; C: ตัวอย่างที่ 23-33; D: ตัวอย่างที่ 34-44; E: ตัวอย่างที่ 45-55; F: ตัวอย่างที่ 56-66; G: ตัวอย่างที่ 67-75 และ H: ตัวอย่างที่ 76-84



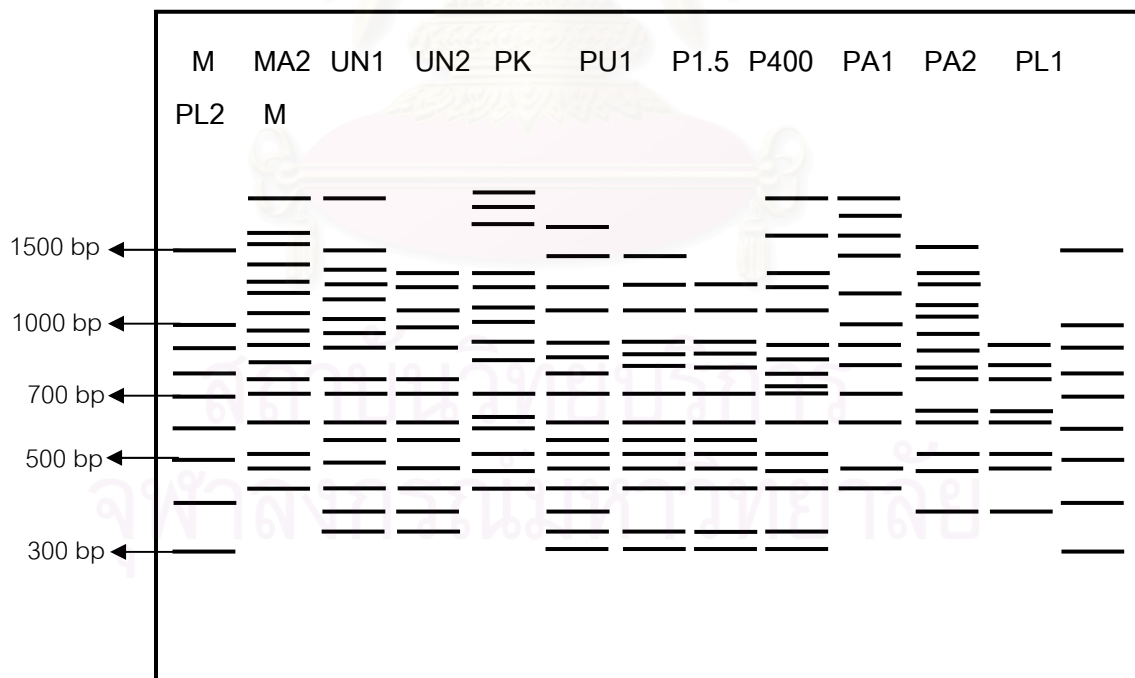
รูปที่ 4.4 (ต่อ) แสดงแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์7 [CRN₂(CTT)₂] โดย M คือ 100 bp + 1.5kb ladder; I: ตัวอย่างที่ 85-95; J: ตัวอย่างที่ 96-105 และ K: ตัวอย่างที่ 106-115



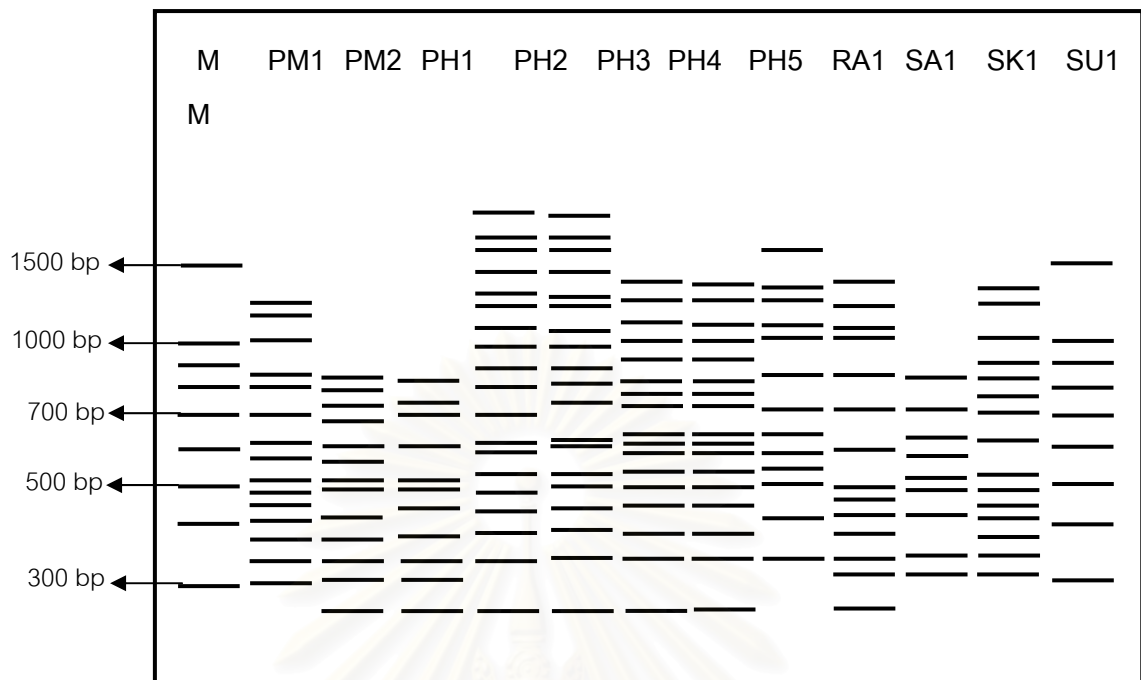
รูปที่ 4.4A แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์7 [CRN₂(CTT)₂] ตัวอย่างที่ 1-11



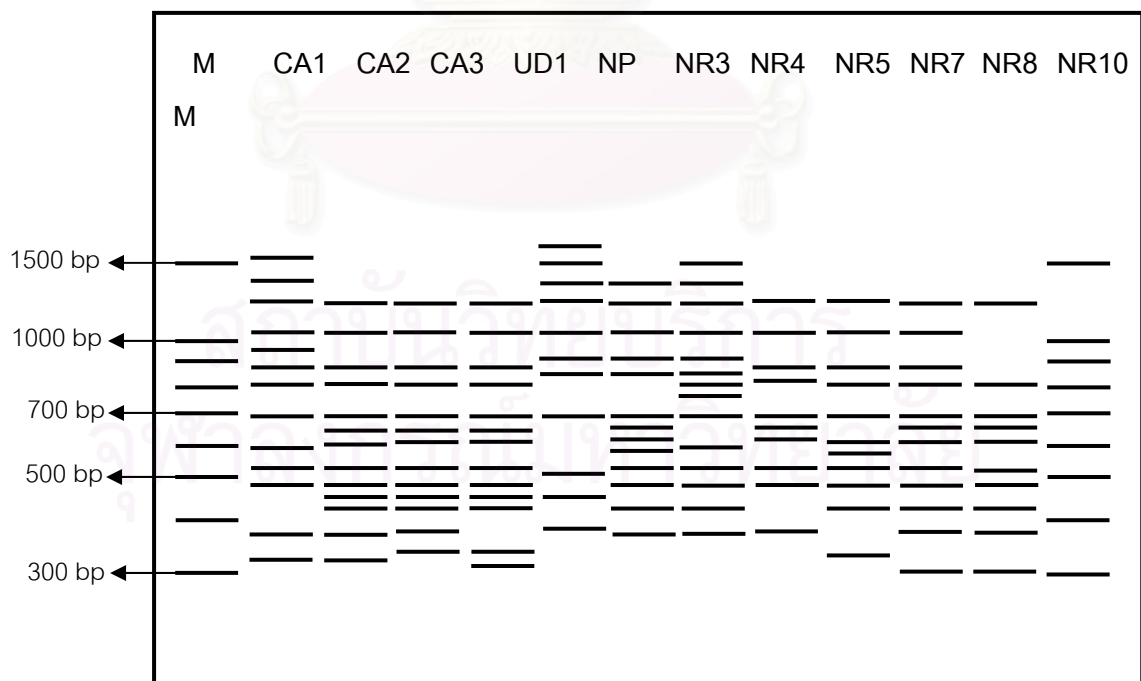
รูปที่ 4.4B แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 7
 [CRN₂(CTT)₂] ตัวอย่างที่ 12-22



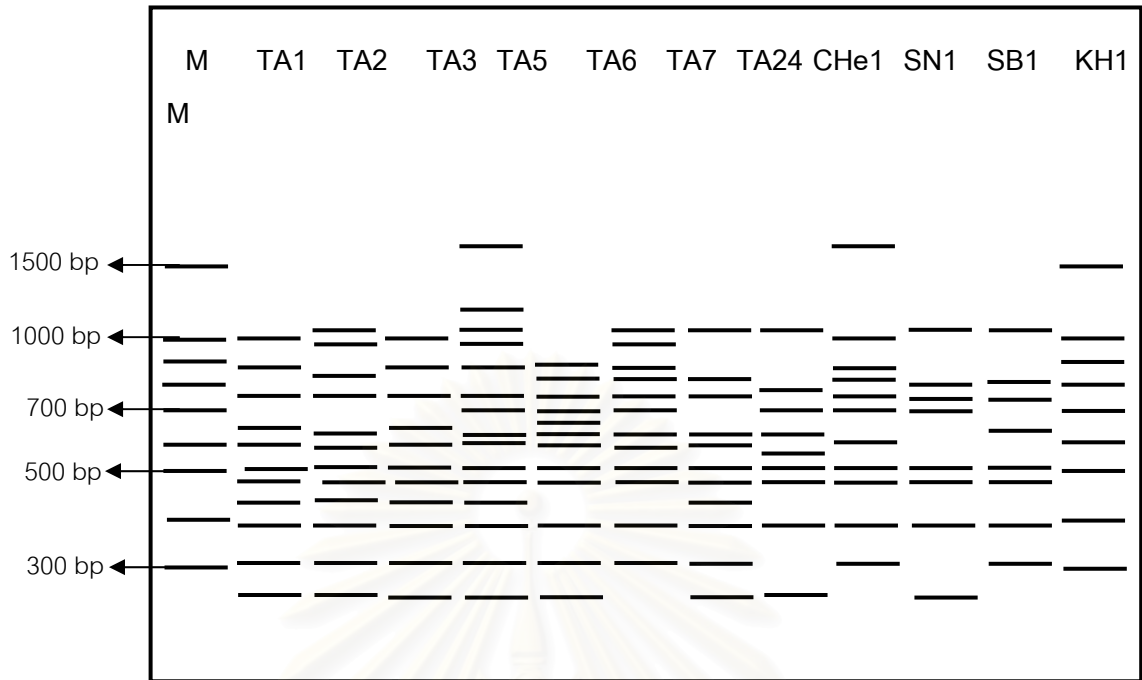
รูปที่ 4.4C แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 7
 [CRN₂(CTT)₂] ตัวอย่างที่ 23-33



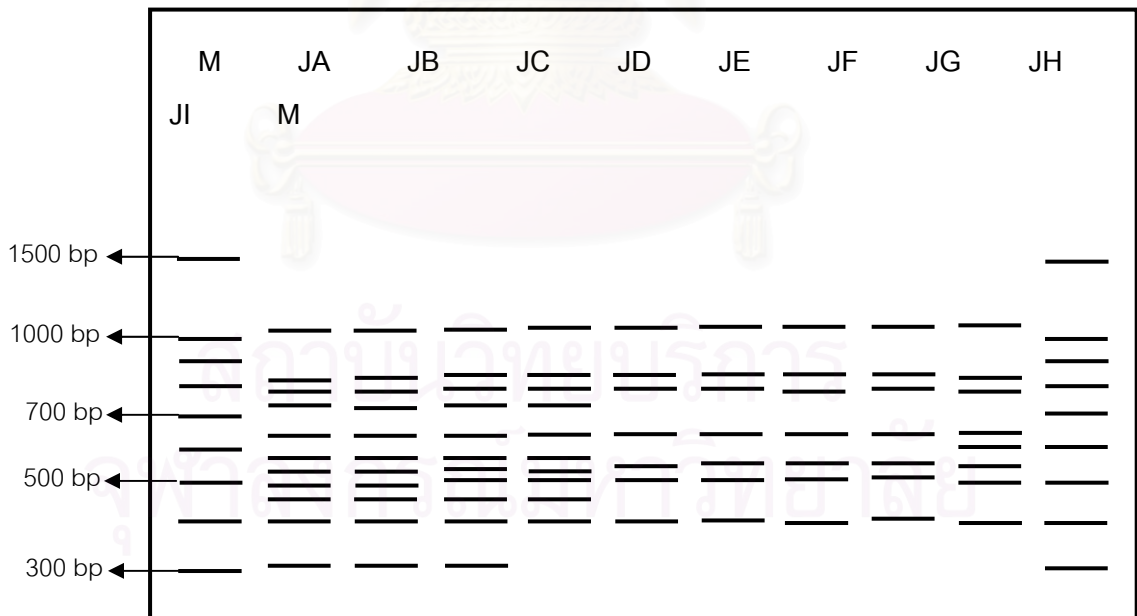
รูปที่ 4.4D แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์7
[CRN₂(CTT)₂] ตัวอย่างที่ 34-44



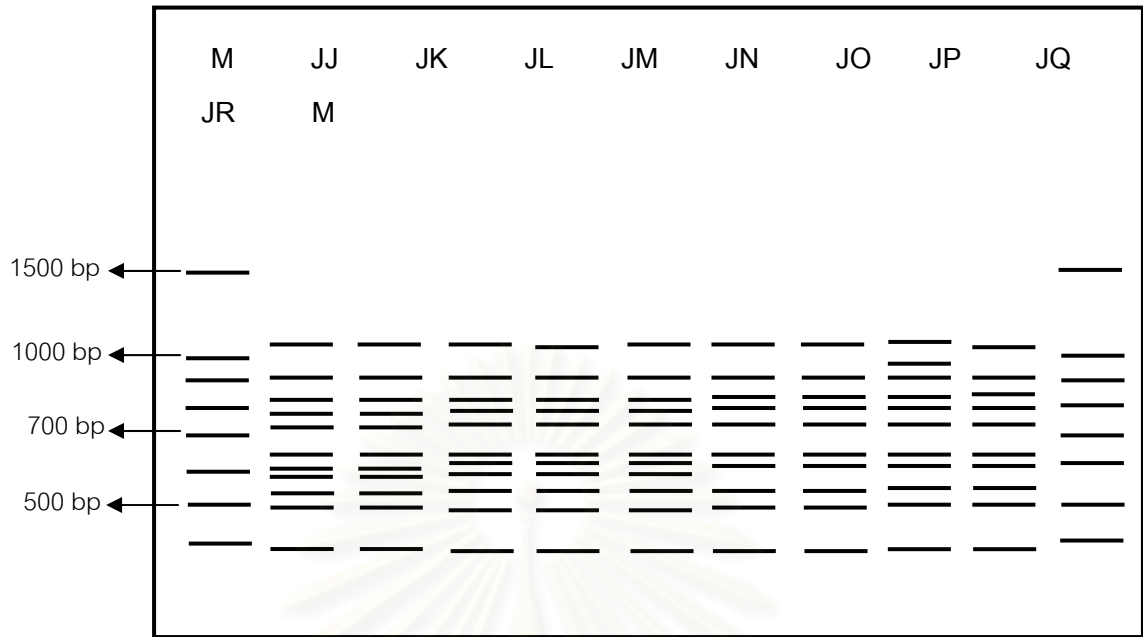
รูปที่ 4.4E แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์7
[CRN₂(CTT)₂] ตัวอย่างที่ 45-55



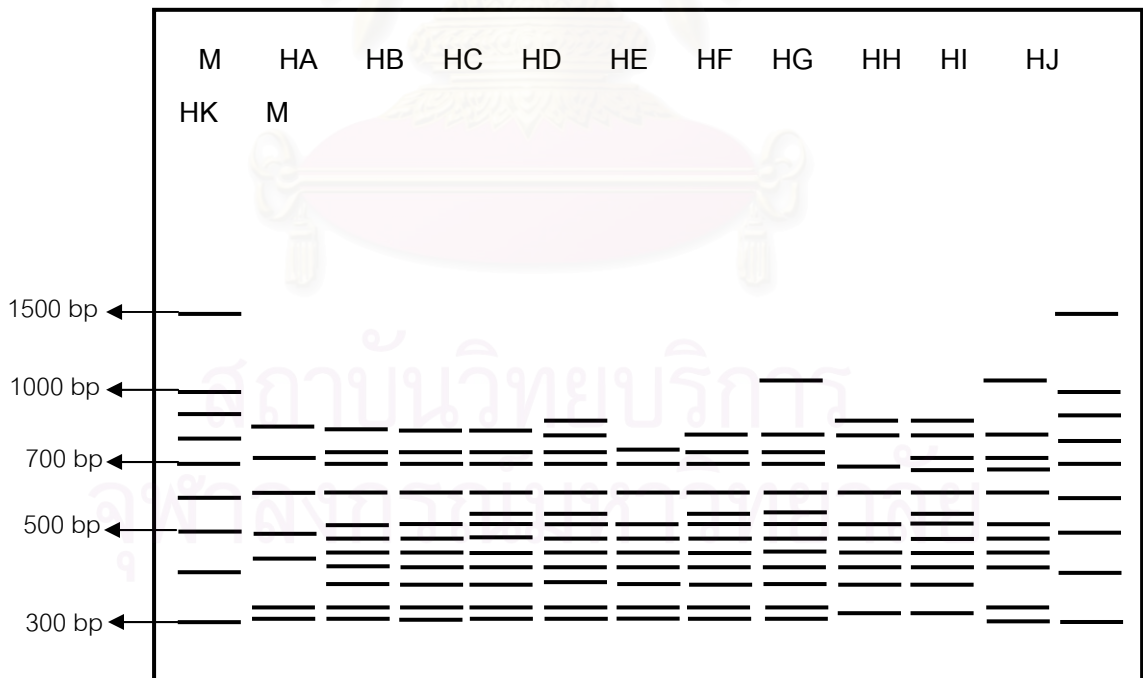
รูปที่ 4.4F แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปป้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์7
 [CRN₂(CTT)₂] ตัวอย่างที่ 56-66



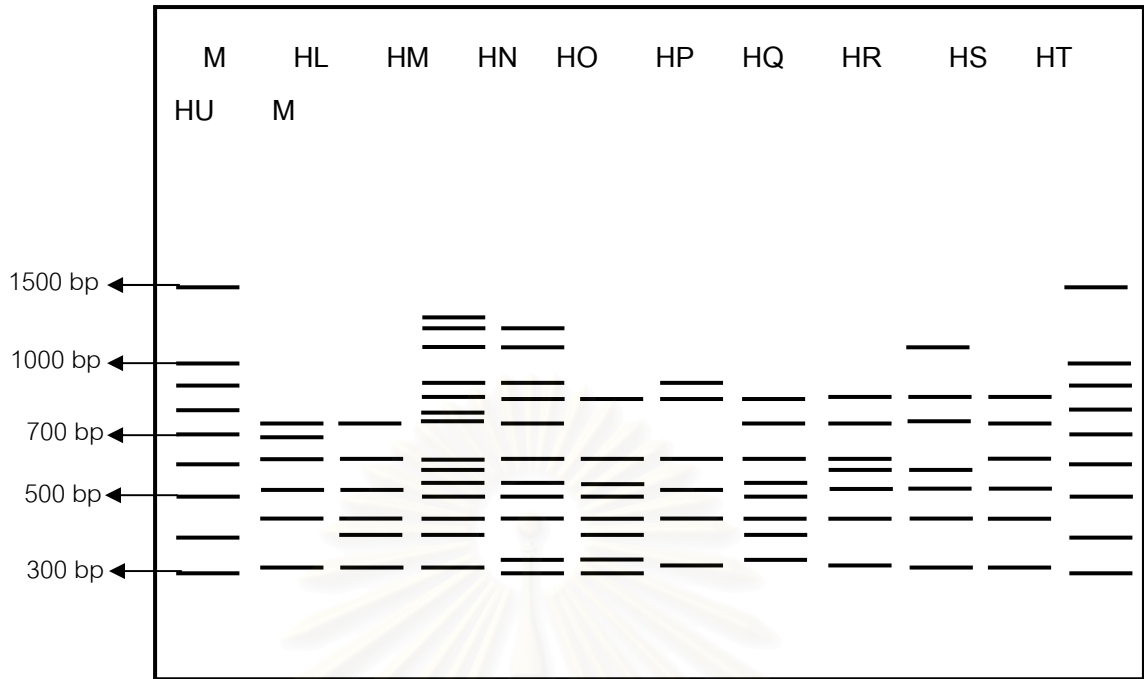
รูปที่ 4.4G แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปป้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์7
 [CRN₂(CTT)₂] ตัวอย่างที่ 67-75



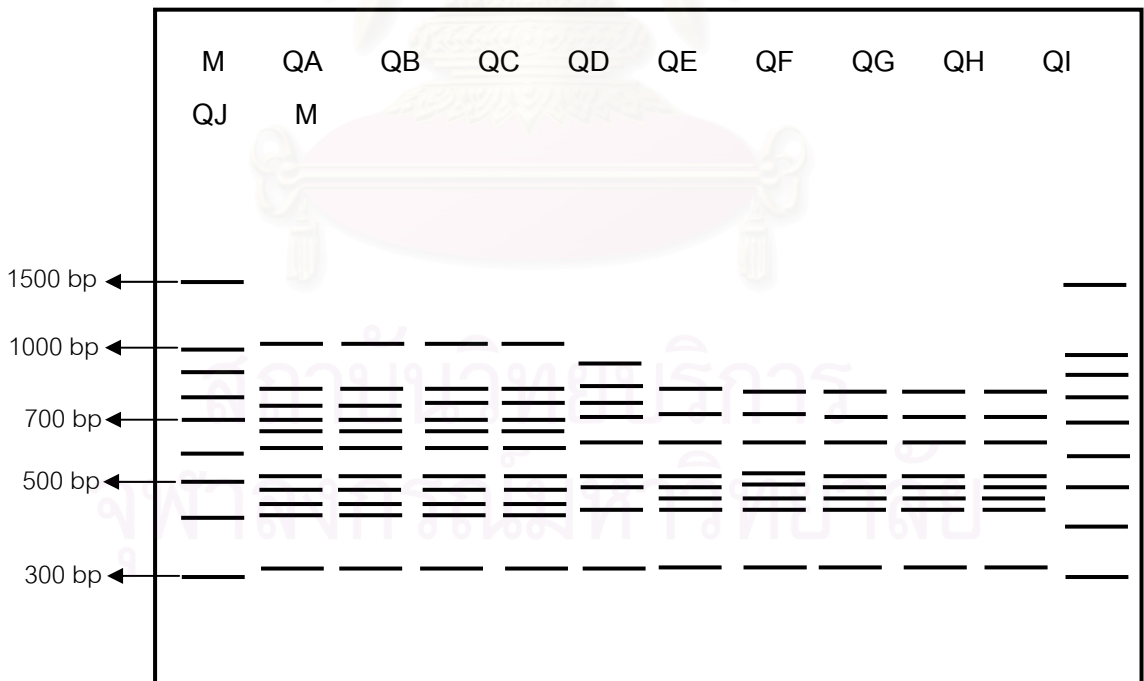
รูปที่ 4.4H แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 7
 [CRN₂(CTT)₂] ตัวอย่างที่ 76-84



รูปที่ 4.4I แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 7
 [CRN₂(CTT)₂] ตัวอย่างที่ 85-95



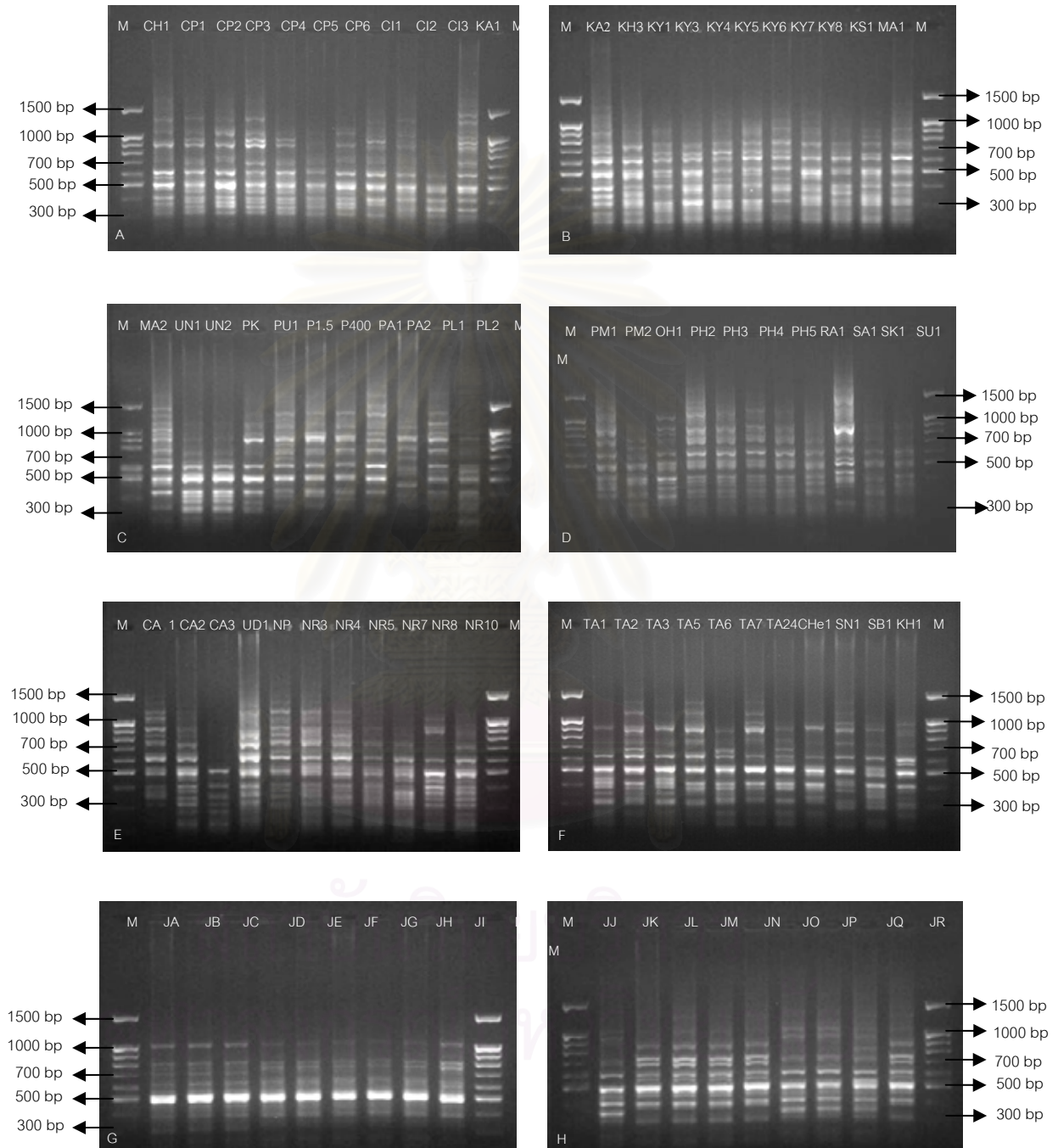
รูปที่ 4.4J แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปป้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 7
 [CRN₂(CTT)₂] ตัวอย่างที่ 96-105



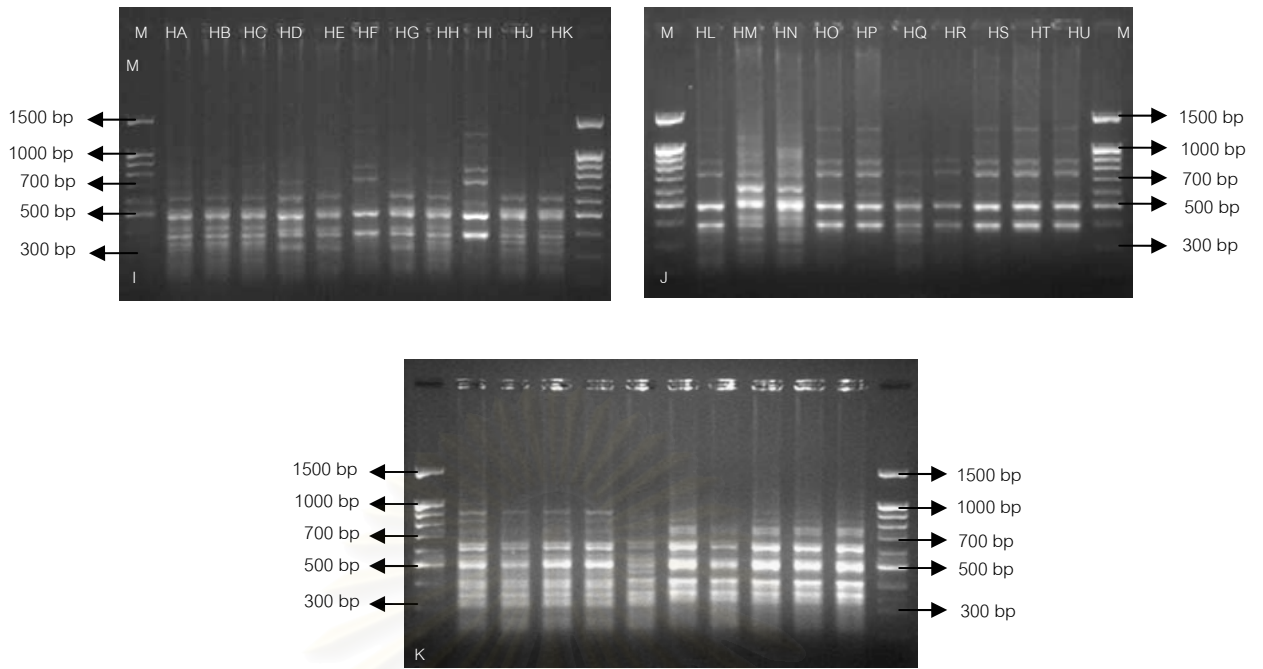
รูปที่ 4.4K แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปป้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 7
 [CRN₂(CTT)₂] ตัวอย่างที่ 106-115

ไพรมเมอร์ 8

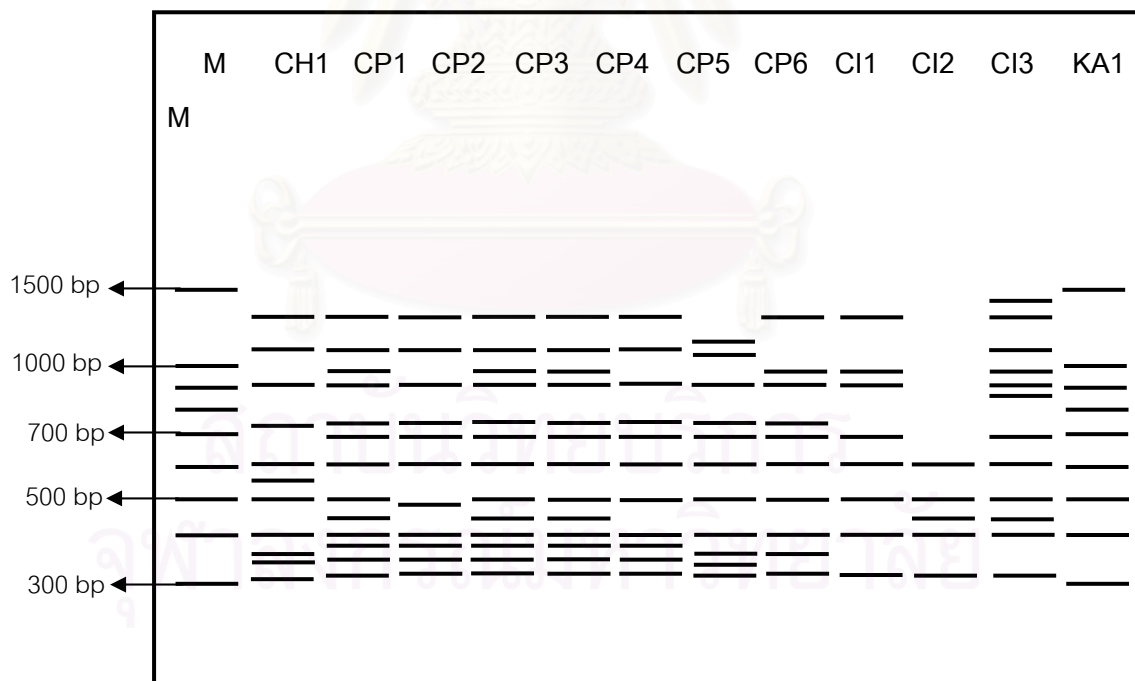
ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรมเมอร์ 8 แสดงดังรูปที่ 4.3-4.8 พบว่าสามารถสร้างแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 59 แถบ และสามารถแบ่งกลุ่มของเปล้าใหญ่ออกเป็น 69 กลุ่ม แสดงตารางที่ 4.3



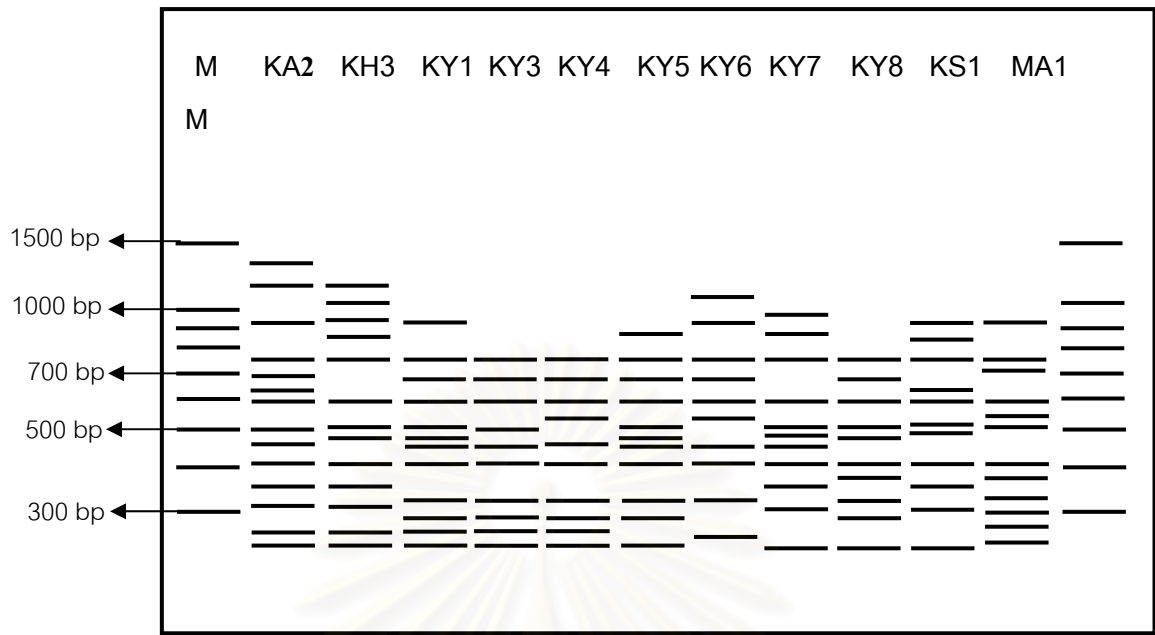
รูปที่ 4.5 แสดงแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่โดยใช้ไพรมเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] โดย M คือ 100 bp + 1.5kb ladder; A: ตัวอย่างที่ 1-11; B: ตัวอย่างที่ 12-22; C: ตัวอย่างที่ 23-33; D: ตัวอย่างที่ 34-44; E: ตัวอย่างที่ 45-55; F: ตัวอย่างที่ 56-66; G: ตัวอย่างที่ 67-75 และ H: ตัวอย่างที่ 76-84



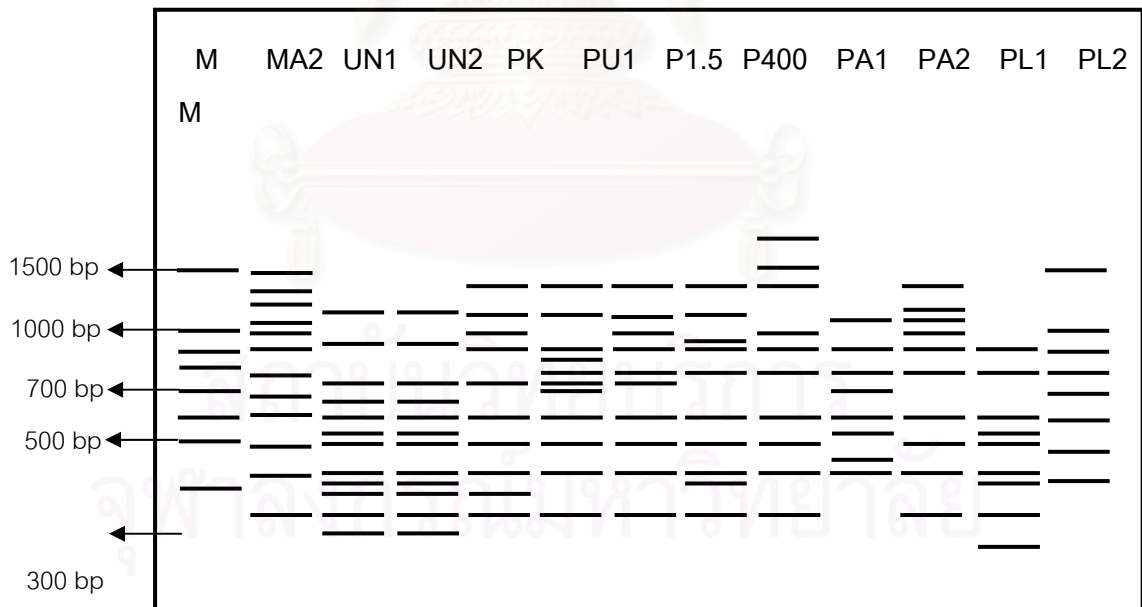
รูปที่ 4.5 (ต่อ) แสดงแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่โดยใช้ไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] โดย M คือ 100 bp + 1.5kb ladder; I: ตัวอย่างที่ 85-95; J: ตัวอย่างที่ 96-105 และ K: ตัวอย่างที่ 106-115



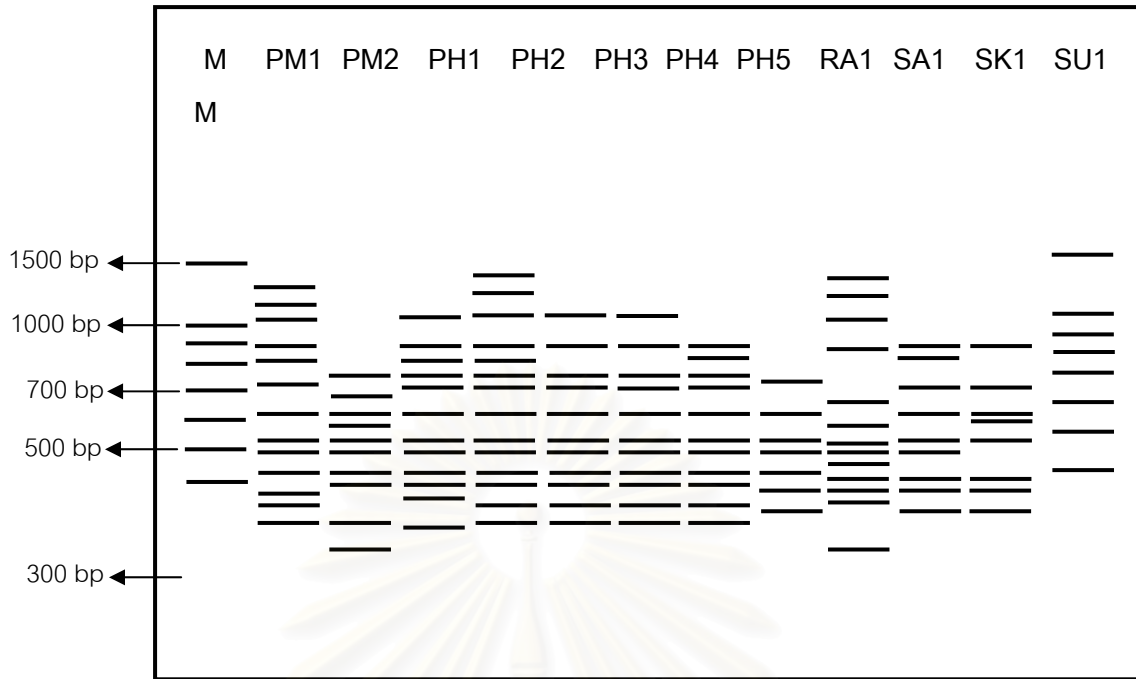
รูปที่ 4.5A แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] ตัวอย่างที่ 1-11



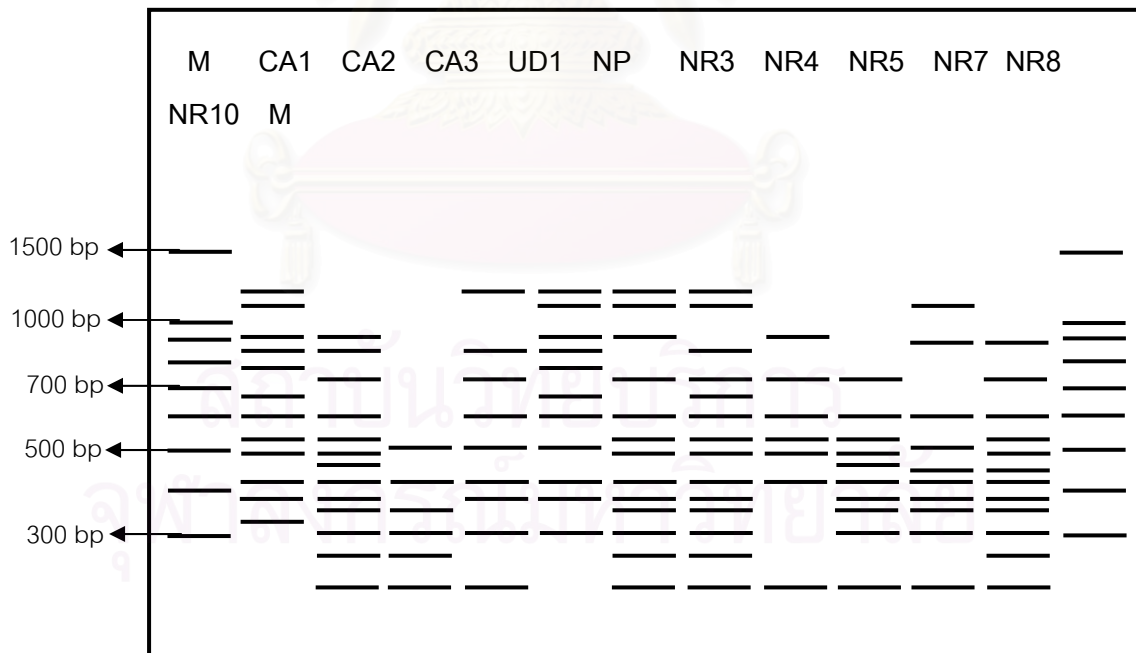
รูปที่ 4.5B แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 8
[BSC(GA)₈] ตัวอย่างที่ 12-22



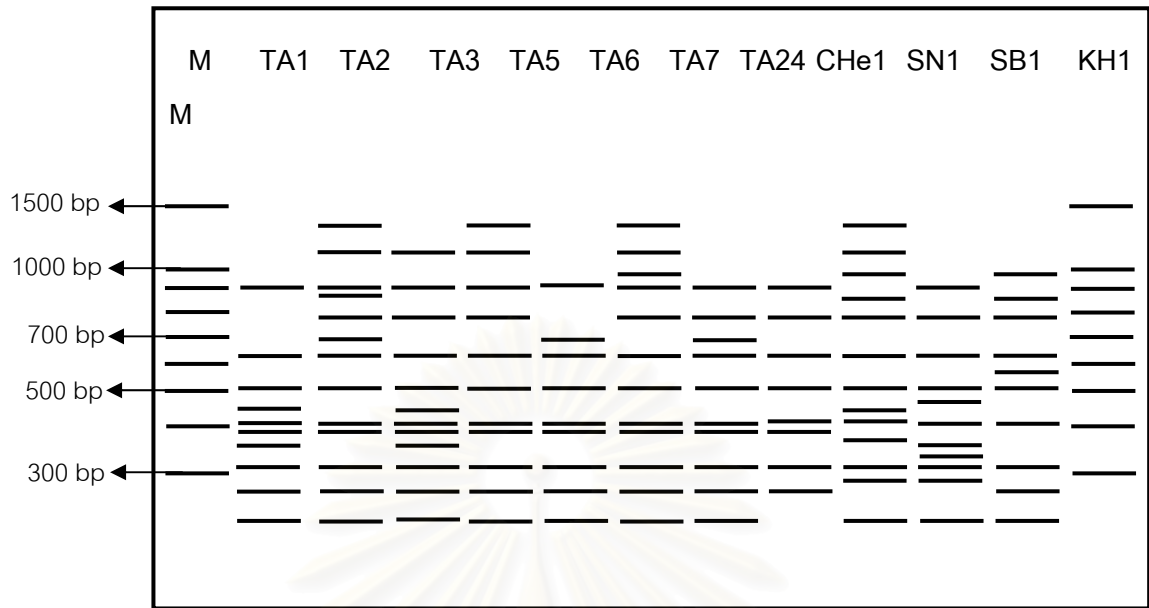
รูปที่ 4.5C แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 8
[BSC(GA)₈] ตัวอย่างที่ 23-33



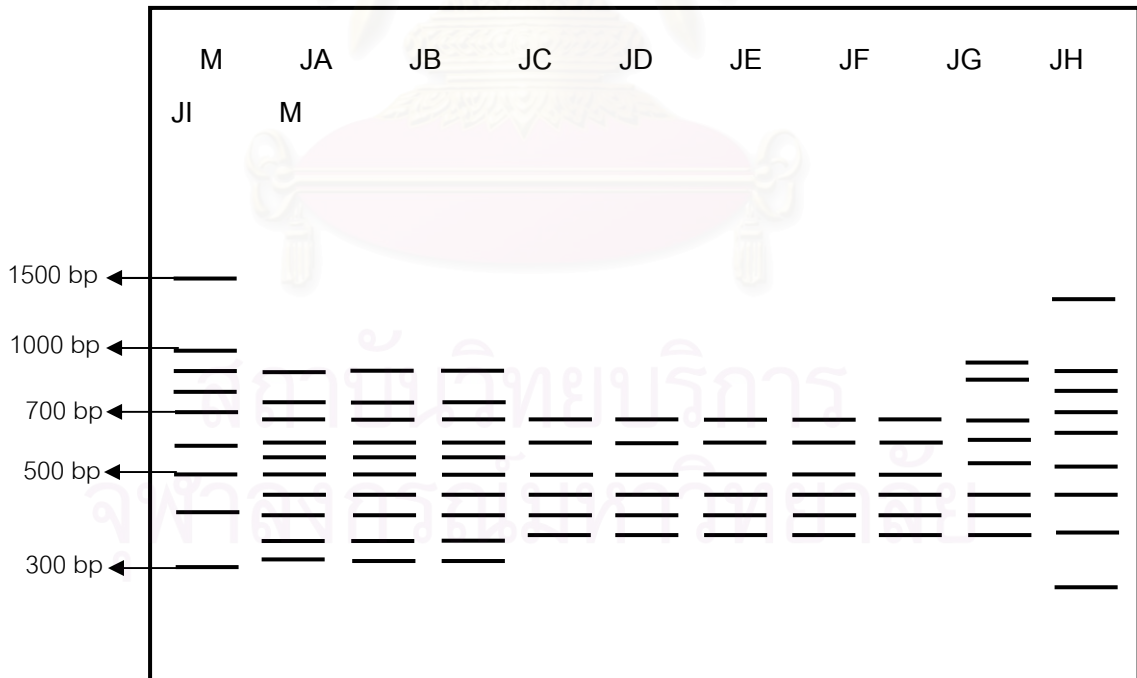
รูปที่ 4.5D แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] ตัวอย่างที่ 34-44



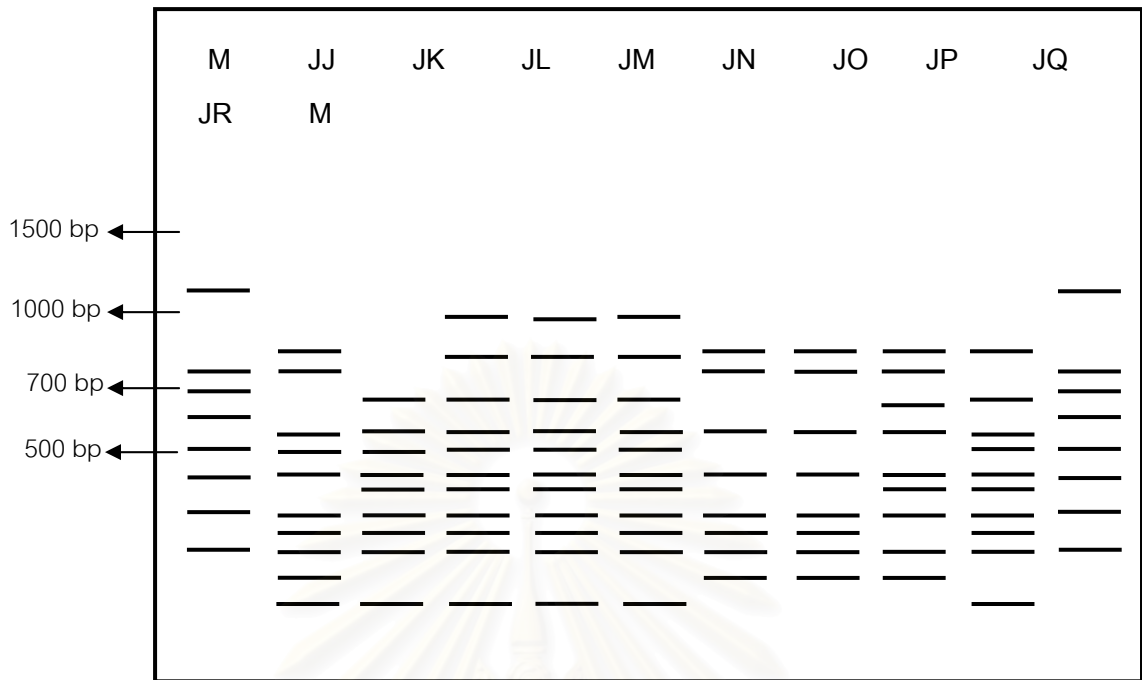
รูปที่ 4.5E แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] ตัวอย่างที่ 45-55



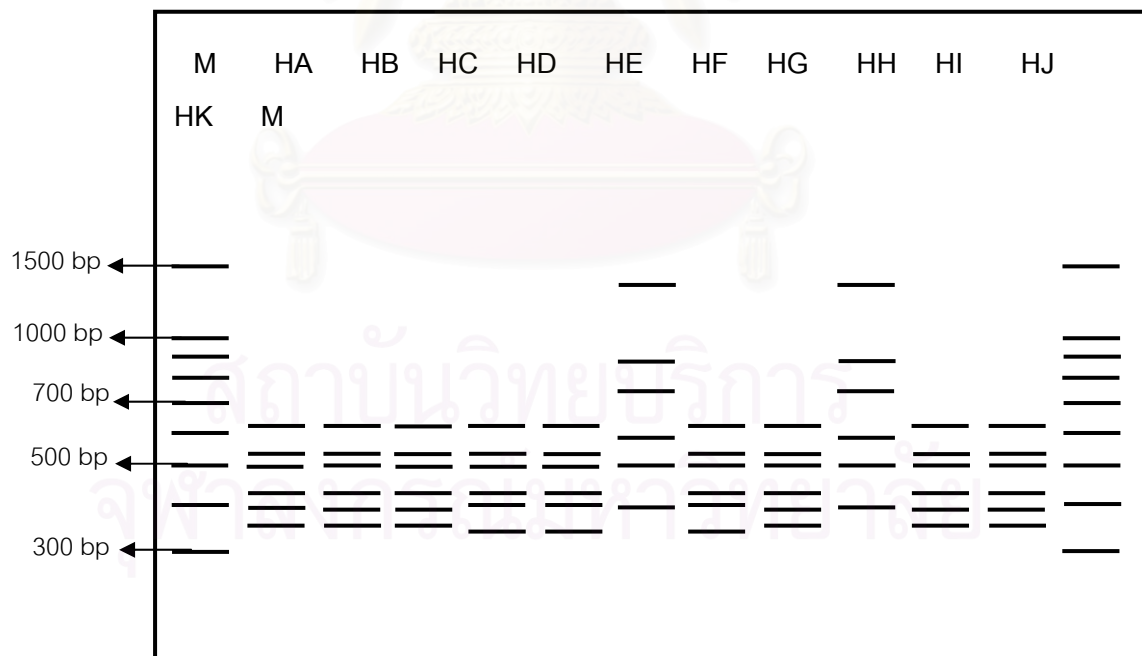
รูปที่ 4.5F แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] ตัวอย่างที่ 56-66



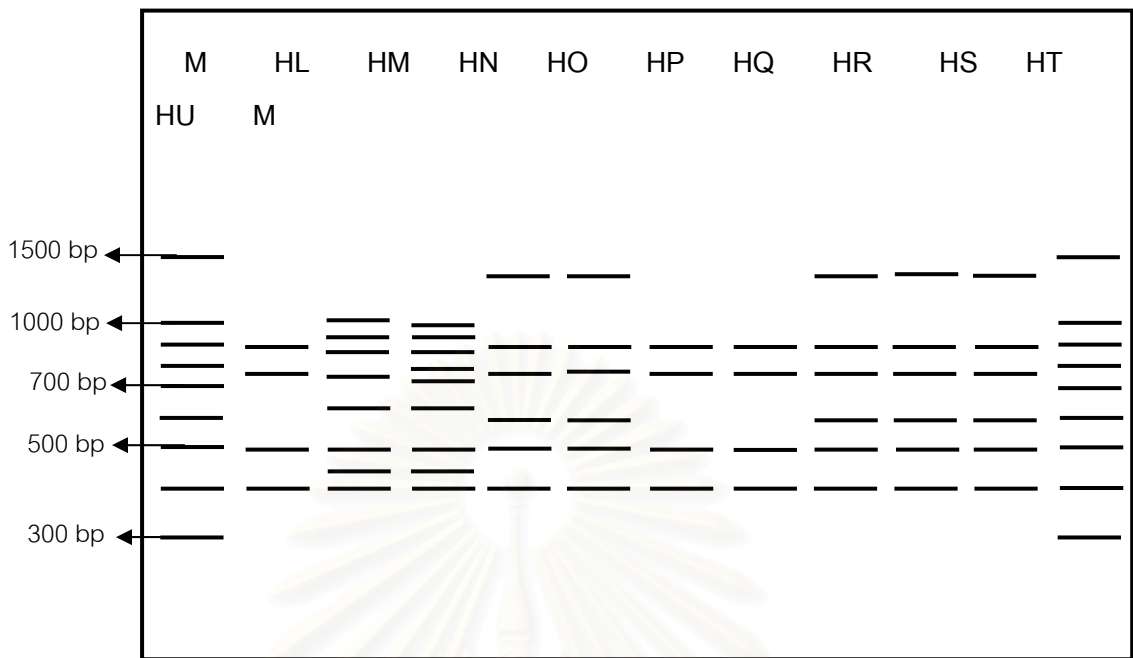
รูปที่ 4.5G แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] ตัวอย่างที่ 67-75



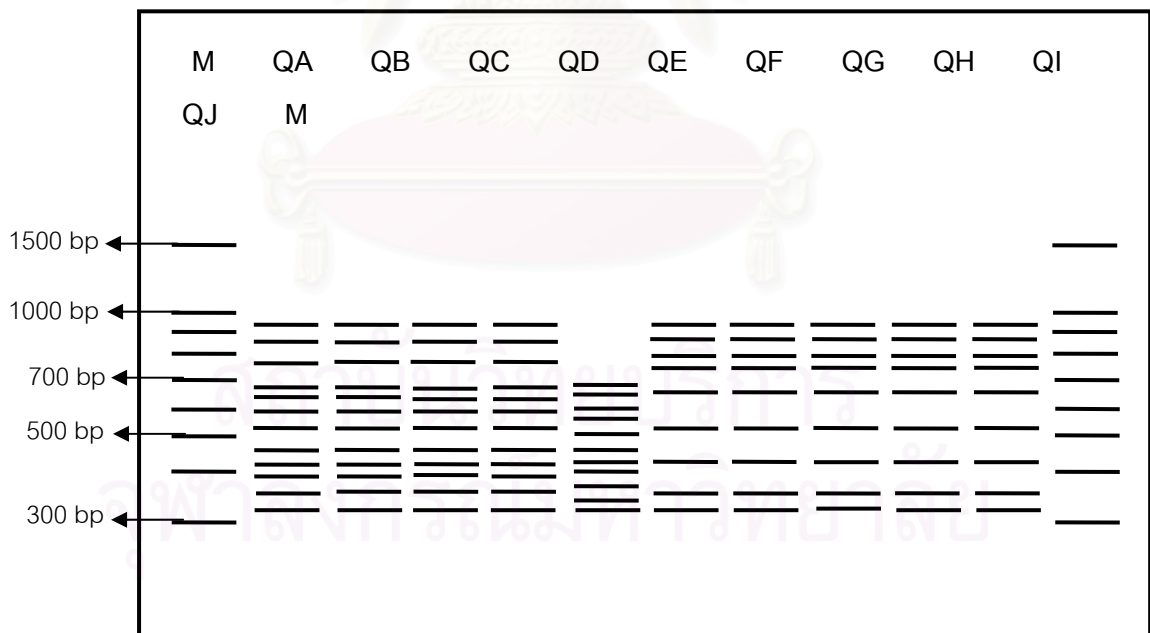
รูปที่ 4.5H แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 8
 [BSC(GA)₈] ตัวอย่างที่ 76-84



รูปที่ 4.5I แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 8
 [BSC(GA)₈] ตัวอย่างที่ 85-95



รูปที่ 4.5J แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์8
[BSC(GA)₈] ตัวอย่างที่ 96-105

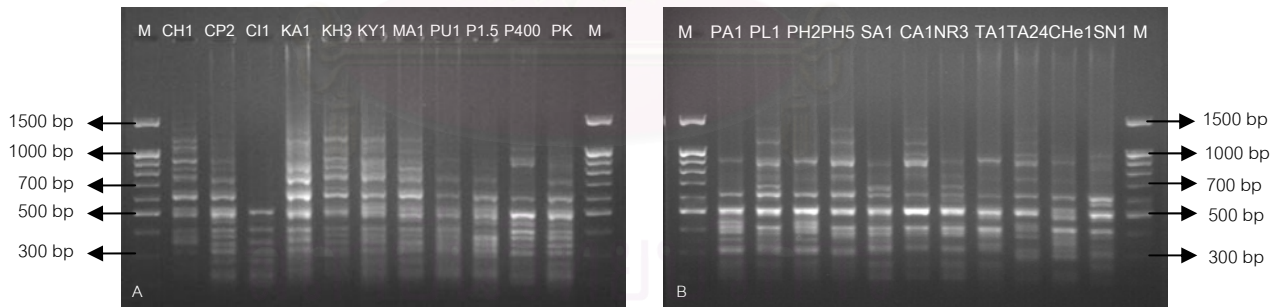


รูปที่ 4.5K แสดงแผนภาพผลแถบดีเอ็นเอเปลา้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์8
[BSC(GA)₈] ตัวอย่างที่ 96-115

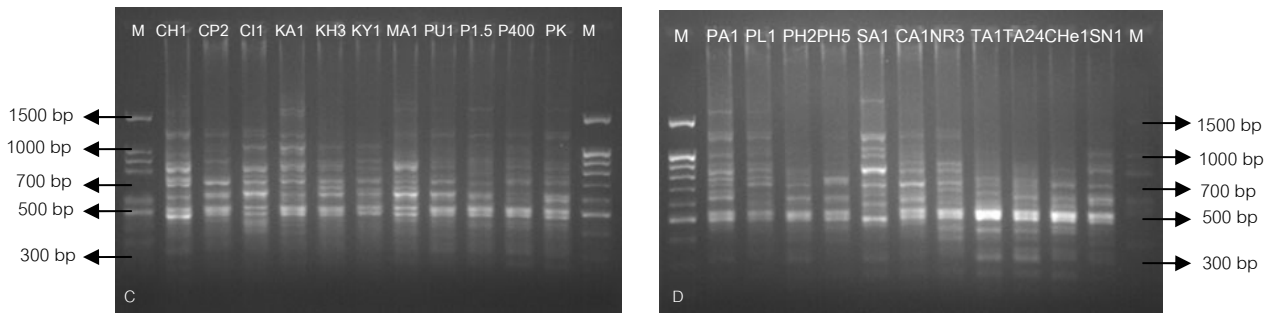
4.2.3 ทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

ผลการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย โดยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ และใช้เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิดคือ ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] , ไพรเมอร์ 7 [CRN₂(CTT)₂] และ ไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] โดยใช้ตัวแทนของกลุ่มตัวอย่างบางกลุ่มมาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้ง ภายใต้สภาวะพีซีอาร์และอิเล็กโตรโฟรีซิสเดิม (รูปที่ 4.21, 4.22 และ 4.2) โดยใช้ 22 ตัวอย่างได้แก่

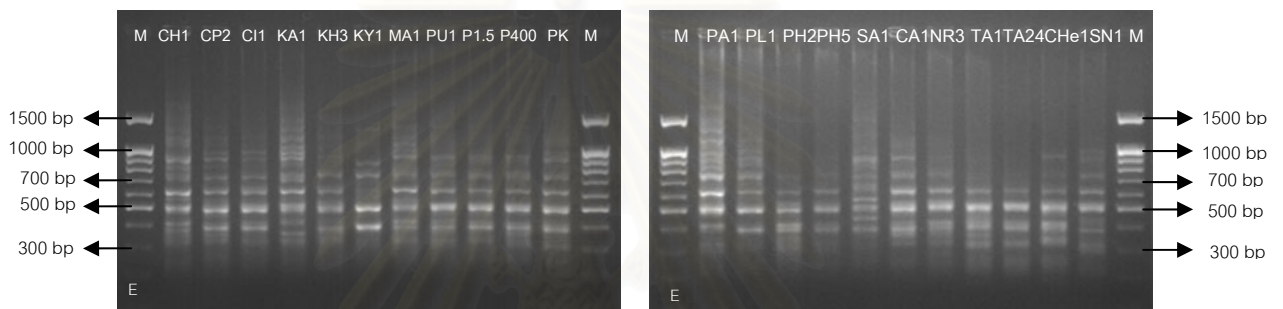
1 = CH1	12 = PA1
2 = CP2	13 = PL1
3 = CI1	14 = PH2
4 = KA1	15 = PH5
5 = KH3	16 = SA1
6 = KY1	17 = CA1
7 = MA1	18 = NR3
8 = PU1	19 = TA1
9 = P1.5	20 = TA24
10 = P400	21 = CHe1
11 = PK	22 = SN1



รูปที่ 4.6 แสดงแถบดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ 22 ตัวอย่าง ที่เป็นตัวแทนในการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำโดยไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] โดย M คือ 100 + 1.5 bp ladder; A: 1-11 และ B: 12-22



รูปที่ 4.7 แสดงแถบดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ 22 ตัวอย่าง ที่เป็นตัวแทนในการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำโดยไพรเมอร์ 7 [CRN₂(CTT)₂] โดย M คือ 100 + 1.5 bp ladder; A: 1-11 และ B: 12-22



รูปที่ 4.8 แสดงแถบดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ 22 ตัวอย่าง ที่เป็นตัวแทนในการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำโดยไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] โดย M คือ 100 + 1.5 bp ladder; A: 1-11 และ B: 12-22

จากรูปที่ 4.6-4.8 พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการทำซ้ำ และมีความสม่ำเสมอในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ และเทคนิคไอเอสเอสอาร์ มีประสิทธิภาพในการทำซ้ำ และความสามารถในการจำแนกความแตกต่างระหว่างเปล้าใหญ่ที่ทำการศึกษา

4.2.4 วิเคราะห์ผลไอเอสเอสอาร์

จากผลการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ทั้งหมด 115 ตัวอย่าง ที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 3 ชนิดคือ ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT], ไพรเมอร์ 7 [CRN₂(CTT)₂] และไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] ตรวจสอบผลโดยอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส แสดงดังรูปที่ 4.5-4.8 และตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำของไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังรูปที่ 4.2-4.23 จากนั้นวิเคราะห์ผลโดยการจัดกลุ่ม โดยจะจัดภายในแต่ละไพรเมอร์ โดยจัดให้ตัวอย่างที่มีแบบแผนดีเอ็นเอเหมือนกันอยู่ภายในกลุ่มเดียวกัน เมื่อทำการรวมกลุ่มเพื่อหาแบบแผนดีเอ็นเอแล้วพบว่า ไพรเมอร์ 5 (ตารางที่ 4.1), ไพรเมอร์ 7 (ตารางที่ 4.2) และไพรเมอร์ 8 (ตารางที่ 4.3) สามารถจัดกลุ่มได้ 72, 75 และ 69 กลุ่มตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ตารางการแบ่งกลุ่ม 115 ตัวอย่างของไพรมเมอร์ 5 [A(GA)₇GT]

กลุ่ม	ตัวอย่าง	กลุ่ม	ตัวอย่าง
1	CH1	29	PL2
2	CP1 CP3 CP4	30	PM1
3	CP2 CP6	31	PM2
4	CP5	32	PH1
5	CI1	33	PH2 PH3 PH4 PH5
6	CI2	34	RA1
7	CI3	35	SA1
8	KA1	36	SK1
9	KA2	37	SU1
10	KH3	38	CA1
11	KY1	39	CA2 CA3
12	KY3	40	UD1
13	KY4	41	NP
14	KY5	42	NR3
15	KY6	43	NR4
16	KY7	44	NR5
17	KY8	45	NR7
18	KS1	46	NR8
19	MA1	47	NR10
20	MA2	48	TA1 TA3
21	UN1 UN2	49	TA2
22	PK	50	TA5
23	PU1	51	TA6 TA24
24	P1.5	52	TA7
25	P400	53	CHe1
26	PA1	54	SN1
27	PA2	55	SB1
28	PL1	56	KH1

ตารางที่ 4.1 ตารางการแบ่งกลุ่ม 115 ตัวอย่างของไพรมเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] (ต่อ)

กลุ่ม	ตัวอย่าง	กลุ่ม	ตัวอย่าง
57	JA JB JC JK JL JM JN JR	65	HR
58	JD JE JF JG JH JI JJ JO JP	66	HS
59	JQ	67	HT
60	HA HB HC HH HM	68	HU
61	HD	69	HO
62	HE HG HI HN	70	QA QB QC QD
63	HJ HK HL HP HF	71	QE
64	HQ	72	QF QG QH QI QJ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ตารางการแบ่งกลุ่ม 115 ตัวอย่างของไพโรเมเตอร์ 7 [CRN₂(CTT)₂]

กลุ่ม	ตัวอย่าง	กลุ่ม	ตัวอย่าง
1	CH1	29	PM1
2	CP1	30	PM2
3	CP2 CP6	31	PH1
4	CP3 CP4	32	PH2 PH3
5	CP5	33	PH4 PH5
6	CI1	34	RA1
7	CI2	35	SA1
8	CI3	36	SK1
9	KA1	37	SU1
10	KA2	38	CA1
11	KH3	39	CA2 CA3
12	KY1 KY5 KY6	40	UD1
13	KY3	41	NP
14	KY4	42	NR3
15	KY7	43	NR4
16	KY8	44	NR5
17	KS1	45	NR7
18	MA1	46	NR8
19	MA2	47	NR10
20	UN1 UN2	48	TA1 TA3 TA24
21	PK	49	TA2 TA7
22	PU1	50	TA5
23	P1.5	51	TA6
24	P400	52	CHe1
25	PA1	53	SN1
26	PA2	54	KH1
27	PL1	55	SB1
28	PL2	56	JA JB JC JK JL JM JN JR

ตารางที่ 4.2 ตารางการแบ่งกลุ่ม 115 ตัวอย่างของไพรมเมอร์ 7 [CRN₂(CTT)₂] (ต่อ)

กลุ่ม	ตัวอย่าง	กลุ่ม	ตัวอย่าง
57	JD JE JF JG JH JI JJ JO JP	67	HO HT HU
58	JQ	68	HP
59	HA HB HC HH HJ	69	HQ
60	HD	70	HS
61	HE HG	71	HR
62	HF	72	HL
63	HK	73	QA QB QC QD
64	HI	74	QE
65	HM	75	QF QG QH QI QJ
66	HN		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ตารางการแบ่งกลุ่ม 115 ตัวอย่างของไพรมเมอร์ 8 [BSC(GA)₈]

กลุ่ม	ตัวอย่าง	กลุ่ม	ตัวอย่าง
1	CH1	29	PL2
2	CP1 CP3	30	PM1
3	CP2 CP4	31	PM2
4	CP5	32	PH1
5	CP6	33	PH2
6	CI1	34	PH3 PH4 PH5
7	CI2	35	RA1
8	CI3	36	SA1
9	KA1	37	SK1
10	KA2	38	SU1
11	KH3	39	CA1
12	KY1 KY5	40	CA2 CA3
13	KY3	41	UD1
14	KY4	42	NP
15	KY6	43	NR3
16	KY7	44	NR4
17	KY8	45	NR5
18	KS1	46	NR7
19	MA1	47	NR8
20	MA2	48	NR10
21	UN1 UN2	49	TA1 TA3
22	PK	50	TA2
23	PU1	51	TA5
24	P1.5	52	TA6 TA24
25	P400	53	TA7
26	PA1	54	CHe1
27	PA2	55	SN1
28	PL1	56	SB1

ตารางที่ 4.3 ตารางการแบ่งกลุ่ม 115 ตัวอย่างของไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] (ต่อ)

กลุ่ม	ตัวอย่าง	กลุ่ม	ตัวอย่าง
57	KH1	64	HL HQ HR
58	JA JB JC JK JL JM JN JR	65	HM
59	JD JE JF JG JH JI JJ JO JP	66	HN
60	JQ	67	QA QB QC QD
61	HA HB HC HJ HK HH	68	QE
62	HD HE HG	69	QF QG QH QI QJ
63	HF HI HO HP HS HT HU		

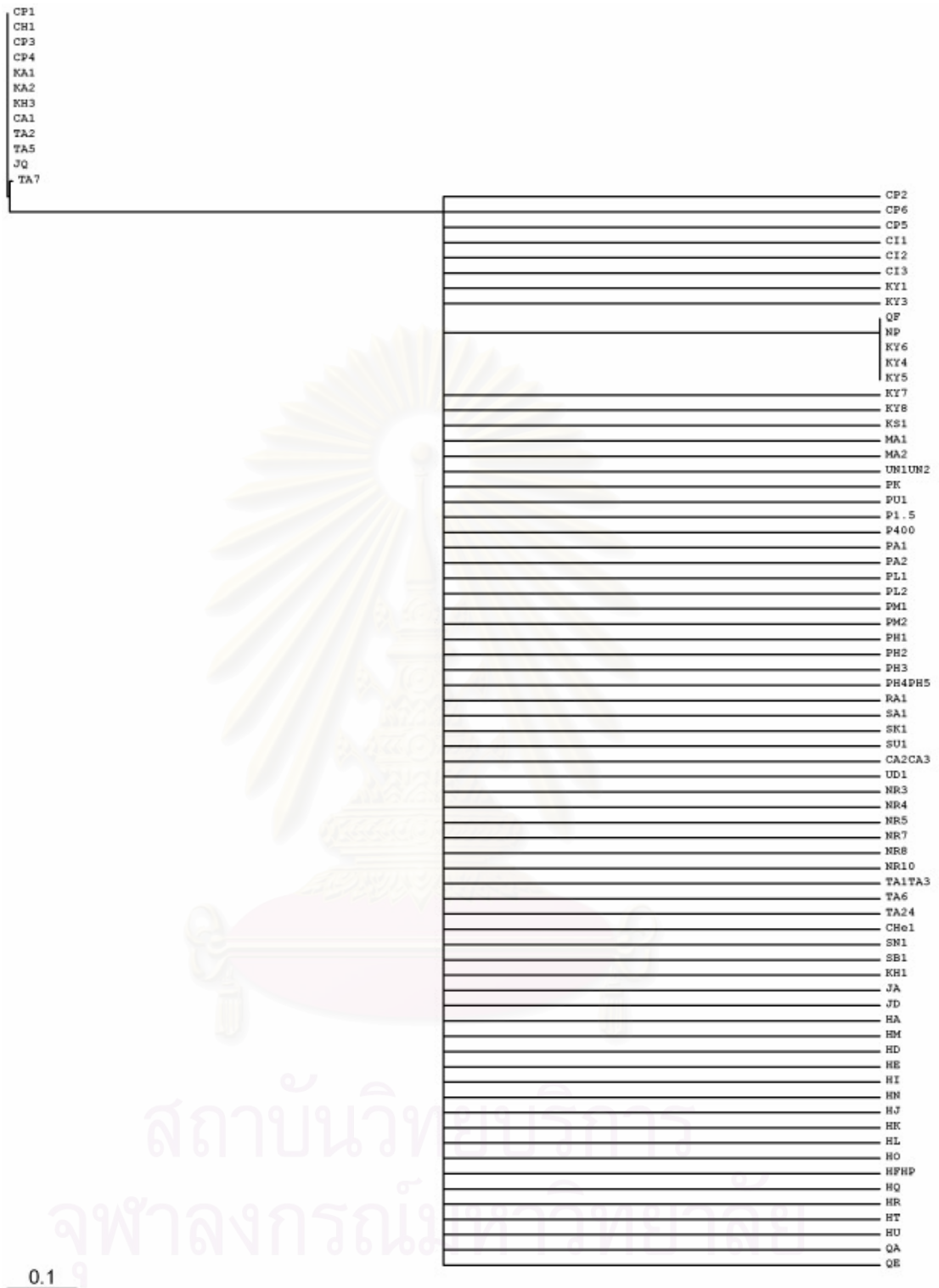
จากผลการทดลองการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT] , ไพรเมอร์ 7 [CRN₂(CTT)₂] และ ไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 4.3–4.5 พบว่า สามารถจัดกลุ่มแบบแผนดีเอ็นเอได้ 72, 75 และ 69 กลุ่มตามลำดับ ซึ่งแต่ละแหล่งของเปล้าใหญ่ ที่มาจากแต่ละแหล่งจะมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน แม้แต่ภายในอำเภอดียวกัน เช่น ตัวอย่างที่ 11–17 (KY1–KY7) เป็นตัวอย่างที่เก็บจากบ้านยางโพน จังหวัดกาญจนบุรี แต่ในตำแหน่งต่างกัน พบว่าในไพรเมอร์ 5 ถูกจัดอยู่ในต่างกลุ่ม (ตารางที่ 4.1), ไพรเมอร์ 7 พบว่า KY1, KY5 และ KY6 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และ ไพรเมอร์ 8 พบว่า KY1, KY5 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เป็นต้น ทำให้ทราบว่าต้นเปล้าใหญ่มีความหลากหลายมาก ในแต่ละพื้นที่ของต้นเปล้าใหญ่จะมีลักษณะจีโนไทป์เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละแหล่งซึ่งแตกต่างกันออกไป แม้ภายในพื้นที่เดียวกันมีทั้งที่จีโนไทป์เหมือน และต่างกัน , ไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ศึกษาในการทดลองครั้งนี้มีความสามารถในการบอกความแตกต่างของเปล้าใหญ่ได้แตกต่างกัน และเทคนิคไอเอสเอสอาร์มีประสิทธิภาพในการศึกษาความหลากหลายของเปล้าใหญ่จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย

ตารางที่ 4.4 แสดงกลุ่มของ 115 ตัวอย่าง โดยรวม ไพรมอร์ 5 [A(GA)₇GT] ไพรมอร์ 7 [CRN₂(CTT)₂] และ ไพรมอร์ 8 [BSC(GA)₈]

กลุ่ม	ไพรมอร์ (8 / 7 / 5)	ตัวอย่าง	กลุ่ม	ไพรมอร์ (8 / 7 / 5)	ตัวอย่าง
1	1 / 1 / 1	CH1	26	23 / 22 / 23	PU1
2	2 / 2 / 2	CP1	27	24 / 23 / 24	P1.5
3	2 / 3 / 2	CP3	28	25 / 24 / 25	P400
4	2 / 3 / 3	CP4	29	26 / 25 / 26	PA1
5	3 / 4 / 3	CP2	30	27 / 26 / 27	PA2
6	3 / 4 / 5	CP6	31	28 / 27 / 28	PL1
7	4 / 5 / 4	CP5	32	29 / 28 / 29	PL2
8	5 / 6 / 6	CI1	33	30 / 29 / 30	PM1
9	6 / 7 / 7	CI2	34	31 / 30 / 31	PM2
10	7 / 8 / 8	CI3	35	32 / 31 / 32	PH1
11	8 / 9 / 9	KA1	36	33 / 32 / 33	PH2
12	9 / 10 / 10	KA2	37	33 / 32 / 34	PH3
13	10 / 11 / 11	KH3	38	33 / 33 / 34	PH4 PH5
14	11 / 12 / 12	KY1	39	34 / 34 / 35	RA1
15	12 / 13 / 13	KY3	40	35 / 35 / 36	SA1
16	13 / 14 / 14	KY4	41	36 / 36 / 37	SK1
17	14 / 12 / 12	KY5	42	37 / 37 / 38	SU1
18	15 / 12 / 15	KY6	43	38 / 38 / 39	CA1
9	16 / 15 / 16	KY7	44	39 / 39 / 40	CA2 CA3
20	17 / 16 / 17	KY8	45	40 / 40 / 41	UD1
21	18 / 17 / 18	KS1	46	41 / 41 / 42	NP
22	19 / 18 / 19	MA1	47	42 / 42 / 43	NR3
23	20 / 19 / 20	MA2	48	43 / 43 / 44	NR4
24	21 / 20 / 21	UN1 UN2	49	44 / 44 / 45	NR5
25	22 / 21 / 22	PK	50	45 / 45 / 46	NR7

กลุ่ม	ไพรมเมอร์ (8 / 7 / 5)	ตัวอย่าง	กลุ่ม	ไพรมเมอร์ (8 / 7 / 5)	ตัวอย่าง
51	46 / 46 / 47	NR8	68	61 / 60 / 62	HD
52	47 / 47 / 58	NR10	69	62 / 61 / 62	HE HG
53	48 / 48 / 49	TA1 TA3	70	62 / 64 / 63	HI
54	49 / 49 / 50	TA2	71	62 / 66 / 66	HN
55	50 / 50 / 51	TA5	72	63 / 59 / 61	HJ
56	51 / 51 / 52	TA6	73	63 / 63 / 61	HK
57	52 / 49 / 53	TA7	74	63 / 72 / 64	HL
58	51 / 48 / 52	TA24	75	69 / 67 / 63	HO
59	53 / 52 / 54	CHe1	76	63 / 62 / 63	HF HP
60	54 / 53 / 55	SN1	77	64 / 69 / 64	HQ
61	55 / 54 / 56	SB1	78	65 / 71 / 64	HR
62	56 / 55 / 57	KH1	79	67 / 67 / 63	HT
63	57 / 56 / 58	JA JB JC JK JL JM JN JR	80	68 / 67 / 63	HU
64	58 / 57 / 59	JD JE JF JG JH JI JJ JO JP	81	70 / 73 / 67	QA QB QC QD
65	59 / 58 / 60	JQ	82	71 / 74 / 68	QE
66	60 / 59 / 61	HA HB HC HH	83	72 / 75 / 69	QF QG QH QI QJ
67	60 / 65 / 66	HM			

ผลจากการจัดกลุ่ม โดยรวมไพรมเมอร์ทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกัน สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 83 กลุ่ม แสดงดังตารางที่ 4.4 สร้างแผนภาพ (Phylogram) โดยใช้ใช้ neighbour-join, Phylip 3.6 ซึ่งผลที่ได้จากการสร้างแผนภาพ สามารถแบ่งเป็ล้าใหญ่ทั้ง 115 ตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.9 แสดง Phylogram ของเปลือกใหญ่ 115 ตัวอย่าง โดยใช้ neighbour-join, Phylip 3.63

ตารางที่ 4.5 แสดงกลุ่มและตัวอย่างที่ได้จากการสร้างแผนภาพ (Phylogram)

กลุ่ม	ตัวอย่าง
A	CP1 CH1 CP3 CP4 KA1 KA2 KH3 CA1 TA2 TA5 JQ TA7
B	CP2 CP6 CP5 CI1 CI2 CI3 KY1 KY3 QF QG QH QI QJ NP KY6 KY4 KY5 KY7 KY8 KS1 MA1 MA2 UN1 UN2 PK PU1 P1.5 P400 PA1 PA2 PL1 PL2 PM1 PM2 PH1 PH2 PH3 PH4 PH5 RA1 SA1 SK1 SU1 CA2 CA3 UD1 NR3 NR4 NR5 NR7 NR8 NR10 TA1 TA3 TA6 TA24 Che1 SN1 SB1 KH1 JA JB JC JK JL JM JN JR JD JE JF JG JH JI JJ JO JP HA HB HC HH HM HD HE HG HI HN HJ HK HL HO HF HP HQ HR HT HU QA QB QC QD QE

นำทั้ง 83 กลุ่มที่ได้มาศึกษาความสัมพันธ์ของเปล้าใหญ่โดยสร้างแผนภาพความสัมพันธ์โดยใช้ neighbour-join, Phylip 3.63 พบว่า สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (ตารางที่ 4.5) โดยกลุ่ม A ประกอบด้วยตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ได้แก่ CP1, CH1, CP3, CP4, KA1, KA2, CA1, TA2, TA5, JQ และ TA7 และกลุ่ม B 103 ตัวอย่าง ซึ่งภายในกลุ่ม B ตัวอย่างเปล้าใหญ่จากชัยภูมิ (QF, QG, QH และ QI) , นครราชสีมา (NP) และ กาญจนบุรี (KY4, KY5 และ KY6) มีความใกล้เคียงกันมากถึงแม้จะมาจากแหล่งที่ต่างกัน และในตัวอย่างอื่นก็มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมาก จากแผนภาพความสัมพันธ์ที่สร้างได้สามารถบอกได้ว่า เปล้าใหญ่ในแต่ละพื้นที่น่าจะมีแบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะและเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละแหล่ง

4.3 การวิเคราะห์ทางเคมี

จากมีรายงานก่อนหน้านี้มีผู้ศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ พบว่าโดยส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 10 กลุ่ม (พัชรา บุญญามณี, 2001 และ Praworada chonsuk, 2004) และในแต่ละแหล่งของเปล้าใหญ่มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน เช่น crotohalimaneic acid, crotohalimoneic acid และ 12-benzoyloxycrotohalimaneic acid จากเปลือกลำต้นเปล้าใหญ่ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (โสภณ เริงสำราญ และคณะ, 2003), cembranoid diterpene และ neocrotocembranal จากเปลือกลำต้นเปล้าใหญ่ อำเภอบึงสามพัน จังหวัดเพชรบูรณ์ (โสภณ เริงสำราญ และคณะ, 1999) และ labda-7,12(E),14-triene, labda-7,12(E),14-triene-17-al, labda-7,12(E)-14-triene-17-ol และ labda-7,12(E),14-triene-17-oic acid จากเปล้าใหญ่ อำเภอปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (โสภณ เริงสำราญ และคณะ, 1999) เป็นต้น เมื่อนำมา

เปรียบเทียบกับแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้ทำการศึกษาโดยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ที่พบว่า แต่ละแหล่งของต้นเป็ล้าใหญ่ที่มาจากแหล่งที่ต่างกันจะมีแบบแผนดีเอ็นเอต่างกัน ซึ่งอาจจะสอดคล้องกับองค์ประกอบทางเคมีที่พบในเปลือกต้นเป็ล้าใหญ่ ซึ่งจากที่รายงานก่อนหน้านี้ว่าพบองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันจากต้นเป็ล้าใหญ่ในแต่ละแหล่ง จึงได้คัดเลือกตัวอย่างเป็ล้าใหญ่มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของเปลือกต้นเป็ล้าใหญ่ 19 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 115 ตัวอย่าง โดย 18 ตัวอย่างจะอยู่ในกลุ่ม B (ตารางที่ 4.5) ส่วนอีก 1 ตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่ม A โดยจะทำการศึกษา นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) และโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

ตัวอย่างที่นำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมี 19 ตัวอย่างแสดงแหล่งที่มา ดังตารางที่ 4.6

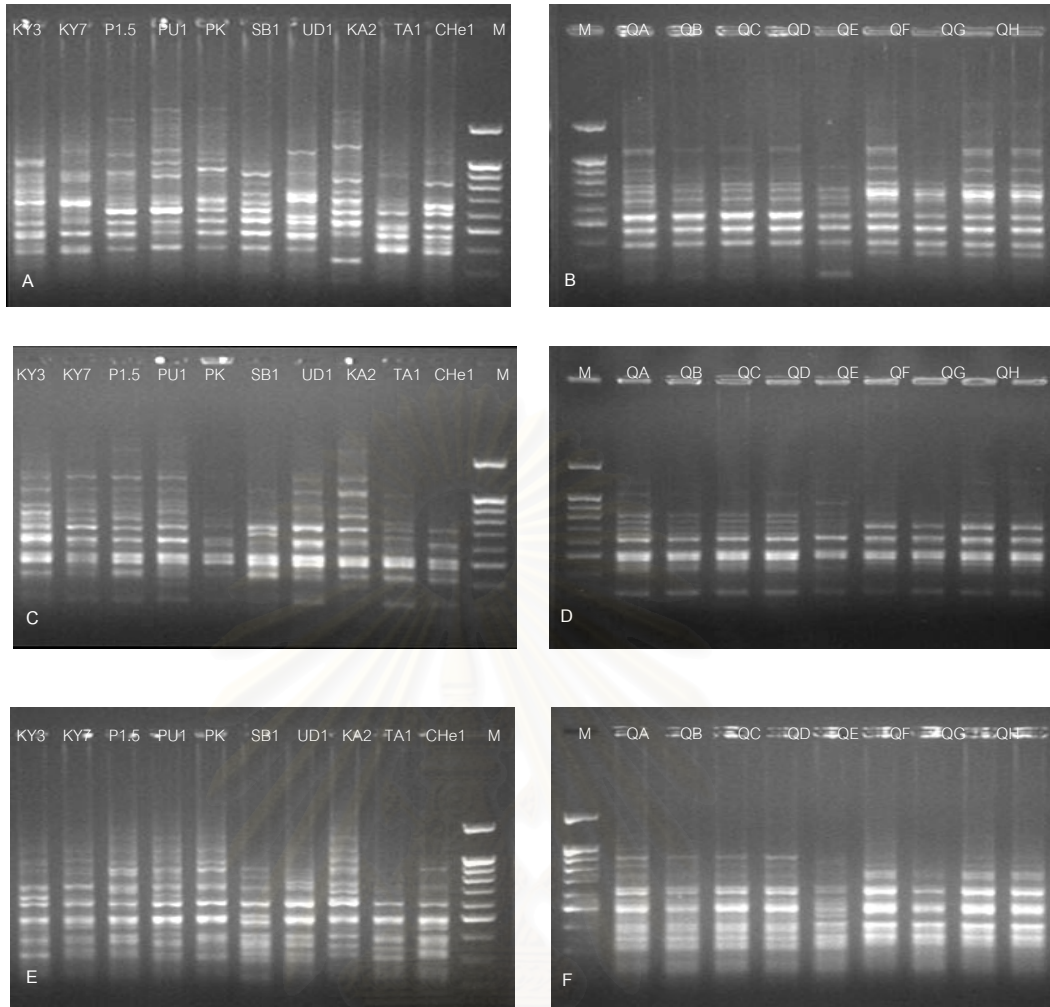
แถบดีเอ็นเอของเป็ล้าใหญ่ 19 ตัวอย่างที่นำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ (รูปที่ 4.10)

1. มาจากแหล่งเดียวกันแต่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน
2. มาจากต่างแหล่งแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน และ
3. มาจากแหล่งเดียวกันและแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 แสดงรหัส แหล่งที่มา และกลุ่มของตัวอย่างของ 19 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	กลุ่ม (phylogram)
1. KY3	บ้านยางโทน จังหวัดกาญจนบุรี	} (1) B
2. KY7	บ้านยางโทน จังหวัดกาญจนบุรี	
3. P1.5	จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	} (1) B
4. PU	จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	
5. PK	เขาแดง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	} (2) B B B A B B
6. SB1	อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี	
7. UD2	ตำบลหนองบัว จังหวัดอุดรธานี	
8. KA2	อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์	
9. TA1	อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร	
10. CHe1	อำเภอบึงสามพัน จังหวัดเพชรบูรณ์	
11. QA	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ	} (3) B B B B
12. QB	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ	
13. QC	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ	
14. QD	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ	
15. QE	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ	(1) B
16. QF	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ	} (3) B B B B
17. QG	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ	
18. QH	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ	
19. QI	ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ	



รูปที่ 4.10 แสดงแถบดีเอ็นเอของเปล้าใหญ่ 19 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 5 (A, B), ไพรเมอร์ 7 (C, D) และ ไพรเมอร์ 8 (E, F) M คือ 100 + 1.5 bp ladder

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วย $^1\text{H-NMR}$ และ TLC

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปล้าใหญ่ 19 ตัวอย่างที่สุ่มมาจาก 115 ตัวอย่าง โดยเลือก 1 ตัวอย่างจากกลุ่ม A และ 18 ตัวอย่างจากกลุ่ม B โดยใน 18 ตัวอย่างจากกลุ่ม B ประกอบด้วยเปล้าใหญ่ที่มาจากแหล่งเดียวกัน แต่มีแบบแผนดีเอ็นเอต่างกัน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ KY3, KY7, P1.5, PU และ QE เปล้าใหญ่ที่มาจากต่างแหล่ง และมีแบบแผนดีเอ็นเอต่างกัน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ PK, SB1, UD1, KA2, TA1 และ Che1 เปล้าใหญ่ที่มาจากแหล่งเดียวกัน และมีแบบแผนดีเอ็นเอเหมือนกัน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ QA, QB, QC, QD, QF, QG, QH และ QI ในการศึกษาใช้สารสกัดเฮกเซนจากเปลือกของเปล้าใหญ่ที่บิด และอบแห้ง ดังแสดงตารางที่ 4.7

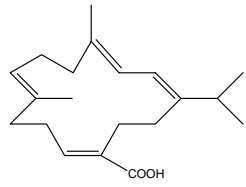
ตารางที่ 4.7 แสดงลักษณะของสารสกัดเฮกเซนจากเปลือกเปล้าใหญ่

ตัวอย่าง	ลักษณะสารสกัดเฮกเซน
1. KY3	สารสีเหลือง แห้งไม่เหนียวข้น มีผลึก
2. KY7	สารเหนียวข้น สีเหลืองปนน้ำตาลเข้ม
3. P1.5	สารเหนียวข้น สีเหลืองเข้ม
4. PU1	สารเหนียวข้น สีเหลืองปนน้ำตาลเข้ม
5. PK	สารเหนียวข้น สีเหลืองเข้ม
6. SB1	สารสีเหลือง แห้งไม่เหนียวข้น
7. UD1	สารเหนียวข้น สีน้ำตาลเข้ม
8. KA2	สารเหนียวข้น สีเหลืองอ่อน
9. TA1	สารเหนียวข้น สีเหลืองเข้ม
10. CHe1	สารเหนียวข้น สีเหลืองเข้ม
11. QA	สารเหนียวข้น สีเหลืองปนน้ำตาลเข้ม
12. QB	สารเหนียวข้น สีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน
13. QC	สารเหนียวข้น สีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน
14. QD	สารเหนียวข้น สีเหลืองปนน้ำตาลเข้ม
15. QE	สารเหนียวข้น สีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน
16. QF	สารเหนียวข้น สีเหลืองอ่อน
17. QG	สารเหนียวข้น สีเหลืองอ่อน มีผลึก
18. QH	สารเหนียวข้น สีเหลืองอ่อน มีผลึก
19. QI	สารเหนียวข้น สีเหลืองอ่อน

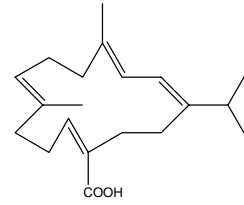
นำสารสกัดเฮกเซนที่ได้มาละลายในคลอโรฟอร์ม-ดี₁ (CDCl₃) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR พบว่าสเปกตรัม ¹H-NMR ที่ได้ในตัวอย่างที่ศึกษาทั้ง 19 ตัวอย่างมีองค์ประกอบสารเคมีที่ทั้งเหมือน และแตกต่างกัน (รูปที่ 4.10) เนื่องจากสารสกัดเฮกเซนที่ได้จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ ยังไม่เป็นสารที่บริสุทธิ์ ในการจัดกลุ่มจึงได้จัดกลุ่มโดยใช้โครงสร้างของสารหลักที่พบในสารสกัดเฮกเซนในแต่ละตัวอย่าง และเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัม ¹H-NMR จากผู้ที่เคยศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ ที่มีรายงานแล้ว

เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัม ¹H-NMR สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มเปล้าใหญ่ที่สร้าง Cembrane diterpenoids (CHe1, QA, QB, QC และ QD) (รูปที่ 4.11), กลุ่มเปล้าใหญ่ที่สร้าง Labdane diterpenoids (QG, QH, QI และ KY7) (รูปที่ 4.12), กลุ่มเปล้าใหญ่ที่สร้าง

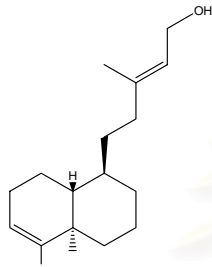
Clerodane diterpenoids (QE, PU, P1.5 และPK) (รูปที่ 4.13) และกลุ่มที่ยังไม่สามารถจำแนก
กลุ่มได้ (QF, KA2, KY3, SB1 และ UD1)



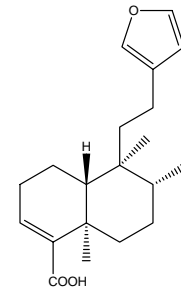
neocrotocembraneic acid (1)



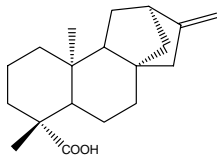
crotocembraneic acid (2)



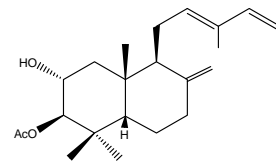
kalavenol (3)



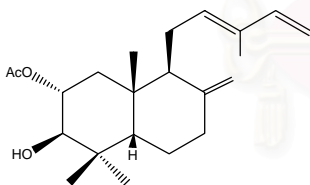
hardwickiic acid (4)



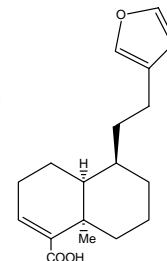
kaurenoic acid (5)



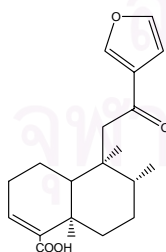
labdane compound (6)



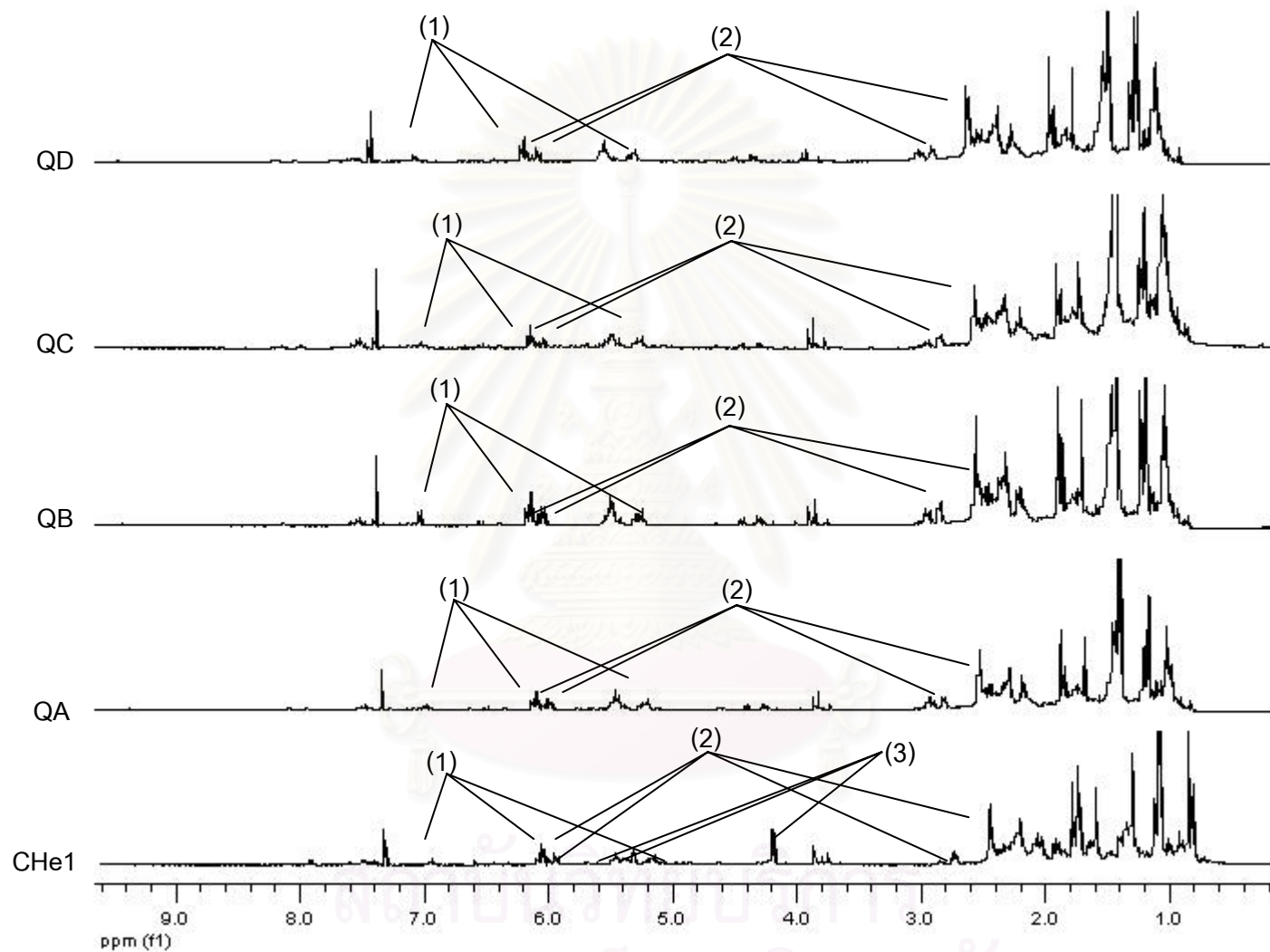
labdane compound (7)



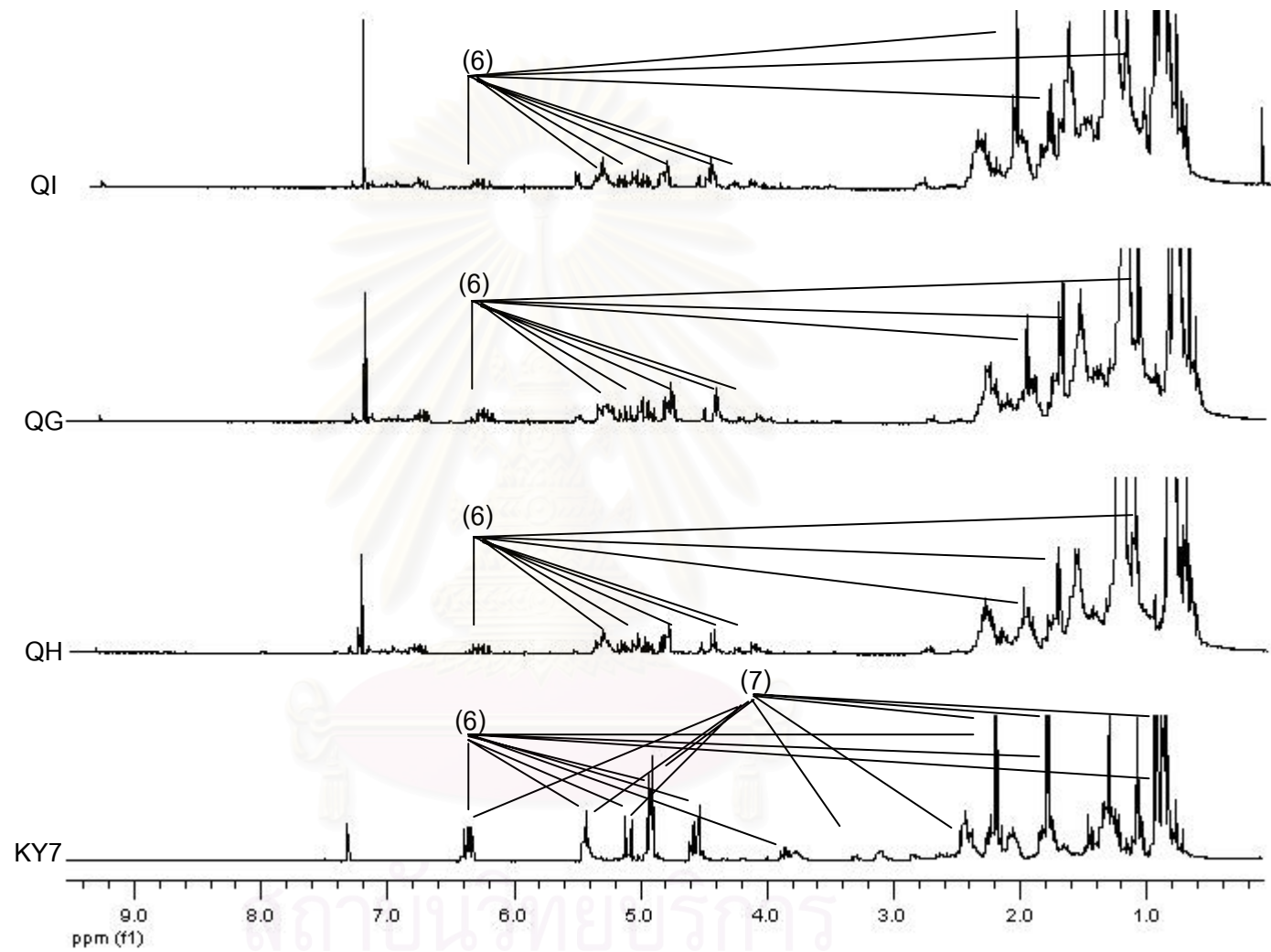
hardwickiic acid(8)



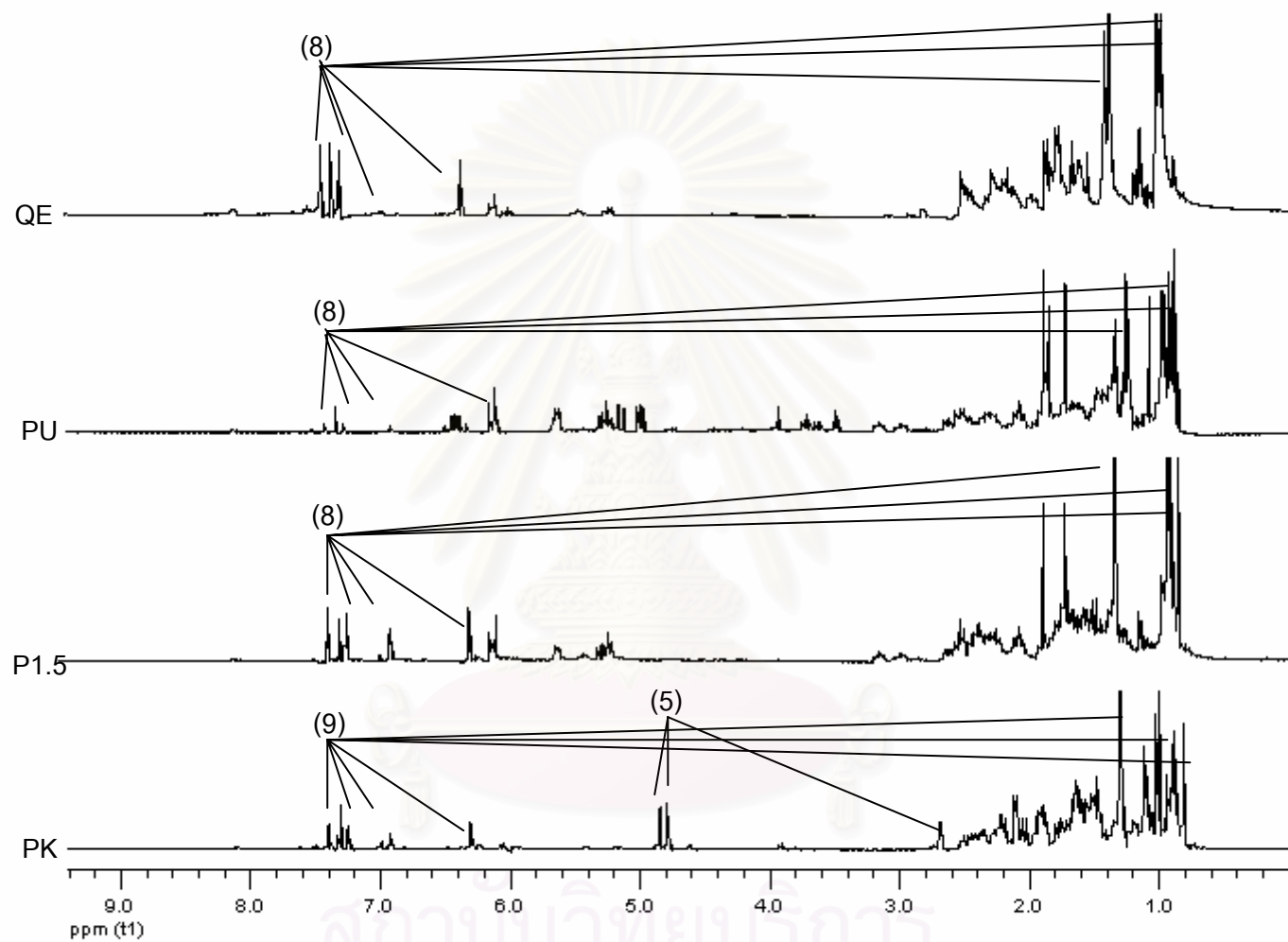
hardwickiic acid(9)



รูปที่ 4.11 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของกลุ่มเปด้าใหญ่ที่สร้าง Cembrane diterpenoids เป็นองค์ประกอบหลัก

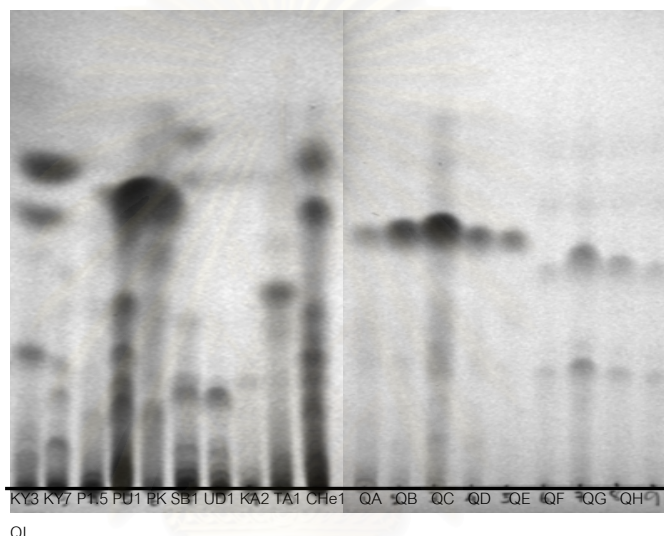


รูปที่ 4.12 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของกลุ่มเปลา้าใหญ่ที่สร้าง Labdane diterpenoids เป็นองค์ประกอบหลัก

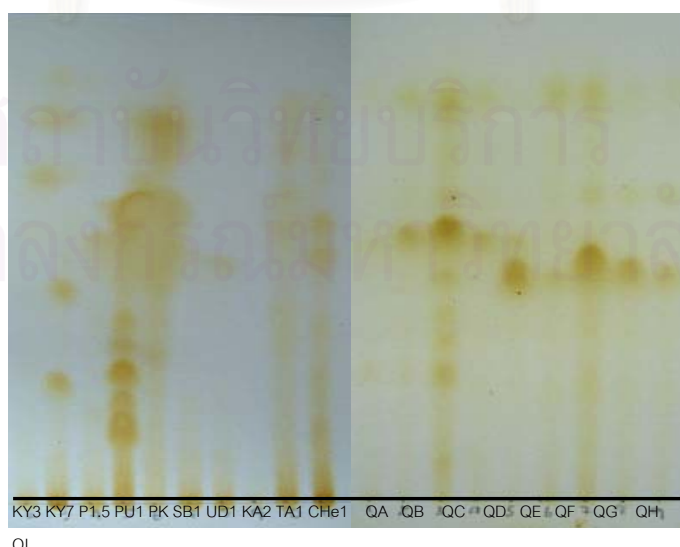


รูปที่ 4.13 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของกลุ่มเปล้าใหญ่ที่สร้าง Clerodane diterpenoids เป็นองค์ประกอบ

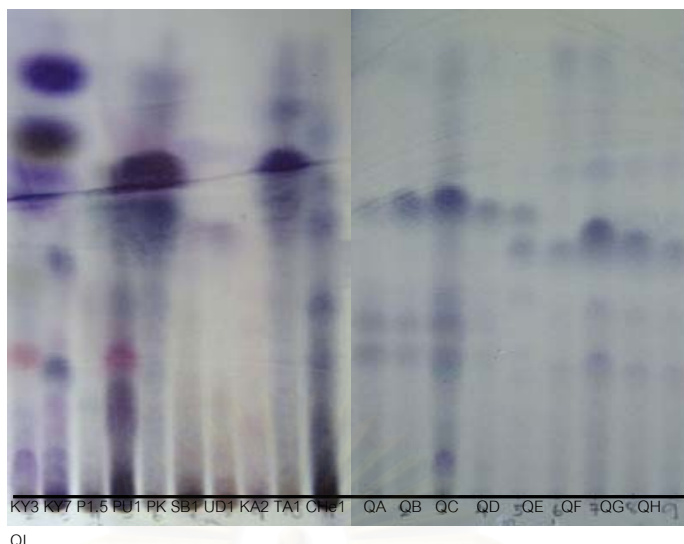
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิค TLC ที่ตรวจสอบด้วย UV ($\lambda = 254$), ไอโอดีนและ vanillin/H₂SO₄ reagent แสดงให้เห็นว่า เปล้าใหญ่ 2 กลุ่มที่มีแบบแผนดีเอ็นเอเหมือนกัน ได้แก่ QA, QB, QC และ QD กับ QE, QF, QG, QH และ QI จะให้ตำแหน่งสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกัน ส่วนเปล้าใหญ่ที่มีแบบแผนดีเอ็นเอต่างกัน ได้แก่ KY3, KY7, P1.5, PU1, PK, SB1, UD1, KA2, TA1, CHe1 และ QE TLC จะมีโครมาโตแกรมแตกต่างกัน โดยเปล้าใหญ่บางชนิดจะมีโครมาโตแกรมที่คล้ายคลึงกันในบางส่วน (รูปที่ 4.14, 4.15 และ 4.16)



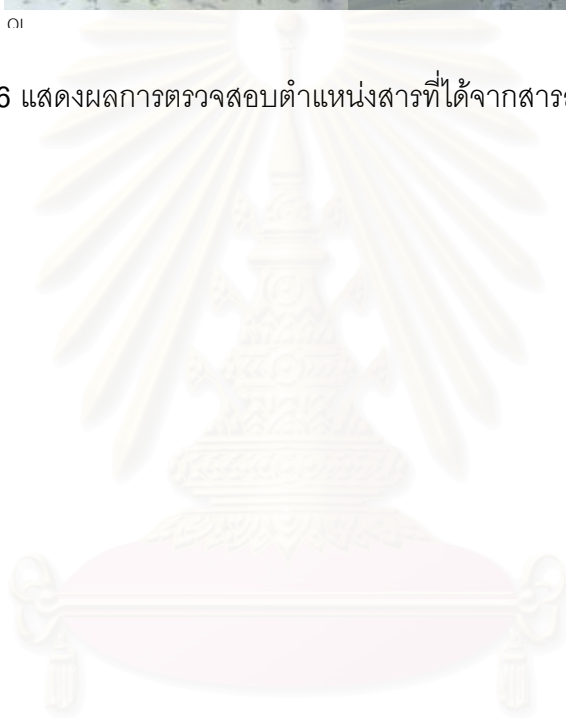
รูปที่ 4.14 แสดงผลการตรวจสอบตำแหน่งสารที่ได้จากสารสกัดเฮกเซน ภายใต้รังสียูวี ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร



รูปที่ 4.15 แสดงผลการตรวจสอบตำแหน่งสารที่ได้จากสารสกัดเฮกเซน โดยย้อมไอโอดีน



รูปที่ 4.16 แสดงผลการตรวจสอบตำแหน่งสารที่ได้จากสารสกัดเฮกเซน โดยย้อม vanillin / H_2SO_4 reagent



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายของเป็ด้าใหญ่ในประเทศไทยโดยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ อาร์เอ-พีดีไพรเมอร์ ทั้งหมด 9 ชนิด (ตารางที่ 3.2) พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเป็ด้าใหญ่ได้ แต่ไม่มีความแน่นอนในการทำซ้ำ โดยไม่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอได้เหมือนเดิม ขณะที่เทคนิคไอเอสเอสอาร์จะมีความแน่นอนในการทำซ้ำสูง ดังนั้นเทคนิคไอเอสเอสอาร์จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายของเป็ด้าใหญ่ในประเทศไทยโดยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ จากการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของต้นเป็ด้าใหญ่ทั้ง 115 ตัวอย่าง โดยใช้เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ 3 ชนิด คือ ไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT], ไพรเมอร์ 7 [CRN₂(CTT)₂] และ ไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] สามารถเพิ่มจำนวนแถบดีเอ็นเอได้ 64 , 93 และ 56 แถบตามลำดับ และสามารถแบ่งกลุ่มแบบแผนดีเอ็นเอภายในของแต่ละไพรเมอร์ได้ 72 , 75 และ 68 กลุ่มตามลำดับ เมื่อจัดกลุ่มโดยใช้ผลจากแต่ละไพรเมอร์ สามารถจัดกลุ่มได้ 83 กลุ่ม เป็ด้าใหญ่ที่มาจากแหล่งต่างกันจะมีลักษณะแบบแผนดีเอ็นเอต่างกัน และเป็ด้าใหญ่ที่มาจากแหล่งเดียวกันจะมีแบบแผนดีเอ็นเอทั้งเหมือนกันและแตกต่างกัน จากนั้นสร้างแบบแผนความสัมพันธ์ร่วมกัน (Phylogram) ของเป็ด้าใหญ่ทั้ง 83 กลุ่ม โดยใช้โปรแกรม neighbour-join, Phylip 3.63 สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่มใหญ่ ประกอบด้วย กลุ่ม A12 และกลุ่ม B 103 ตัวอย่าง ทำให้ทราบว่าเป็ด้าใหญ่แต่ละแหล่งมีความใกล้เคียงกันมาก

จากการสุ่มตัวอย่างเป็ด้าใหญ่มาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้ส่วนเปลือกต้นเป็ด้าใหญ่ 19 ตัวอย่าง ซึ่งมีแบบแผนดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และต่างกัน เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบบแผนดีเอ็นเอของเป็ด้าใหญ่ กับองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกต้นเป็ด้าใหญ่ โดยอาศัยเทคนิค¹H-NMR และ TLC พบว่าตัวอย่างเปลือกเป็ด้าใหญ่ที่มาจากแหล่งที่ต่างกัน มีแบบแผนดีเอ็นเอต่างกัน จะมีองค์ประกอบทางเคมีต่างกัน เป็ด้าใหญ่ที่มาจากแหล่งเดียวกัน มีแบบแผนดีเอ็นเอต่างกัน จะมีองค์ประกอบทางเคมีต่างกัน และเป็ด้าใหญ่ที่มาจากแหล่งเดียวกัน มีแบบแผนดีเอ็นเอเหมือนกัน จะมีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกัน จากข้อมูลได้มาทำให้ทราบว่าผลระหว่างแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 5 [A(GA)₇GT], ไพรเมอร์ 7 [CRN₂(CTT)₂] และ ไพรเมอร์ 8 [BSC(GA)₈] และองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นเป็ด้าใหญ่น่าจะมีความสอดคล้องกัน

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). พิมพ์ครั้งที่ 2, กรุงเทพมหานคร: หจก.แพนนี่พับลิชชิ่ง.
- พัชรา บุญญามณี. 2543. ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งของสารประกอบไดเทอร์พีนของเปลือกต้นเปเล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* จังหวัดฉะเชิงเทรา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ลีนา ผู้พัฒนพงศ์ และ ธวัชชัย วงศ์ประเสริฐ. 2530. สมุนไพรไทย ตอนที่ 5. กรุงเทพมหานคร: หจก. ชูติมาการพิมพ์.
- วิจิตร สมรรคนัญ. 2543. เครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวเหนียวที่คัดเลือกจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อัญชลี ทศนาขจร, วิเชียร ริมพนิชยกิจ และ ศิราวุธ กลิ่นบุหงา. การวิเคราะห์ลักษณะและความแปรผันของไมโครแซเทลไลต์ในจีโนมของกุ่มกลาดำและความเป็นไปได้ในการใช้จำแนกพันธุกรรม หน้า 54.

ภาษาอังกฤษ

- Achayindee, S. 1996. Chemical constituents from the leaves of *Croton oblongifolius* Roxb. Master's Thesis, Department of chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University.
- Adams, R. P., Schwarzbach, A. E., and Pandey, R. N. 2003. The Concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from *Juniperus*. Biochemical Systematics and Ecology 31: 375-387.
- Aiyar, V. N., Rao, P. S., Sachdev, T. R., and Seshadri, T. R. 1969. Isolation and constitution of deoxyoblongifolius. Indian Journal of Chemistry 7: 839.
- Aiyar, V.N., and Seshadri, T.R. 1970. Components of *Croton oblongifolius* Roxb.-Part III constitution of oblogifolic acid. Tetrahedron 26: 5275-5279.
- Aiyar, V.N., and Seshadri, T.R. 1971a. Components of *Croton oblongifolius* Roxb.:Part IV constitution of oblogifoliol & deoxyoblogifoliol. Indian Journal of Chemistry 9: 1055-1059.

- Aiyar, V. N., and Seshadri, T. R. 1971b. Components of *Croton oblongifolius* Roxb.:Part V constitution of oblogifoliol & deoxyoblogifoliol. Indian Journal of Chemistry 9: 613-614.
- Aiyar, V.N., and Seshadri, T.R. 1971c. Isolation of Acetyl Aleuritolic Acid from *Croton oblongifolius* Roxb. Indian Journal of Chemistry 9: 1028-1029.
- Aiyar, V. N., and Sachdev, T. R. 1972. Chemical component of from *Croton oblongifolius* Roxb. Current Science 41: 839
- Aiyar, V.N., and Seshadri, T.R. 1972a. 11-Dehydro-(—)-hardwickiic acid from *Croton oblongifolius* Roxb. Phytochemistry 11: 1473-1476.
- Baigern, S. 1999. Chemical constituents and biological activity from stem barks of *Croton oblongifolius* Roxb. from Amphoe Muang, Udon Thani Province. Master's Thesis, Department of chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University
- Bao, L., and Jonathan F. W. 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic markers system in cotton. Molecular Ecology notes. 1: 205-208.
- Becker, J., and Heun, M. 1995. Mapping of digested and undigested random amplified microsatellite polymorphisms in barley. Genome 38: 991-998.
- Beckman, JS., and Soller, M. 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Bio/Technology. 8: 930-932.
- Blair, M. W.; Panaud, O.; and McCough, S. R. 1999. Intersimple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting of rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical Applied Genetics 98: 780-792.
- Boontha, B. 2000. Cytotoxicity of Chemical constituents of the stem barks of *Croton oblongifolius* Roxb. from Amphoe Muang, Prachupap Khiri Khan Province. Master's Thesis, Department of chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University.
- Bornet, B., and Branchard. M. 2001. Nonchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 19: 209-215.
- Bunyamane, P. 2000. Cytotoxicity to cancer call lines of diterpenoid compounds from stem barks *Croton oblongifolius* Roxb. from Chachoengsao Province. Master's Thesis, Department of chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University.

- Bornet, B., Goraguer, F., Joly, G., and Branchard, M. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *Tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genome 45: 481-484.
- Cano, J., Rezusta, A., Sole, M., Gil, J., Rubio, C. R., Revillo, M. J., Guarro, J. 2005. Inter-single-sequence-repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporus canis* strains. Journal of Dermatological Science.
- Chaicharoenpong, C. 1996. Chemical constituents of the wood of *Croton oblongifolius* Roxb. Master's Thesis, Department of chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University.
- Charters, Y., and M.J. Wilkinson. 2000. The use of self-pollinated progenies as 'in-group' for the genetic characterization of cocoa germplasm. Theoretical Applied Genetics. 100: 160-166.
- Fang, D. Q., and Roose, M. L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theoretical Applied Genetics. 95: 408-417.
- Frank, R., Blattner., Kurt, W., Gudrun, B., Ulrich, M., and Brigitte, F. 2001. Molecular Analysis of phylogenetic relationships among Myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution 19(3): 331-344.
- Gang, H., Dong-hee, L., June, S. L., and Sook, L. 2002. A study of taxonomical relationships among species of Korean *Allium* sect. *Sacculiferum* (Alliaceae) and related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) marker. Bot Bull. Acad. Sin. 43: 63-68.
- Gang, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J., and Owen, J. L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theoretical Applied Genetics. 89: 998-1006.
- Ge, X. J., and Sun, M. 1999. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. Molecular Ecology 8: 2061-2069.
- Gupta, M., Chyi, Y. S., Romeo-Severson, J., and Owen, J. L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genome using single primers of simple-sequence repeats. Theoretical Applied Genetics. 8: 998-1006.

- Hansen, M., Hallden, C., and Sall, T. 1998. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. Plant Molecular Biology Reporter 16: 139-146.
- Hasan, C. M., Khan, S., Jabbar, A., and Rashid, M. A. 2000. Nasimalun A and B: neoclerodane Diterpenoids from *Barringtonia racemosa*. Journal of Natural Products 63: 410-411.
- Hiroimi, A., Yumi, Y., Akiko, I., Atsushi, N., and Tatsuhiro, F. 1996. A codominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, *Rf-1*, identified with inter-SSR fingerprinting. Genome 39: 1205-1209.
- Huang, J., and Sun, S. M. 2000. Genetic diversity and relationship of sweet potato and its relatives in Ipomoea series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. Theoretical Applied Genetics. 100: 1.50-1060.
- Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sale, F., Van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevshi, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., and Karp, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding 3: 381-390.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K. V., Ayada, W. G., and Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies a IPGRI technical bulletin no 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Kebebew, A., Arnulf, M., and Hailu, T. 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef (*Eragrostis tef*(Zucc.) Trotter. Hereditas. 139: 174-183.
- Kojima, T., Nagaoka, T., Noda and Ogihara, Y. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. Theoretical Applied Genetics. 96: 37-45.
- Kuptiyanuwat, N. 1999. Chemical constituents of stem barks of *Croton oblongifolius* Roxb. and their biological activity from Amphoe Wangsapung, Loei Province. Master's Thesis, Department of chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University.

- Lai, J. A., Yang, W. C., and Hsiao, J. Y. 2001. An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. Bot. Bull. Acad. Sin. 42: 93-100.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H., and Anderson, L. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motif differs between plant and vertebrates. Nucleic Acids Research 21: 1111-1115.
- Martin, J.P., and Sanchez-Yelamo, M.D. 2000. Genetic relationships among species of genus *Diplotaxis* (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeat markers. Theoretical Applied Genetics 101: 1234-1241.
- Meyer, W., Mitchell, T.G., Freedman, E. Z., and Vilgays, R. 1993. Hybridization proves for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. Journal Clinical Microbiology 31: 2274-2280.
- Morgante, M., and Olivivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. The Plant Journal 3: 175-182.
- Pradeep, R. M., Sarla, N., and Siddig, E.A. 2002 Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphyta 128: 9-17.
- Nagaoka, T., and Ogiwara, Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theoretical Applied Genetics 94: 597-602.
- Parsons, B. J., Newbury, H. J., Jackson, M. T., and FordLloyd, B. V. 1997. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. Molecular Breeding 3: 115-125.
- Paulo, M. R., Claudete, F. R., Leandro, R., Valdemar, P., Carvalho, Eduardo, A. 2003. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter-simple sequence repeat) markers. Genetic and Molecular Biology 26.
- Pattamadilok, D. 1998. Chemical constituents of *Croton oblongifolius* stem bark from Chainat. Master's Thesis, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Science Chulalongkorn University.

- Patzak, J. 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for the assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). Euphytica 121: 9-18.
- Permpanya, L. 2003. Chemical constituents of the stem bark of *Croton roxburghii* from Nahaew district, Loei province. Master's Thesis, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Science Chulalongkorn University.
- Praworada, C. 2004. Chemical Constituents of the Stem Bark of *Croton Roxburghii* from Chaiyaphum Province. Master's Thesis, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Science Chulalongkorn University.
- Prevost, A., and Wilkinson, M. J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical Applied Genetics 98: 107-112.
- Terzopoulos, P. J., Kolano, B., Bebeli, P. J., Kaltsikes, P. J., Metzidakis, I. 2005. Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. Scientia Horticulturae 105: 45-51.
- Rakhee, S. D., Meena, D. L., Lal, B. C., Prabhakar, K. R., and Vidya, S. G. 2004. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. Plant Biology 4(1).
- Raina, S. N., Rani, V., Kojima, T., Singh, K.P., and Devarumath, R. M. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification. And phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. Genome 44: 763-772.
- Rao, P. S., Sachdev, T. R., and Singh, H. B. 1968. Isolation and constitution of oblongifoliol, a new diterpene of *Croton oblongifolius*. Tetrahedron letters 45: 4685.
- Ratnaparke, M. B., Tekeoglu, M., and Muehlbauer, F. J. 1998. Inter-Simple- sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. Theoretical Applied Genetics 97: 515-519.
- Roengsumran, S., Achayindee, S., Petsom, A., Pudhom, K., Singtothong, P., Surachetapan, C., and Vilaivan, T. 1998. Two new cembranoids from *Croton oblongifolius* Roxb. Journal of Natural Products 61: 652-654.

- Roengsumran, S., Petsom, A., Sommit, D., and Vilaivan, T. 1999. Labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius* Roxb. Phytochemistry 50(3): 449-453.
- Roengsumran, S., Singtothong, P., Pudhom, K., Ngamrochanavanich, N., Petsom, A., and Chaichantipyuth, C. 1999. Neocrotocembranal from *Croton oblongifolius* Roxb. Journal of Natural Products 62: 1163-1164.
- Roengsumran, S., Petsom, A., Kuptiyanuwat, N., Vilaivan, T., Ngamrojnavich, C., Chaichantiyouth, C., and Phuthong, S. 2001. Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius* Roxb. Phytochemistry 56(1): 103-107.
- Roengsumran, S., Pornpakakul, S., Muangsin, N., Sangvanich, P., Nhujak, T., Sintothong, P., Chaichit, N., Puthong, S., and Petsom, A. 2003. New Halimane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. Planta Medica 7: 1-3.
- Ruangraweewat, N. 2001. Chemical constituents and biological activity from stem bark of *Croton oblongifolius* Roxb. from Amphoe Phurua, loei Province. Master's Thesis, Department of chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University.
- Singtothong P. 1999. Chemical and biological activity of diterpenoids from *Croton oblongifolius* Roxb. Doctoral dissertation, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Siriwat, K. 2000. Chemical constituents and biological activity from stem bark of *Croton oblongifolius* Roxb. from Amphoe Dan Sai, Loei Province. Master's Thesis, Department of chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University.
- Sirimongkhon S. 2000. Kuarane diterpenes from stem bark of *Croton oblongifolius* Roxb. from Amphoe Kui Buri, Prachuap Khiri Khan Province. Master's Thesis, Department of chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University.
- Sommit, D. 1996. Structure analysis of diterpenoid compound from stem barks of *oblongifolius* Roxb. Master's Thesis, Department of chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University.
- Sriyagnok, S. 2000. Chemical constituents and biological activity from stem bark of *Croton oblongifolius* Roxb. from Amphoe Pran Buri, Prachuap Khiri Khan Province. Master's Thesis, Department of chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University.

- Surachetapan, C. 1996. Chemical constituents of the stem barks of *Croton oblongifolius* Roxb. Master's Thesis, Department of chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University.
- Tanwattanakul, T. 1999. Chemical constituents and their biological activity of stem barks of *Croton oblongifolius* Roxb. From Amphoe Muang, Uttaradit Province. Master's Thesis, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Tautz, D., and Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research 12: 4127-4138.
- Virk, P. S., Zhu, J., Newbury, H. J., Bryan, G. J., Jackson, M. T., and Ford-Lloyd, B. V. 2000. Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice (*Oryza sativa*) germplasm. Euphytica 112: 275-284.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.
- Yang, W., de Oliveira, A. C., Godwin, I., Schertz, K., and Bennetzen, J. L. 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. Crop Science 36: 1669-1676.
- Zhou, Z., Miwa, M., and Hogestsu, T. 1999. Analysis of genetics structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of Inter simple sequence repeat (ISSR). The New Phytologist 144: 55-63.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

1. สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ

1.1 Washing buffer

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรสารละลาย 200 มิลลิลิตร
PVP	1 เปอร์เซ็นต์	2 กรัม
Ascorbic acid	0.05 โมลาร์	1.76 กรัม
Tris-HCl (pH 8.0)	0.1 โมลาร์	มิลลิลิตร (1 โมลาร์ - สารละลายตั้งต้น)
2-mercaptoethanol	2 เปอร์เซ็นต์	4 มิลลิลิตร
Autoclaved water		

1.2 2X CTAB lysis buffer

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรสารละลาย 200 มิลลิลิตร
CTAB	2 เปอร์เซ็นต์	4 กรัม
Tris-HCl (pH 8.0)	0.1 โมลาร์	20 มิลลิลิตร (1 โม ลาร์ สารละลายตั้งต้น)
EDTA (pH 8.0)	20 มิลลิโมลาร์	8 มิลลิลิตร (0.5 โม ลาร์ สารละลายตั้งต้น)
NaCl	1.4 โมลาร์	16.36 กรัม
2-mercaptoethanol	0.5 เปอร์เซ็นต์	1 มิลลิลิตร
Autoclaved water		

1.3 Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)

สารเคมี	ปริมาตรสารละลาย 200 มิลลิลิตร
Chloroform	192 มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8 มิลลิลิตร

1.4 20 % Polyethylene glycol 6000

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรสารละลาย 200 มิลลิลิตร
Polyethylene glycol	20 เปอร์เซ็นต์	40 กรัม
NaCl	2.5 โมลาร์	14.61 กรัม
Autoclaved water		

1.5 Tris-EDTA buffer (TE buffer)

สารเคมี	ปริมาตรสารละลาย
10 mM Tris-Cl ; pH 8.0	10 มิลลิลิตร
1 mM EDTA ; pH 8.0	2 มิลลิลิตร
Autoclaved water	

2. สารเคมีในการทำพีซีอาร์ และอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.1 10x TBE buffer

สารเคมี	ปริมาตรสารละลาย 500 มิลลิลิตร
Tris base	54 กรัม
EDTA	4.65 กรัม
Boric acid	27.5 กรัม
Autoclaved water	

2.2 Loading dye

สารเคมี	ปริมาตรสารละลาย 50 มิลลิลิตร
Glycerol	25 มิลลิลิตร
Bromophenol blue	0.125 กรัม
0.5 M EDTA	100 ไมโครลิตร
Autoclaved water	

3. สารเคมีในการทำ TLC

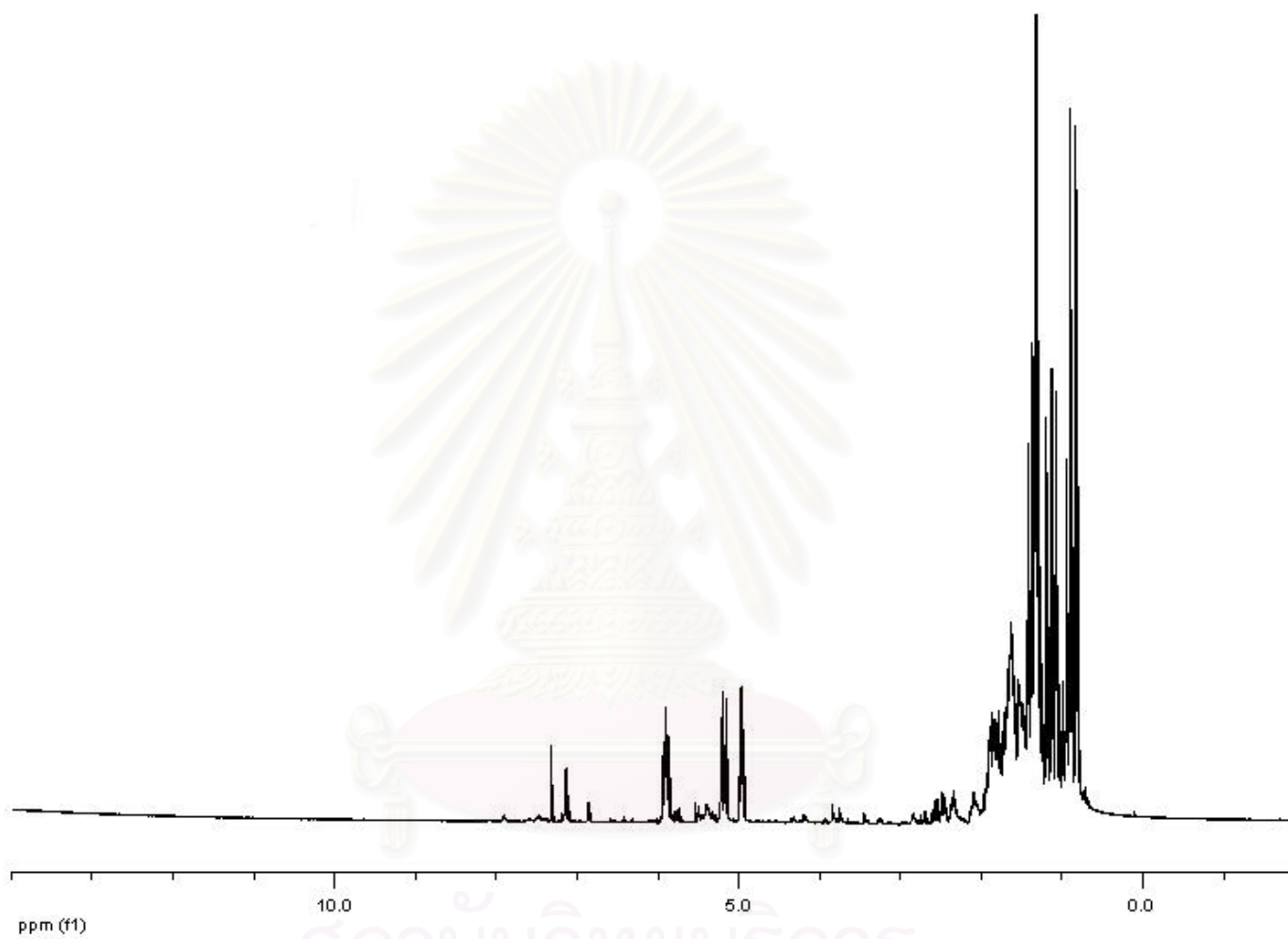
4.1 Vanillin/H₂SO₄

สารเคมี	ปริมาตรสารละลาย 100 มิลลิลิตร
เอทานอล	95 มิลลิลิตร
กรดซัลฟิวริกเข้มข้น	4.5 มิลลิลิตร
วานิลลิน	0.5 กรัม

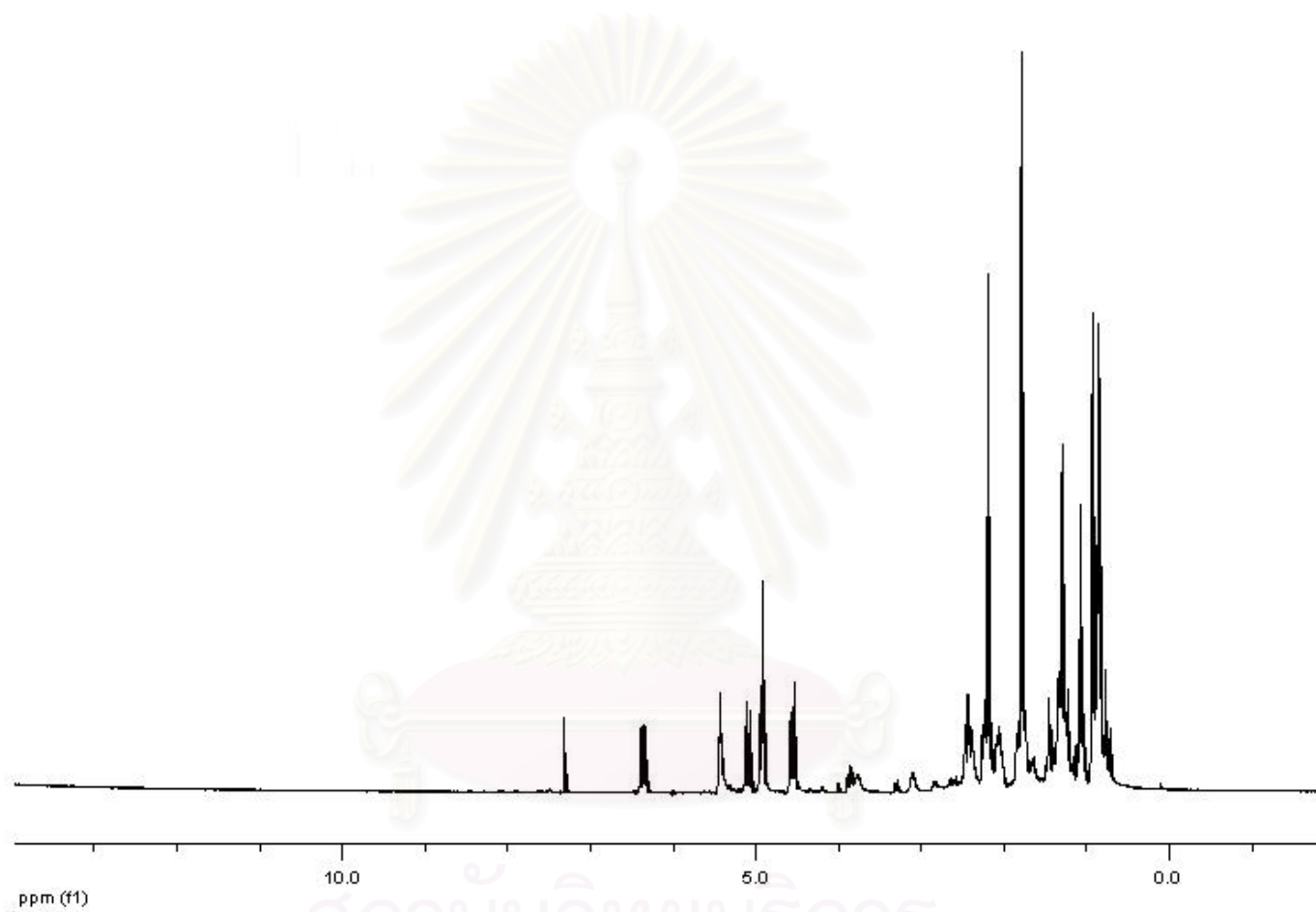


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

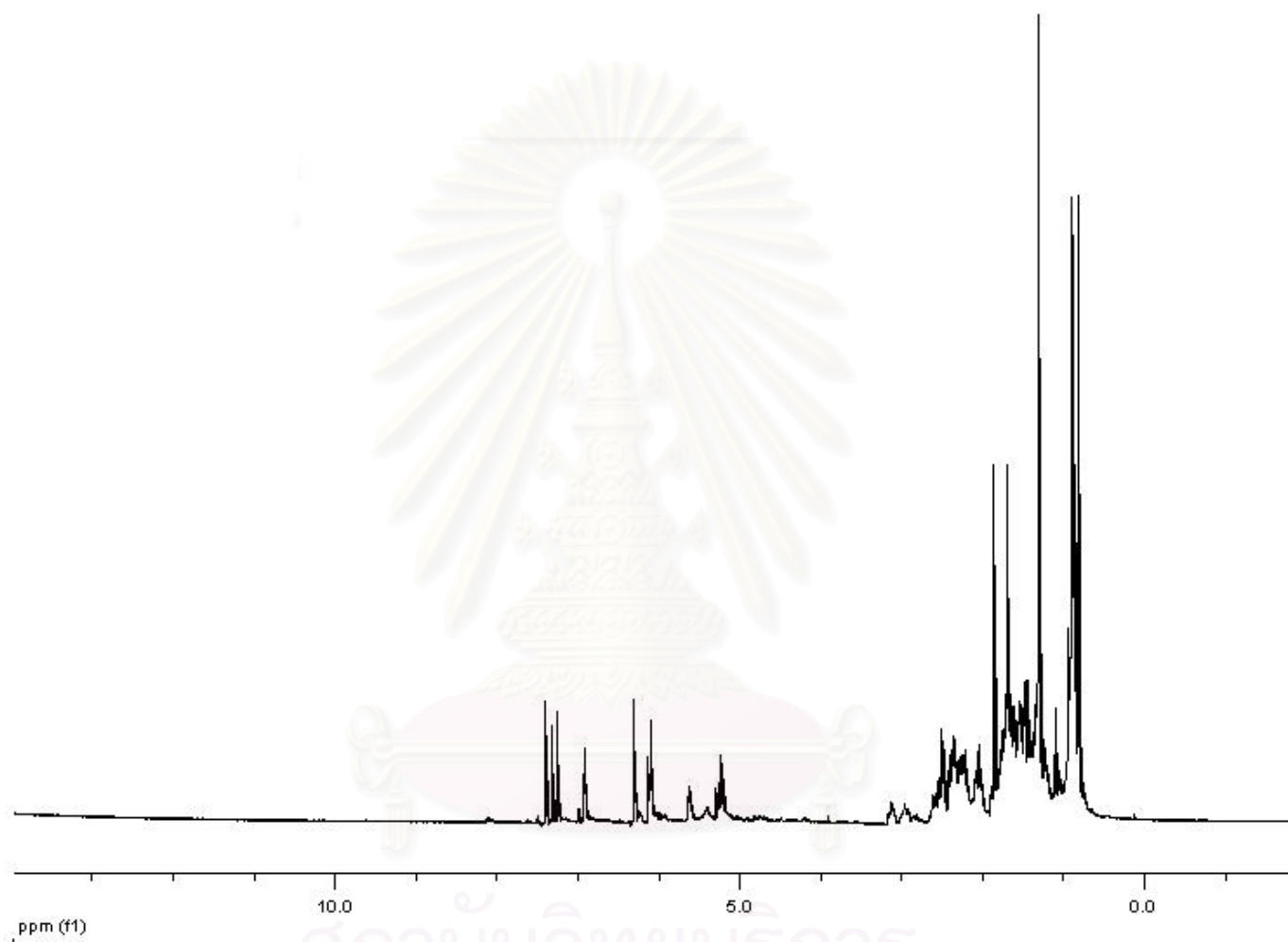
รูปที่ ข.1 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง KY3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



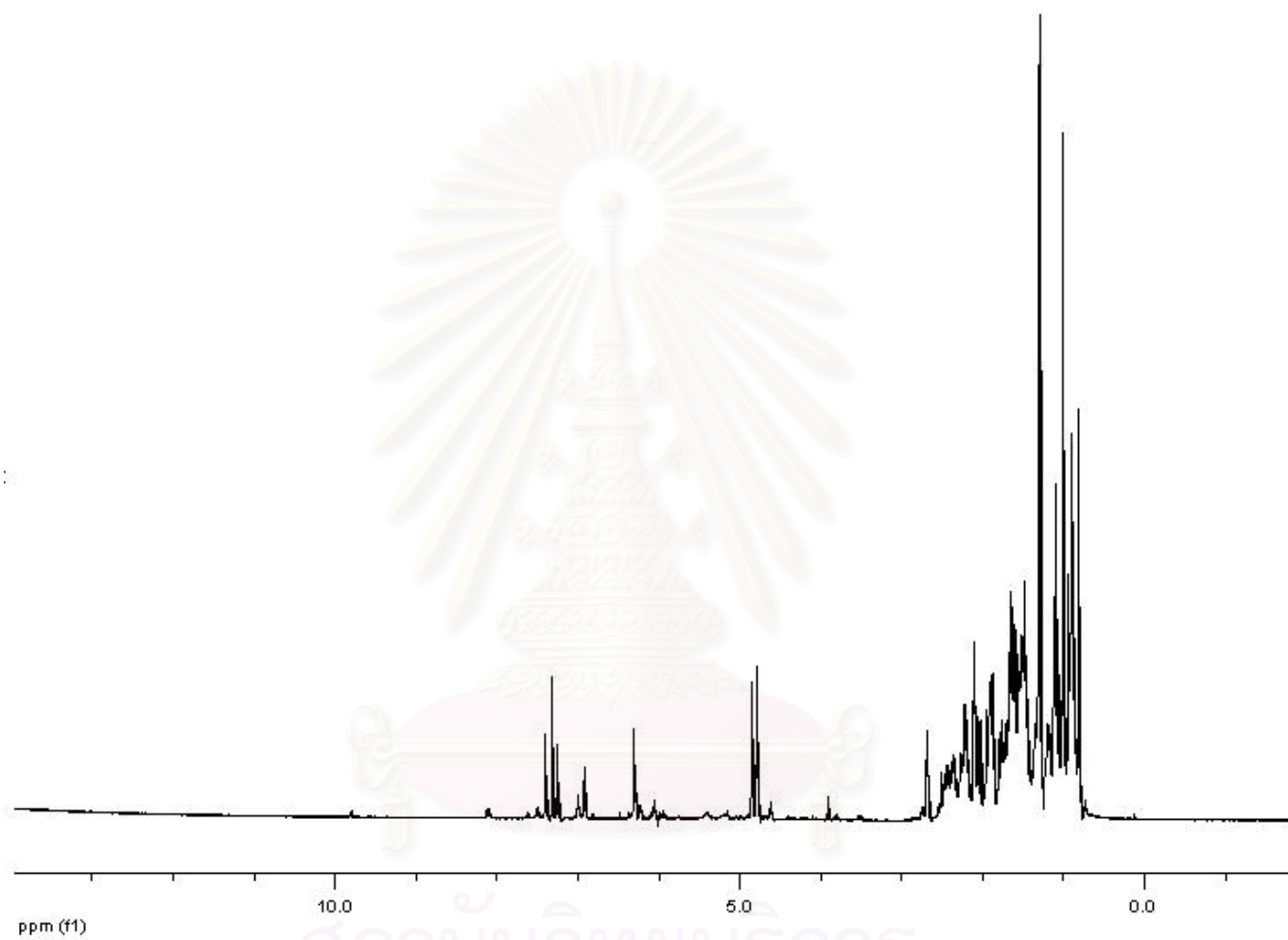
รูปที่ ข.2 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง KY7

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

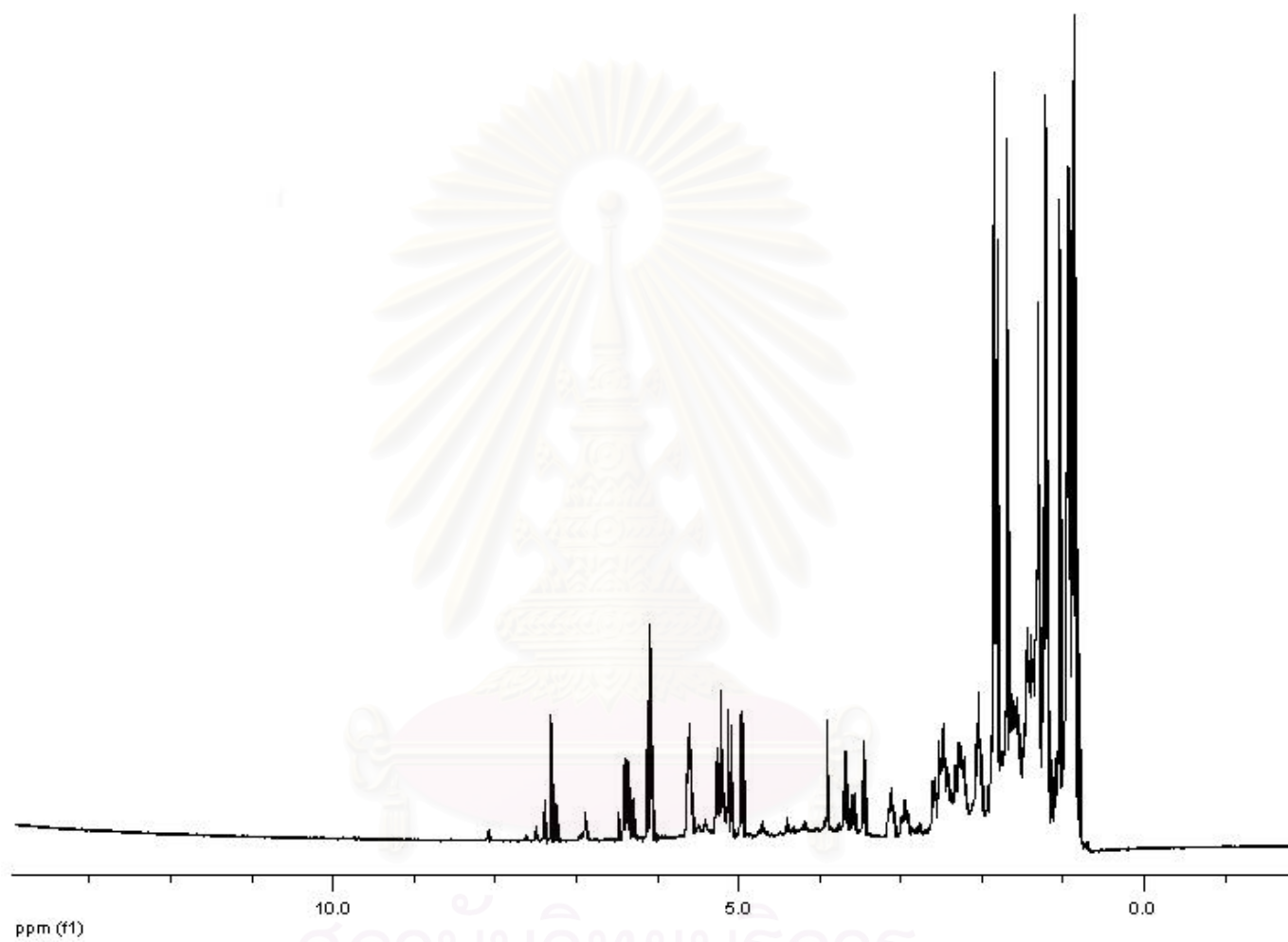


รูปที่ ๓.3 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง P1.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

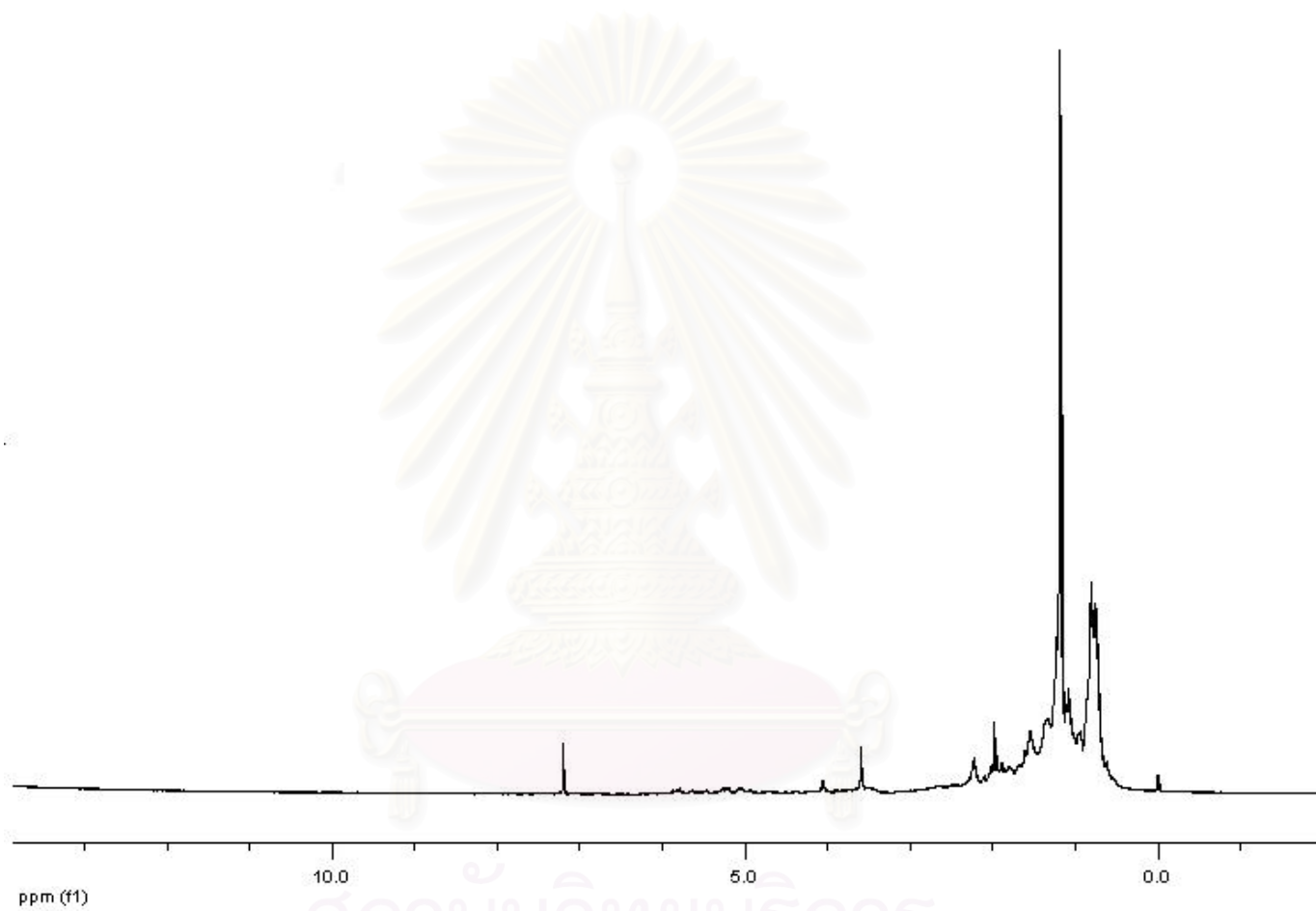


รูปที่ ข.4 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง PK



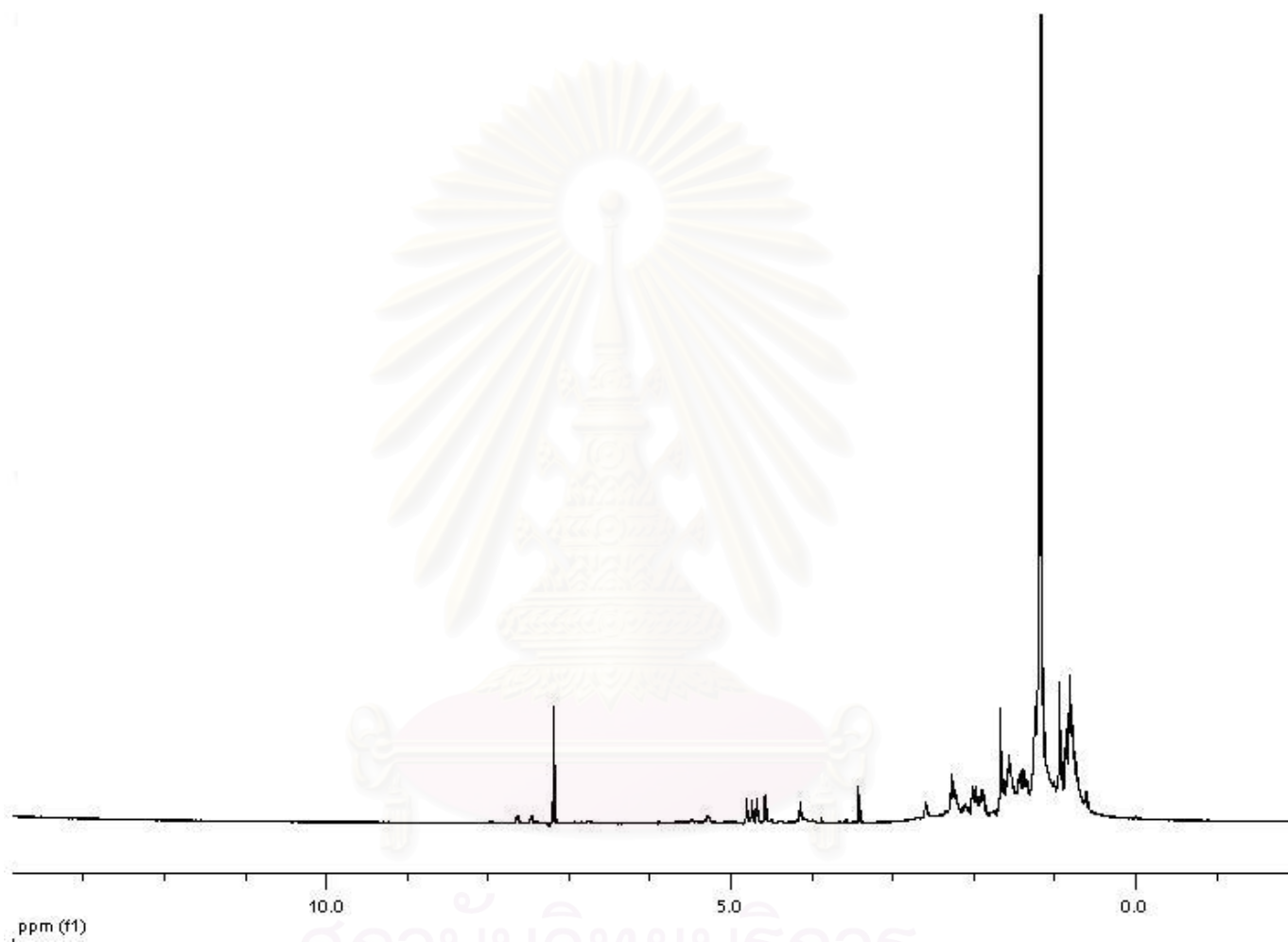
รูปที่ ข.5 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง PU

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

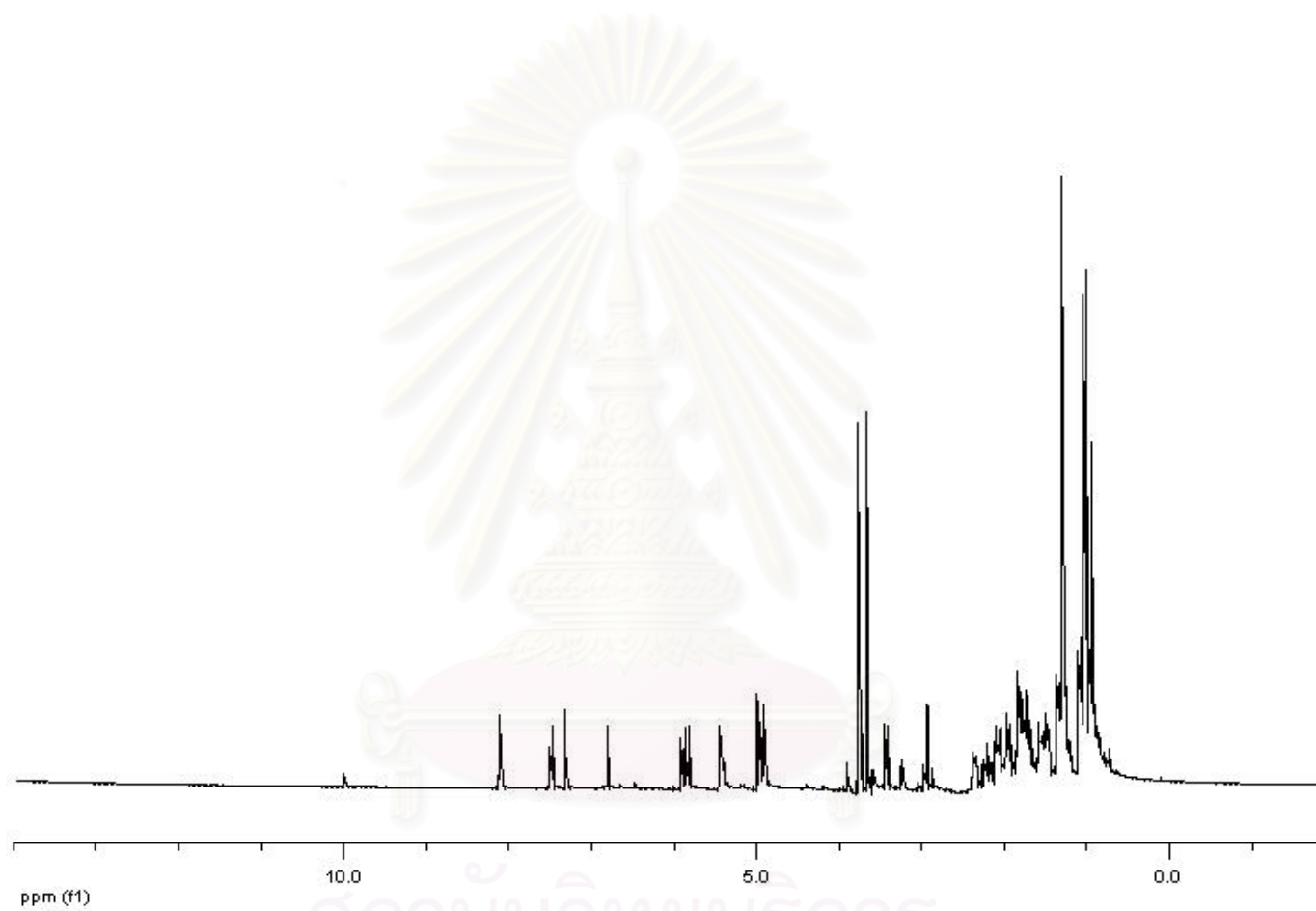


รูปที่ ข.6 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง KA2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

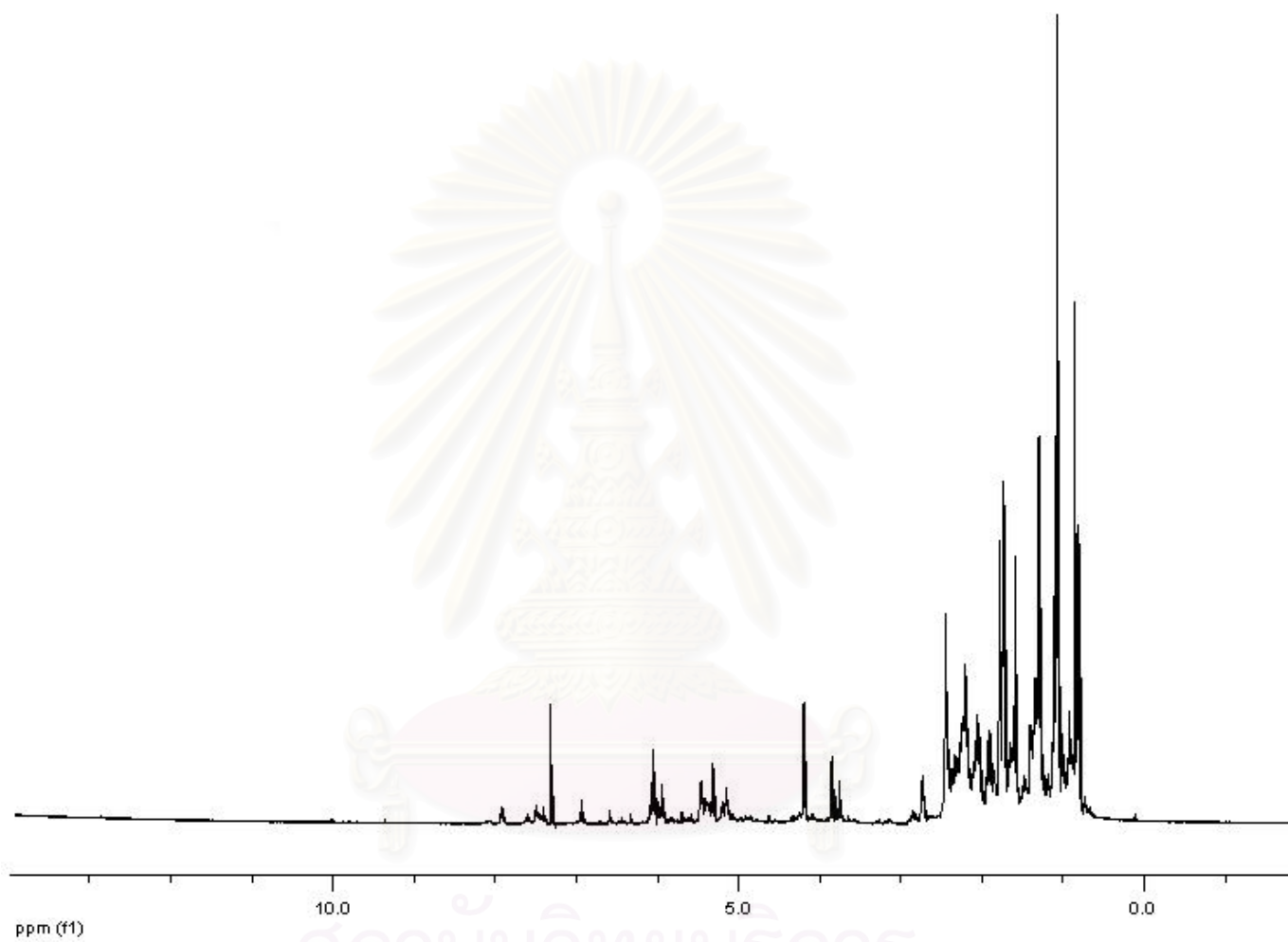


รูปที่ ข.7 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง SB1



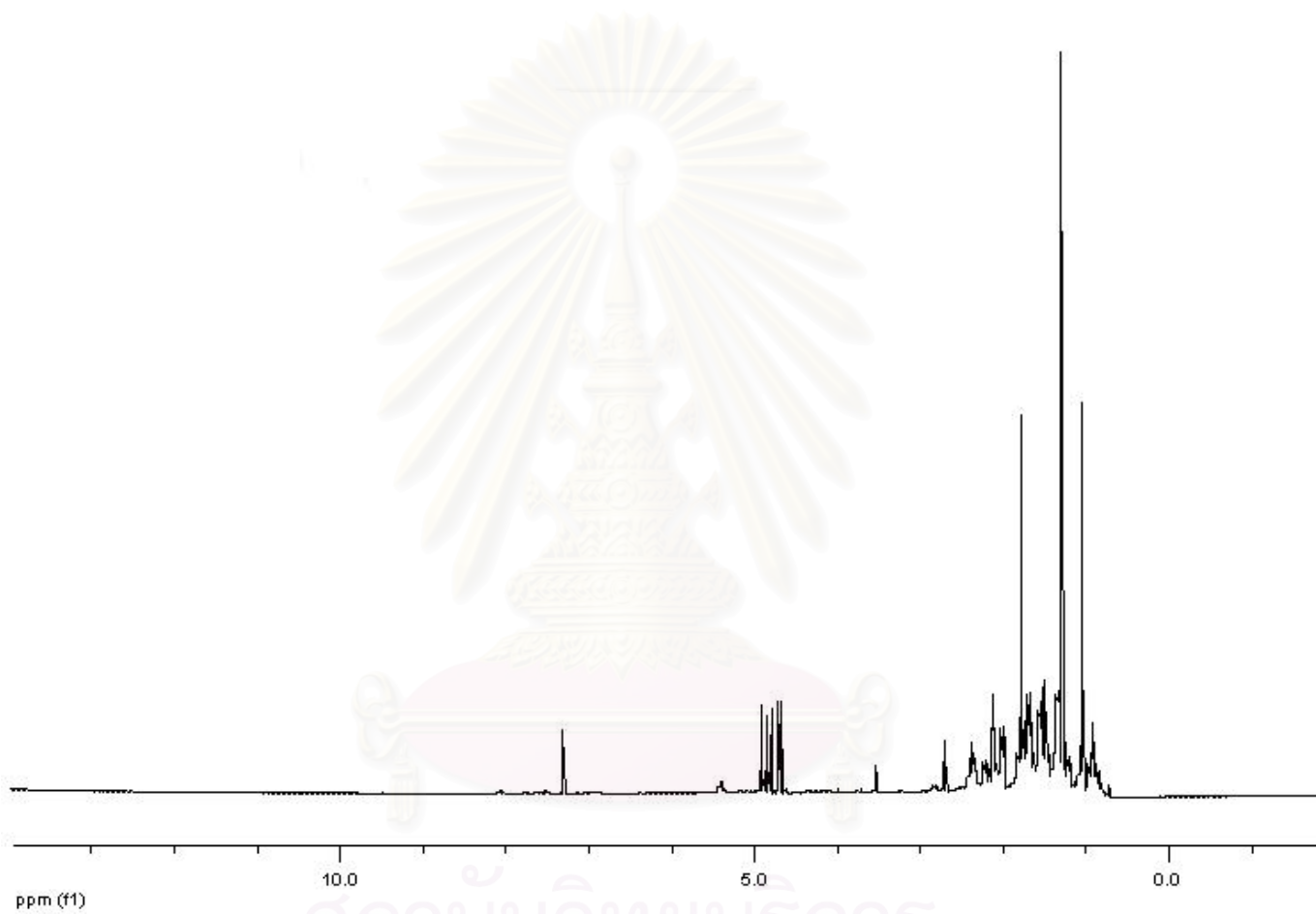
รูปที่ ๗.8 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง TA1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



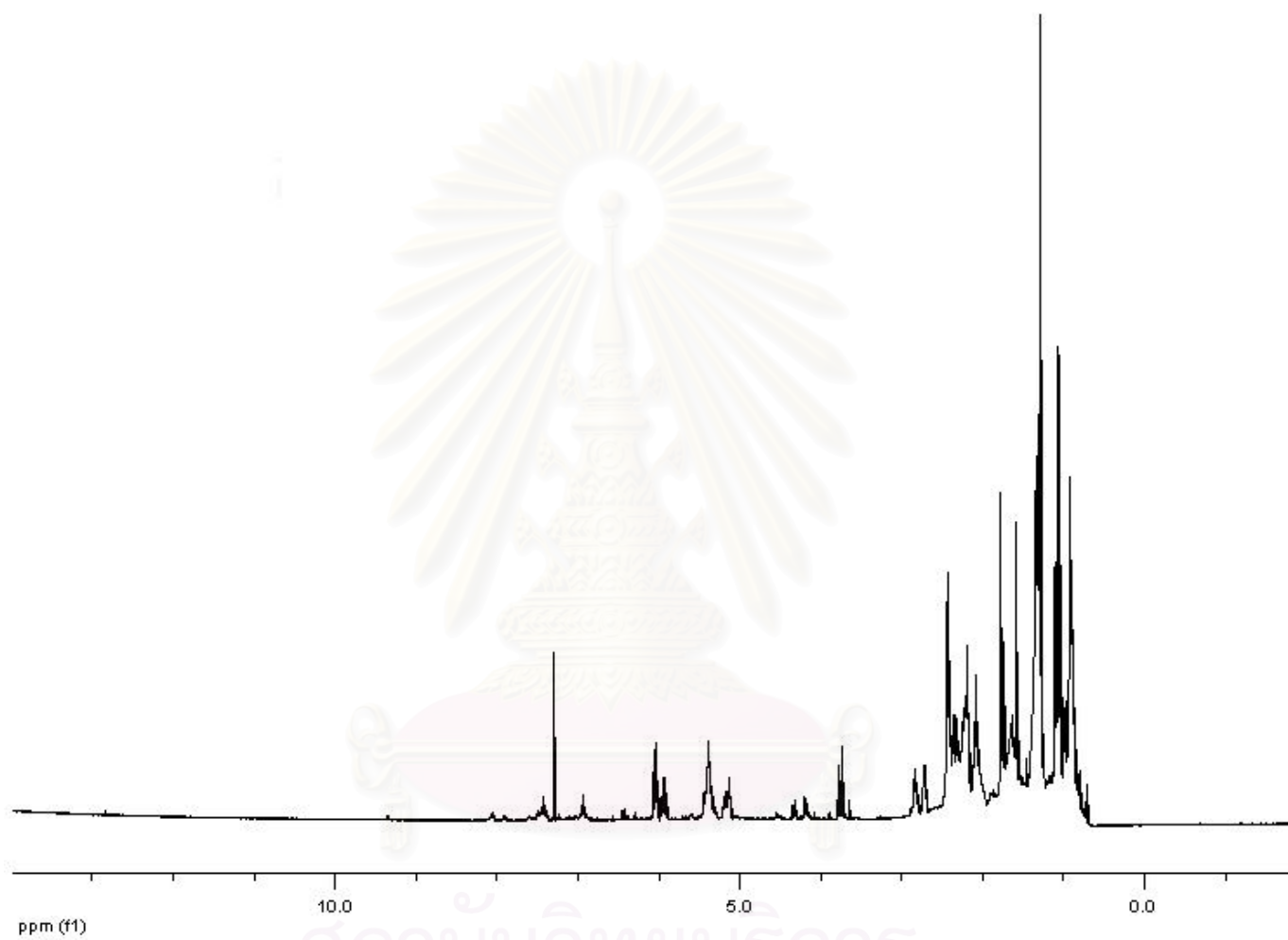
รูปที่ ข.9 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง CHe1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



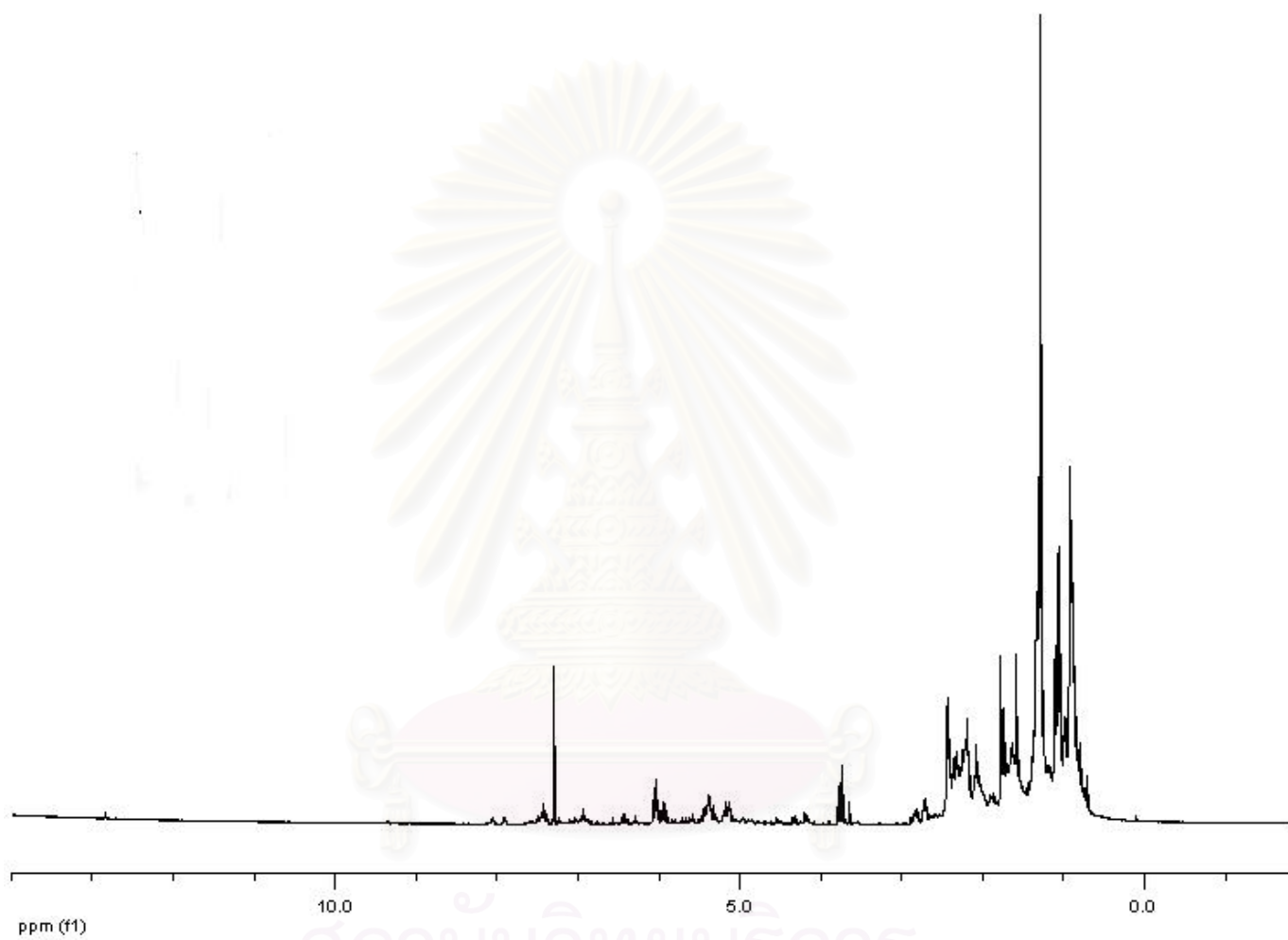
รูปที่ ข.10 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง UD1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



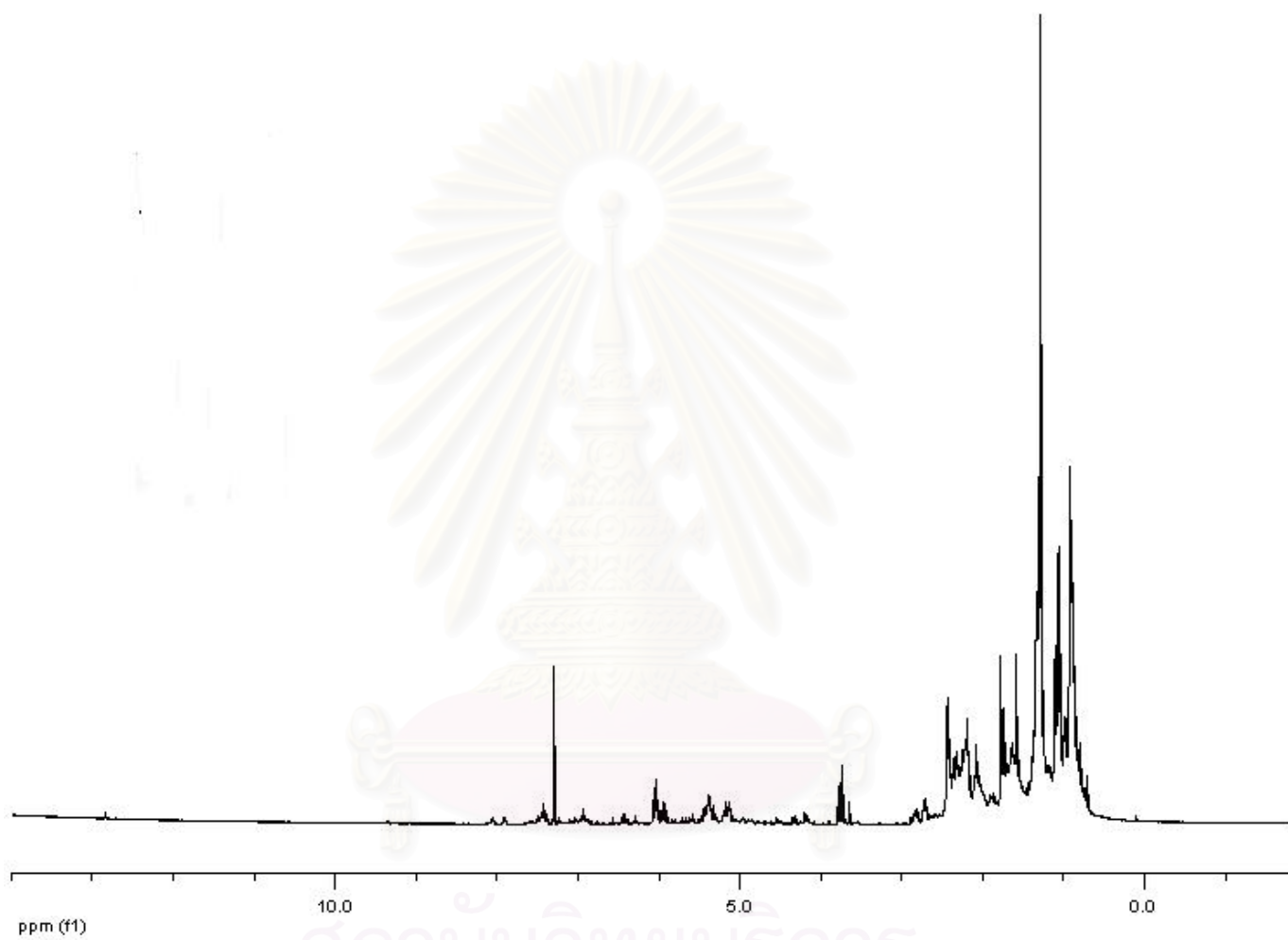
รูปที่ ข.11 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง QA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



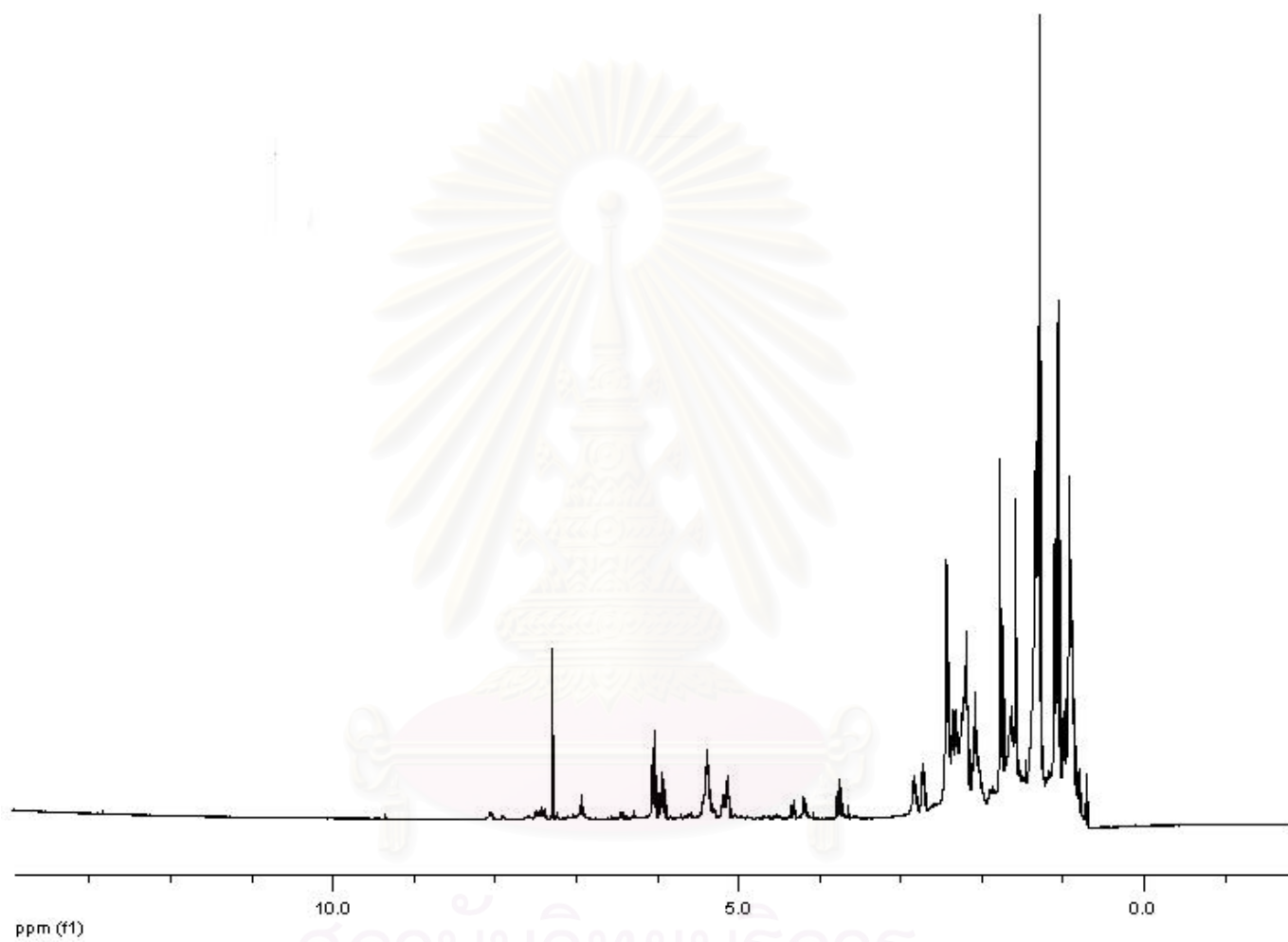
รูปที่ ข.12 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง QB

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



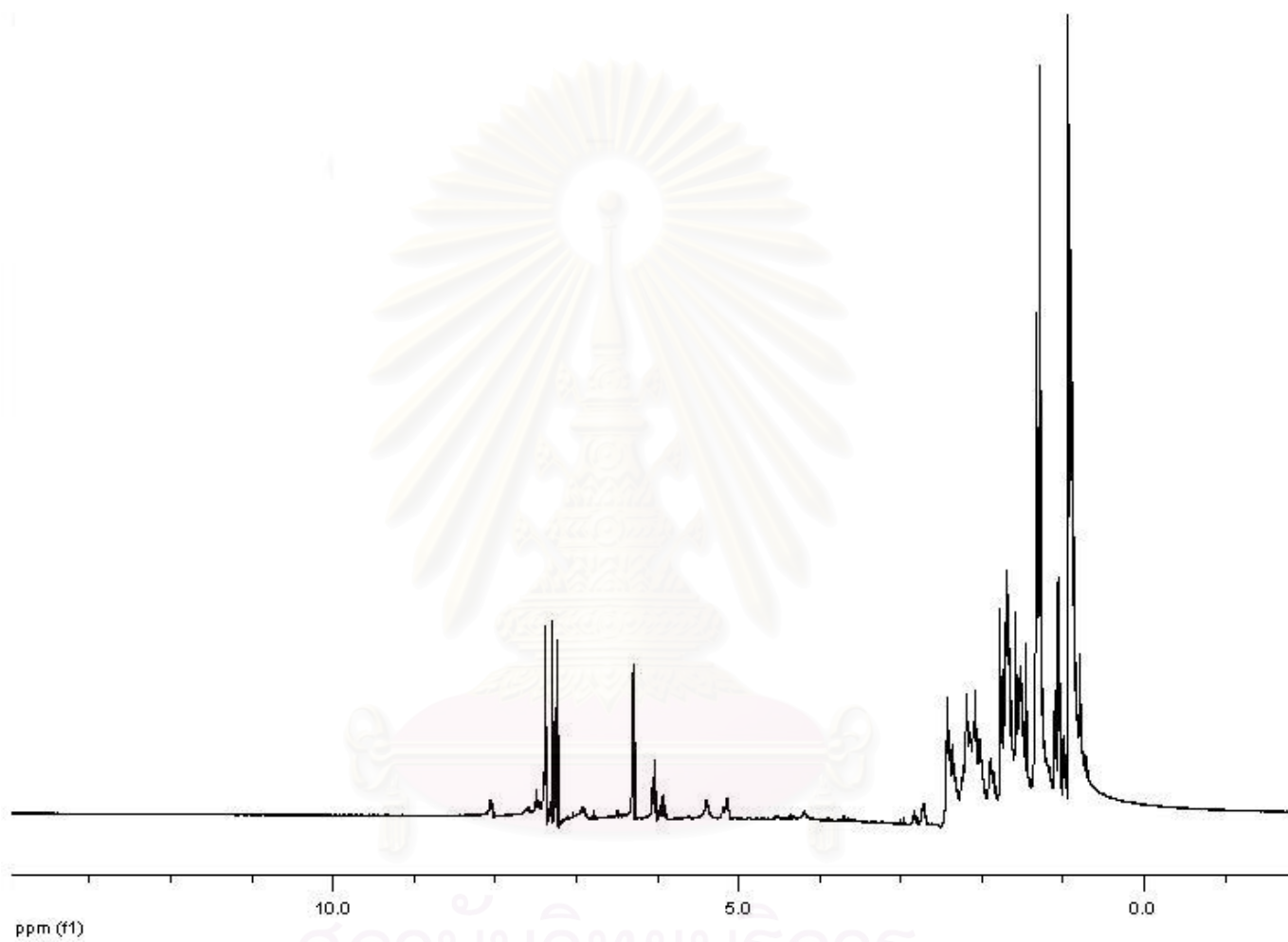
รูปที่ ข.13 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง QC

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



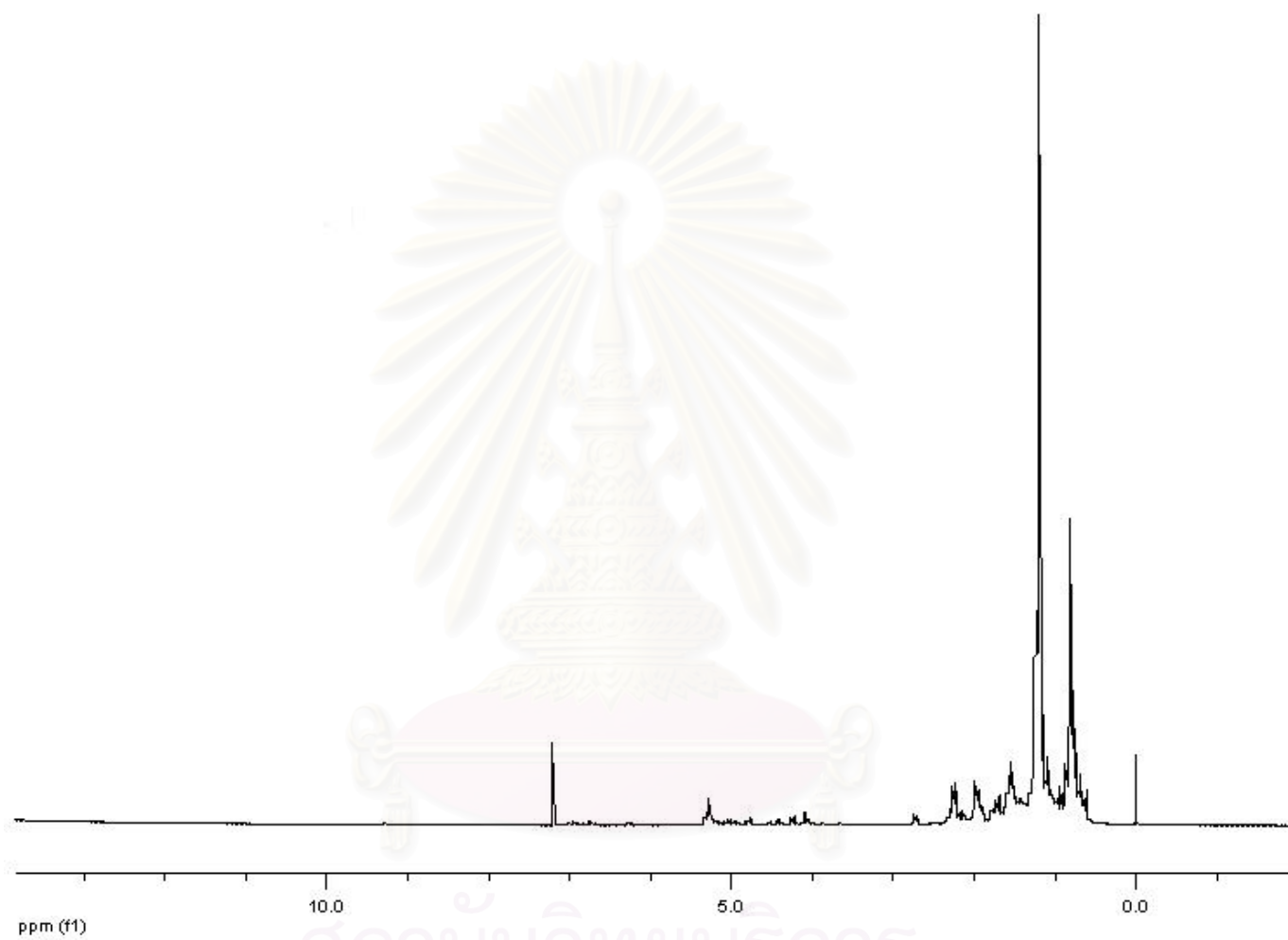
รูปที่ ข.14 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง QD

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



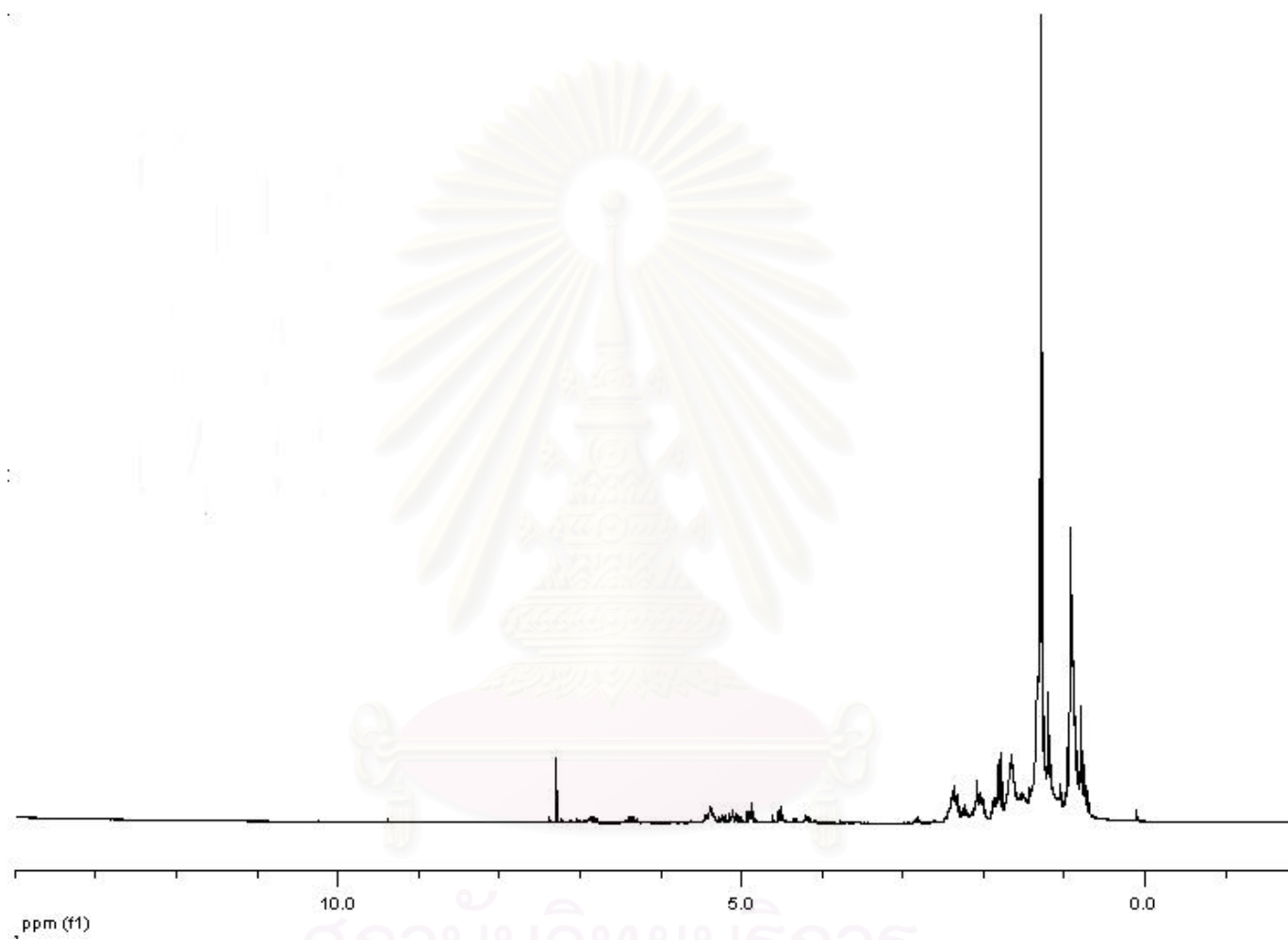
รูปที่ ข.15 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง QE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



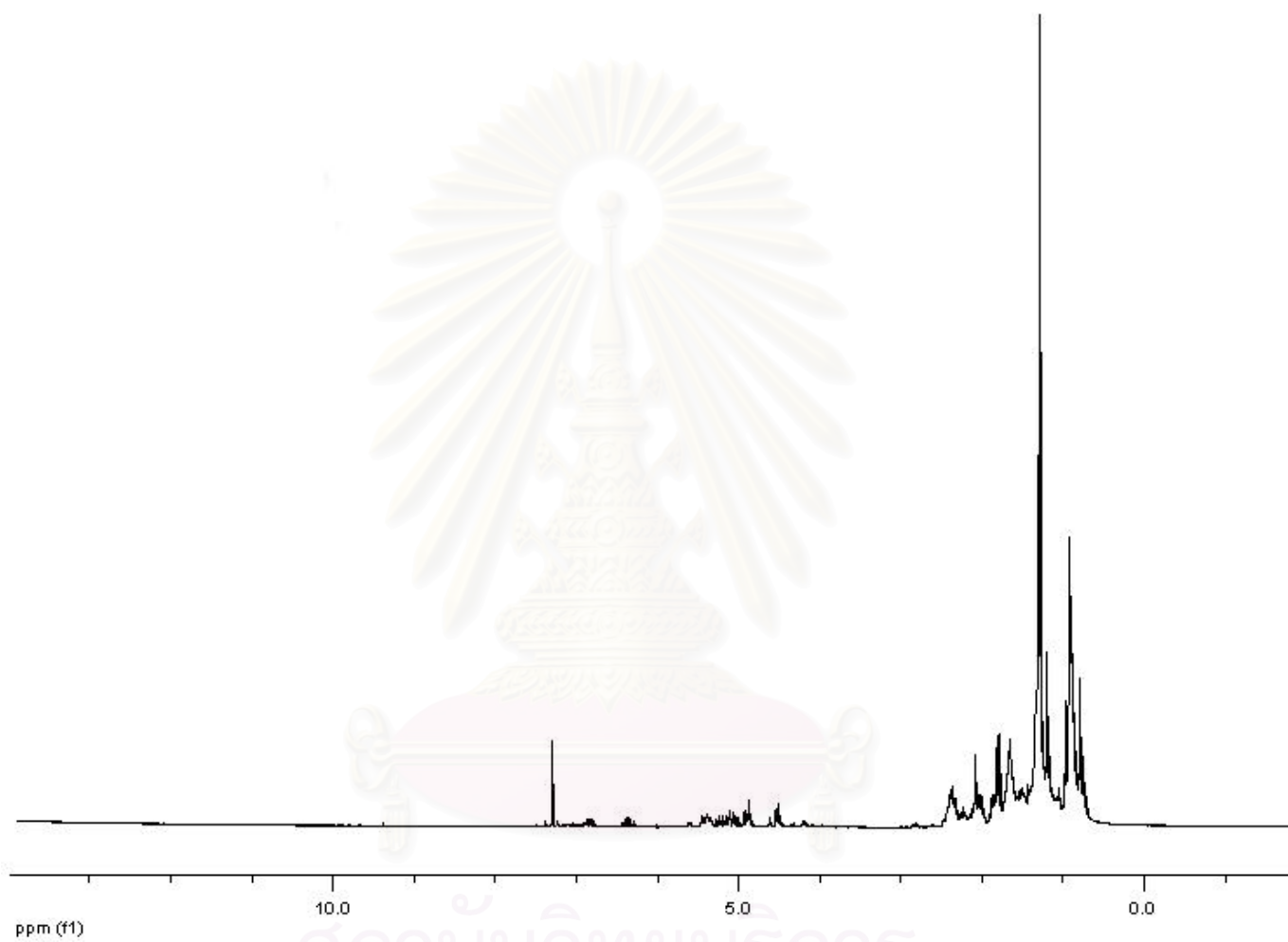
รูปที่ ๑.16 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง QF

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

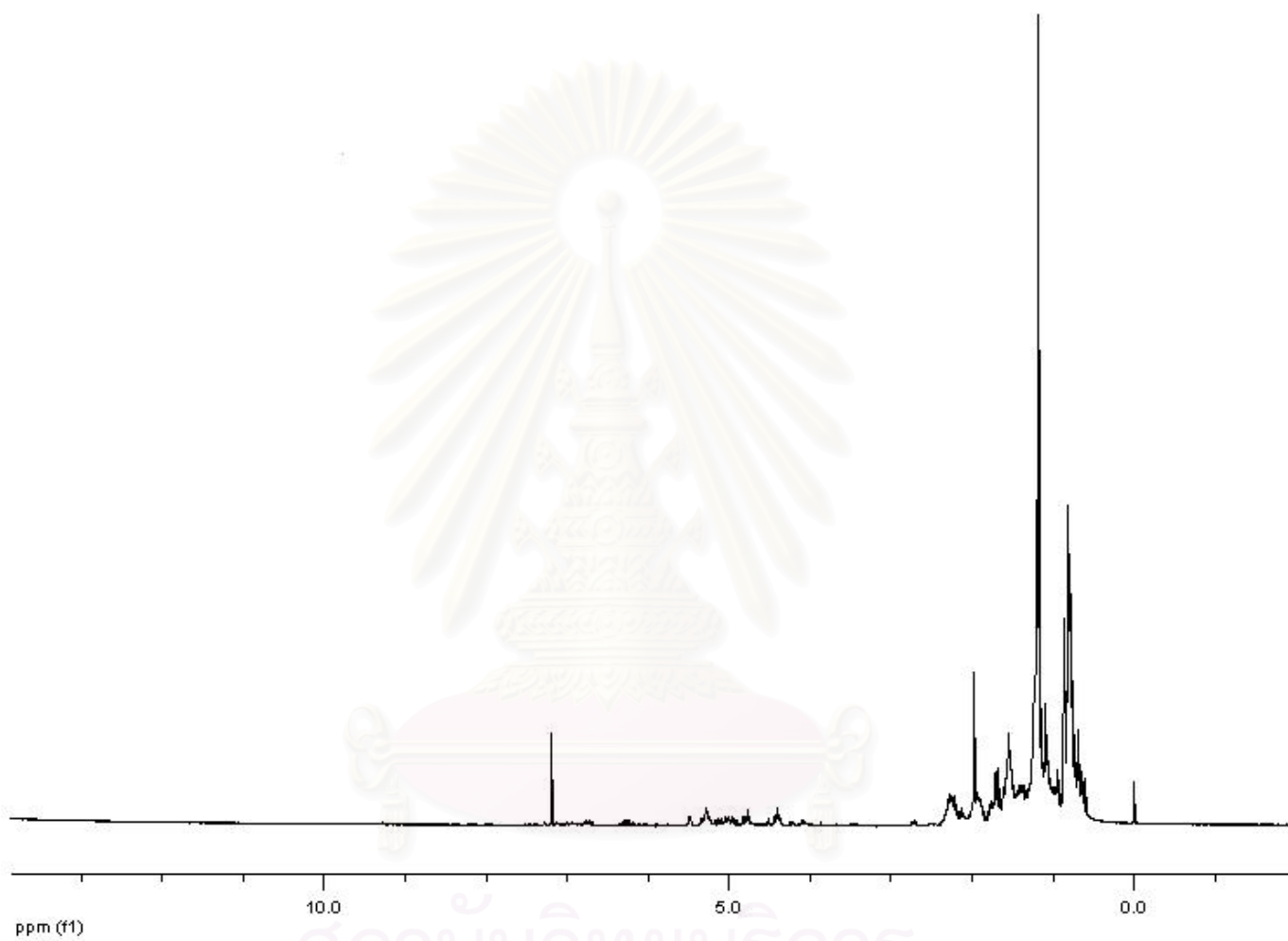


รูปที่ ข.17 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง QG

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ข.18 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง QH



รูปที่ ๑.19 แสดงสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่าง QI

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาว อรวรรณ ชลวานิชย์ เกิดวันที่ 13 เดือนสิงหาคม พ.ศ.2524 จบ
การศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาวิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้เข้าศึกษาในระดับปริญญาโท สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2545



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย