บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมพันธุ์ข่า

นำตัวอย่างข่าที่เก็บมาจากแหล่งปลูกเชิงการค้าใน 5 จังหวัด คือ กำแพงเพชร อุตรดิตถ์ นครสวรรค์ ลพบุรี และกาฬสินธุ์ รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง นำมาปลูกในสภาพแวดล้อมและการดูแลรักษาแบบเดียวกัน (คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) เป็นระยะเวลา 1 ปี พบว่าทุกตัวอย่างสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ จากนั้นบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนเหนือต้นและเหง้า ดังตารางที่ 5

ภาพที่ 1 สภาพแปลงปลูกของข่า ทั้ง 20 ตัวอย่าง ที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(1) (2) (3)

(4) (5) (6)

ภาพที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะของสีเหง้าข่า ในข่า 6 สายพันธุ์ (1) ข่าแดง (2) ข่าหยวก (3) ข่าสาคู (4) ข่าเหลือง (5) ข่าป่า (6) ข่าลิง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3 ข่าแดง จ.อุตรดิตถ์ ตัวอย่างที่ 1(ซ้าย) ข่าหยวก จ. อุตรดิตถ์ ตัวอย่างที่ 2 (ขวา)

ภาพที่ 4 ข่าแดง จ.อุตรดิตถ์ตัวอย่างที่ 3 (ซ้าย) ข่าสาคู จ.อุตรดิตถ์ ตัวอย่างที่ 4 (ขวา)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 5 ข่าหยวก จ.อุตรดิตถ์ตัวอย่างที่ 5 (ซ้าย) ข่าแดง จ.อุตรดิตถ์ตัวอย่างที่ 6 (ขวา)

ภาพที่ 6 ข่าป่า จ.อุตรดิตถ์ตัวอย่างที่ 7 (ซ้าย) ข่าแดง จ.อุตรดิตถ์ตัวอย่างที่ 8 (ขวา)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 7 ข่าเหลือง จ.อุตรดิตถ์ตัวอย่างที่ 9 (ซ้าย) ข่าหยวก จ.กำแพงเพชร ตัวอย่างที่ 10 (ขวา)

ภาพที่ 8 ข่าหยวก จ.อุตรดิตถ์ตัวอย่างที่ 11 (ซ้าย) ข่าแดง จ.อุตรดิตถ์ตัวอย่างที่ 12 (ขวา)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 9 ข่าหยวก จ.นครสวรรค์ ตัวอย่างที่ 13 (ซ้าย) ข่าหยวก จ. นครสวรรค์ ตัวอย่างที่ 14 (ขวา)

ภาพที่10 ข่าลิง จ.นครสวรรค์ ตัวอย่างที่ 15 (ซ้าย) ข่าแดง จ. นครสวรรค์ ตัวอย่างที่ 16 (ขวา)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 11 ข่าแดง จ.นครสวรรค์ ตัวอย่างที่ 17 (ซ้าย) ข่าแดง จ.ลพบุรี ตัวอย่างที่ 18 (ขวา)

ภาพที่ 12 ข่าแดง จ.ลพบุรี ตัวอย่างที่ 19 (ซ้าย) ข่าลิง จ. กาฬสินธุ์ ตัวอย่างที่ 20 (ขวา)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข่า

ชื่อ	สีของตาเหง้า	เส้นผ่านศูนย์กลางเหง้า (เซนติเมตร)	ความสูงทรงพุ่ม (เซนติเมตร)	ขนาดใบ (เซนติเมตร)		แหล่งที่มา
				ความกว้าง	ความยาว	
1. ข่าแดง	สีแดง	3.5 – 4.0	90-100	9.0	6.5	พันธุ์ปลูก จ.อุตรดิตถ์
2. ข่าหยวก	สีชมพู-ขาว	4.0 – 5.0	120-130	5.5	32	พันธุ์ปลูก จ.อุตรดิตถ์
3. ข่าแดง	สีแดง	3.0-3.5	90-100	8.5	31	พันธุ์ปลูก จ.อุตรดิตถ์
4 ข่าสาคู	สีแดง-ชมพู	2.0-2.5	100-110	8.0	27	พันธุ์ป่า จ.อุตรดิตถ์
5. ข่าหยวก	สีชมพู-ขาว	3.0 – 3.5	90-100	4.5	30	พันธุ์ปลูก จ.อุตรดิตถ์
6. ข่าแดง	สีแดง	3.0-3.5	80-90	4.5	21	พันธุ์ปลูก จ.อุตรดิตถ์
7. ข่าป่า	สีแดง-ชมพู	2.5-3.0	90-100	6.0	27	พันธุ์ป่า จ.อุตรดิตถ์
8. ข่าแดง	สีแดง	4.0-4.5	115-120	7.5	29	พันธุ์ปลูก จ.อุตรดิตถ์
9. ข่าเหลือง	สีแดง-เหลือง	3.0-3.5	90-100	6.0	25	พันธุ์ป่า จ.อุตรดิตถ์
10. ข่าหยวก	สีแดง-ชมพู	4.5-5.0	90-100	7.0	28	พันธุ์ปลูก จ.กำแพงเพชร
11. ข่าหยวก	สีแดง-ชมพู	4.5 - 5.0	100-110	7.0	28	พันธุ์ปลูก จ.กำแพงเพชร
12. ข่าหยวก	สีแดง-ชมพู	4.5 - 5.0	100-110	6.8	26	พันธุ์ปลูก จ.นครสวรรค์
13. ข่าหยวก	สีแดง-ชมพู	4.5-5.0	100-110	7.0	28	พันธุ์ปลูก จ.นครสวรรค์
14. ข่าหยวก	สีแดง-ชมพู	4.5-5.0	90-100	7.0	28	พันธุ์ปลูก จ.นครสวรรค์
15. ข่าลิง	สีแดง-ชมพู	2.0-2.5	120-130	5.0	36	พันธุ์ป่า จ.นครสวรรค์
16. ข่าแดง	สีแดง	3.5 – 4.0	145-150	9.0	30	พันธุ์ปลูก จ.นครสวรรค์
17. ข่าแดง	สีแดง	4.0-4.5	110-125	8.0	39	พันธุ์ปลูก จ.ลพบุรี
18. ข่าแดง	สีแดง	4.0-4.5	110-125	8.0	39	พันธุ์ปลูก จ.ลพบุรี
19. ข่าแดง	สีแดง-ชมพู	2.5 – 3.0	145-150	5.5	26.5	พันธุ์ปลูก จ.กำแพงเพชร
20. ข่าลิง	สีแดง-ชมพู	1.0-1.5	50-60	2.5	15	พันธุ์ป่า จ.กาฬสินธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การสกัดสาร 1’ acetoxychavicol acetate ในข่า

2.1 สารสกัดหยาบจากข่า

เมื่อนำข่าทั้ง 20 ตัวอย่างมาสกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane พบว่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักแห้งเฉลี่ย มีค่าเท่ากับ 6.3 % ส่วนในด้านของคุณสมบัติทางกายภาพสารคล้ายคลึงกันทุกตัวอย่าง คือ มีลักษณะเป็นน้ำมันข้นเหนียว สีน้ำตาลเหลือง มีกลิ่นเผ็ดร้อนของข่า เมื่อสัมผัสผิวหนังโดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่ออ่อนจะมีอาการแสบร้อน ดังภาพที่ 13

ภาพที่ 13 ลักษณะของสารสกัดหยาบจากข่า

2.2 การแยกสารออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Column Chromatography

จากผลการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบของข่า พบว่า สาร L14 และ L15 มีปริมาณสาร 1´ acetoxychavicol acetate มากที่สุด ดังนั้นจึงใช้ สาร L14 และ L15 เป็นตัวประมาณปริมาณของสาร 1´ acetoxychavicol acetate โดยการสกัดแยกสาร L14 และ L15 ด้วยวิธี Column Chromatography ในข่าทั้ง 20 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของข่าได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ข่าแดง จาก จ.กำแพงเพชร (ตัวอย่างที่ 19) ให้ปริมาณ L14 รวมกับ L15 มากที่สุดคือ 69.68% ของสารสกัดหยาบ กลุ่มที่ 2 ข่าเหลือง จาก จ.อุตรดิตถ์ (ตัวอย่างที่ 9) และข่าแดง จ.ลพบุรี (ตัวอย่างที่ 17) ให้ปริมาณ L14 รวมกับ L15 67.34% และ 66.76% ของสารสกัดหยาบ ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 ข่าแดง ข่าหยวก ข่าลิง และ ข่าป่า จาก จ.อุตรดิตถ์ จ.นครสวรรค์ จ.กำแพงเพชร จ. ลพบุรีและจ. กาฬสินธุ์ (ตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 15, 16,18 และ 20) ให้ปริมาณ L14 รวมกับ L15 59.47%, 58.03%, 59.02%, 54.02%, 54.59%, 59.84%, 59.08%, 54.08% , 61.57%, 56.52%, 58.91%, 61.74% และ 54.02% ตามลำดับ กลุ่มที่มีน้อยที่สุดคือกลุ่มของข่าหยวกจาก จ. นครสวรรค์ และ ข่าสาคู จาก จ. อุตรดิตถ์ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 41.90%- 52.21% ของสารสกัดหยาบ (ตารางที่ 6) เปอร์เซ็นต์ L14 รวมกับ L15 ของทั้ง 4 กลุ่ม ที่แยกได้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% และสมบัติทางกายภาพของ L14 รวมกับ L15 มีลักษณะเป็นน้ำมันมีความหนืด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สีเหลืองใส มีกลิ่นฉุนเผ็ดร้อน เมื่อสัมผัสผิวหนังรู้สึกแสบร้อน โดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่ออ่อน (ภาพที่ 14)

ภาพที่ 14 ลักษณะของสาร L14 รวมกับ L15 ที่แยกด้วยวิธี Column Chromatography

ตารางที่ 6 ปริมาณสาร L14 รวมกับ L15 ที่แยกด้วยวิธี Column Chromatography

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	เปอร์เซ็นต์สาร L14 รวมกับ L15 ต่อสารสกัดหยาบ
1. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก จ.อุตรดิตถ์	59.47c[1/]
2. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก จ.อุตรดิตถ์	58.03c
3. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก จ.อุตรดิตถ์	59.04c
4 ข่าสาคู	พันธุ์ป่า จ.อุตรดิตถ์	51.38d
5. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก จ.อุตรดิตถ์	54.02c
6. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก จ.อุตรดิตถ์	54.59c
7. ข่าป่า	พันธุ์ป่า จ.อุตรดิตถ์	59.84c
8. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก จ.อุตรดิตถ์	59.08c
9. ข่าเหลือง	พันธุ์ป่า จ.อุตรดิตถ์	67.34b
10. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก จ.กำแพงเพชร	54.08c
11. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก จ.กำแพงเพชร	56.52c
12. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก จ.นครสวรรค์	51.37d
13. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก จ.นครสวรรค์	52.21d
14. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก จ.นครสวรรค์	41.90d
15. ข่าลิง	พันธุ์ป่า จ.นครสวรรค์	61.57c

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	เปอร์เซ็นต์สาร L14 รวมกับ L15 ต่อสารสกัดหยาบ
16. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก จ.นครสวรรค์	58.91c
17. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก จ.ลพบุรี	66.76b
18. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก จ.ลพบุรี	61.73c
19. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก จ.กำแพงเพชร	69.68a
20. ข่าลิง	พันธุ์ป่า จ.กาฬสินธุ์	54.02c

[1/] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

3. การเปรียบเทียบวิธีการสกัด ดีเอ็นเอ 3 วิธีการ

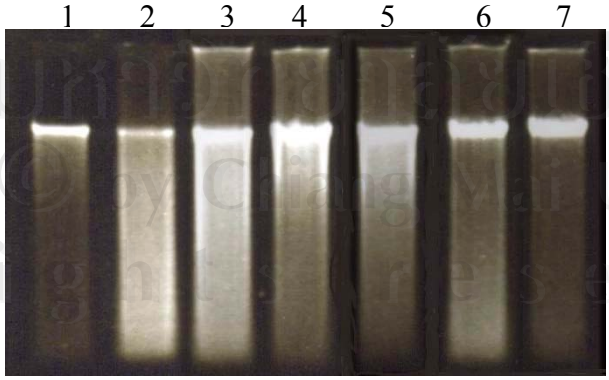
วิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 3 วิธีคือ

1) SDS Extraction (Kuntapanom and Ikeda, 1998)

2) การสกัดด้วย Master Pure™ Plant Leaf DNA Purification Kit (Cat Nos. MPP92010 and MPP92100) ของบริษัท EPI CENTRE

3) วิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1990) (อุไรวรรณ, 2540)

พบว่าวิธีการที่ให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและปริมาณมากที่สุดคือวิธีที่ 3 วิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1990) (อุไรวรรณ, 2540) ส่วนวิธีที่ 1 และ 2 ได้ดีเอ็นเอที่ไม่บริสุทธิ์ และปริมาณน้อย ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 เปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 3 วิธีการ 1=DNA standard 100 ng, 2-3= SDS extraction, 4-5= ชุด kit, 6-7= Doyle and Doyle

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมและขั้นตอนในการทำ AFLP

4.1 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ผลการทดสอบสภาวะในการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I ใน 3 สภาวะ พบว่า วิธีการที่ 1 ให้แถบดีเอ็นเอดีที่สุด คือการตัดด้วย *Mse*I บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม *Eco*RI และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รองลงมา คือ วิธีการที่ 2 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและจำนวนแถบใกล้เคียงกับวิธีที่ 1 โดยตัดด้วยเอนไซม์ *Mse*I และ *Eco*RI พร้อมกัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ส่วนวิธีการที่ 3 คือ เติมเอนไซม์ทั้ง 2 พร้อมกันแต่บ่มที่ 2 อุณหภูมิ คือ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง และ ต่อด้วย 65 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงนั้น ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอเลย ดังภาพที่ 18 ดังนั้น ในการทดลองครั้งนี้ จึงทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I ตามวิธีการที่ 1

ภาพที่ 16 ลักษณะของแถบดีเอนเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Mse*I และ *Eco*RI ภายใต้ 3 สภาวะ

1 คือ การตัดด้วยเอนไซม์ *Mse*I และ *Eco*RI พร้อมกันแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

2 คือ การตัดด้วย *Mse*I บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม *Eco*RI และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3 คือ เติมเอนไซม์ทั้ง 2 พร้อมกันแต่บ่มที่ 2 อุณหภูมิ คือ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง และ ต่อด้วย 65 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำ AFLP

การทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำ Selective Amplification โดยทดสอบคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 128 คู่และพบว่ามีคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข่าได้จำนวน 105 คู่ และทำการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่สร้างแถบดีเอ็นเอมากและชัดเจน (ภาพที่ 17) ได้จำนวน 50 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 7

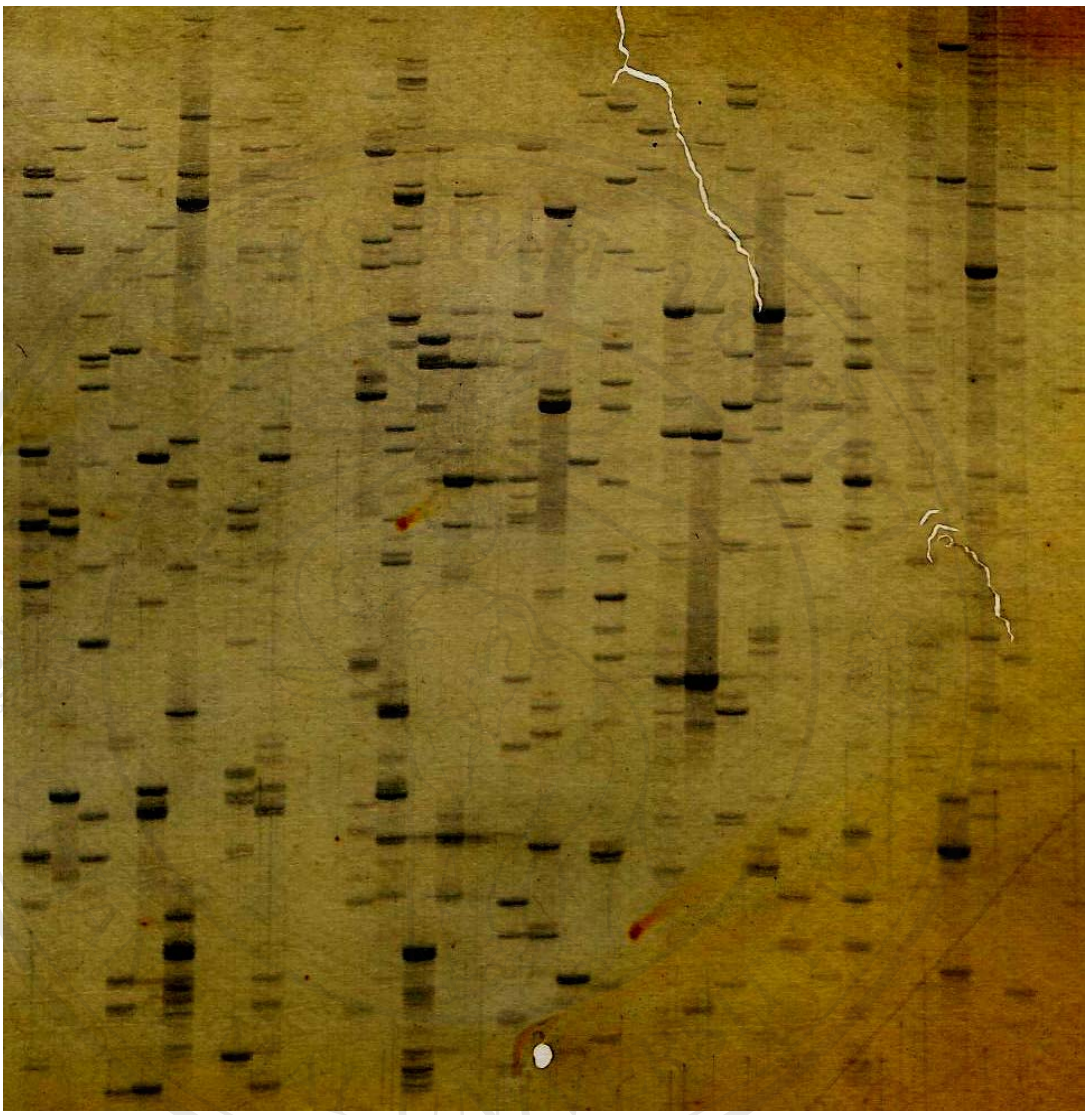
ตารางที่ 7 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข่า

*Eco*RI	*Mse*I Primer							
Primer	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AT	X	X	---	X	X	---	X	X
E-AC	X	X	---	X	X	X	X	---
E-AG	X	X	---	X	X	X	---	X
E-AAC	X	---	X	X	X	X	X	X
E-AAG	X	X	X	X	X	X	---	X
E-ACA	X	X	---	X	X	X	X	X
E-ACC	X	X	X	---	X	X	X	X
E-ACG	X	X	X	X	X	X	X	X
E-ACT	X	X	X	X	X	X	X	X
E-AGC	X	X	---	X	X	X	---	X
E-AGG	X	X	X	X	X	X	X	X
E-AGA	X	X	---	X	X	X	---	X
E-AGT	X	X	---	X	X	X	---	X
E-ATT	X	X	---	X	X	---	---	X
E-ATG	X	X	---	---	X	X	X	X
E-ATC	X	X	---	---	X	X	X	X

หมายเหตุ X คือ คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

คู่ไพรเมอร์ที่มีแถบสีชมพู คือ คู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกสำหรับขั้นตอน Selective Amplification จำนวน 50 คู่ไพรเมอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 17 ตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอของข่า ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในขั้นตอน Selective-Amplification ด้วยคู่ไพรเมอร์จากตารางที่ 7

เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ทั้ง 50 คู่ มาทดสอบกับข่าทั้ง 20 ตัวอย่าง พบว่ามีเพียง 15 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนมีจำนวนแถบมากและมีจำนวน polymorphic band สูง คู่ไพรเมอร์ดังกล่าวมีดังนี้

E-ACA/M-CAA	E-AGT/M-CAA	E-ATC/M-CAA
E-AC/M-CAA	E-ACT/M-CAT	E-ACA/M-CAT
E-ACC/M-CAG	E-ACT/M-CAG	E-ACC/M-CAC
E-ATC/M-CAC	E-AAG/M-CAC	E-ACA/M-CAC
E-AC/M-CAC	E-AAC/M-CTA	E-AAG/M-CTA

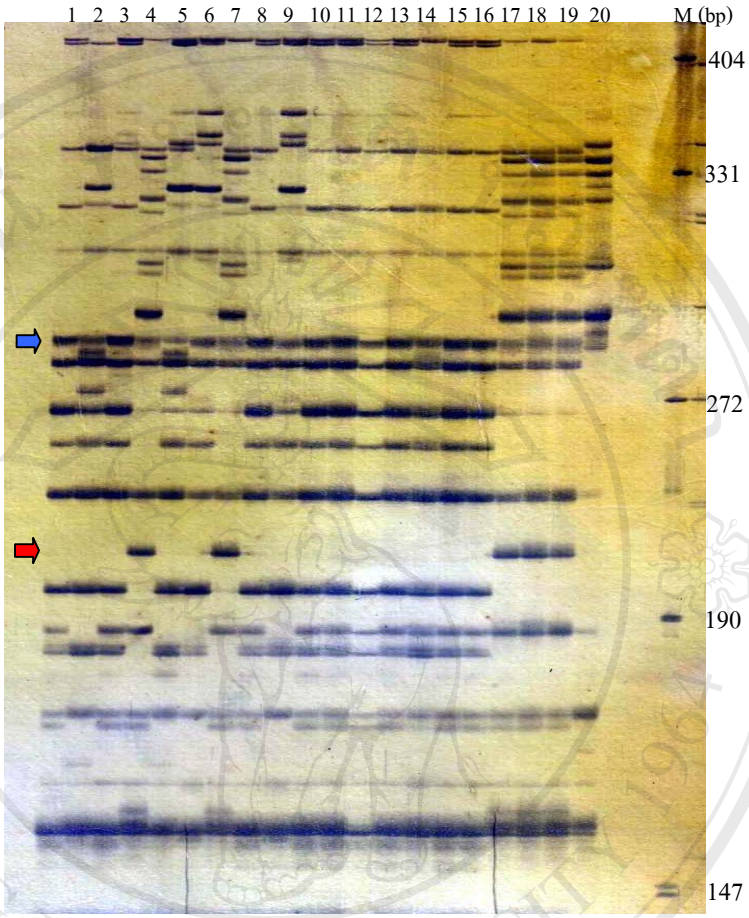
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการศึกษาครั้งนี้ได้บันทึกผลเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 1116-147 คู่เบส (base pairs) และทั้ง 15 คู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 702 แถบ โดยให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น monomorphic band คือทุกตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันในตำแหน่งเดียวกัน จำนวน 126 แถบและแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น polymorphic band คือมีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตำแหน่งเดียวกันแตกต่างกัน (ภาพที่ 18) จำนวน 576 แถบ โดยจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแต่ละไพรเมอร์แสดงไว้ในตารางที่ 8 จากตารางพบว่าคู่ไพรเมอร์ E-ACT/M-CAG ให้ % polymorphic band มากที่สุดคือ 90.6 เปอร์เซนต์ และคู่ไพรเมอร์ที่ให้ % polymorphic band น้อยที่สุด คือ E-AGT/M-CAA มีค่าอยู่ที่ 71 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำแต่ละคู่ไพรเมอร์มาเฉลี่ยรวมกันก็พบว่ามีค่า % polymorphic band อยู่ที่ 82 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่ามีเปอร์เซ็นต์ที่สูงมาก ดังนั้นคู่ไพรเมอร์เหล่านี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข่า

ตารางที่ 8 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้ง 15 คู่ไพรเมอร์

primer	monomorphic band	polymorphic band	total	% polymorphic band
E-ACA/M-CAA	8	53	61	86.9
E-AGT/M-CAA	11	27	38	71.0
E-ATC/M-CAA	6	18	24	75.0
E-AC/M-CAA	12	47	59	79.7
E-ACT/M-CAT	9	21	30	70.0
E-ACA/M-CAT	12	52	64	81.2
E-ACC/M-CAG	4	16	20	80
E-ACT/M-CAG	3	29	32	90.6
E-ACC/M-CAC	8	45	53	84.9
E-ATC/M-CAC	7	47	54	87.0
E-AAG/M-CAC	8	36	44	81.8
E-ACA/M-CAC	5	29	34	85.3
E-AC/M-CAC	9	51	60	85.0
E-AAC/M-CTA	9	60	9	87.0
E-AAG/M-CTA	15	45	60	75.0
total	126	576	702	82.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 18 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ E-ACC/M-CAC และ M คือ pUC Mix Marker DNA หมายเลข 1-20 คือตัวอย่างข่าที่ 1-20 และลูกศรสีน้ำเงินแสดงตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น monomorphic band ลูกศรสีแดงแสดงตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น polymorphic band

4.3 แถบดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสาร 1´ acetoxychavicol acetate

จาก 15 คู่ไพรเมอร์ที่ได้ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของข่าทั้ง 20 ตัวอย่าง พบว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสาร 1´ acetoxychavicol acetate ซึ่งจัดกลุ่มไว้ตามปริมาณสาร 1´ acetoxychavicol acetate ไว้ได้เป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 6) แต่พบว่าในข่าหยวกตัวอย่างที่ 14 ซึ่งมีปริมาณสารดังกล่าวน้อยที่สุดคือ 41.90 เปอร์เซ็นต์ พบแถบดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจง (Specific band) กับตัวอย่างที่ 14 ในคู่ไพรเมอร์ E-ACT/M-CAG และ E-ATC/M-CAC มีขนาดประมาณ 404 คู่เบส และอยู่ในช่วง 404- 489 คู่เบส ตามลำดับ ดังภาพที่ 19

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ก)

(ข)

ภาพที่ 19 แถบดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงในข่าตัวอย่างที่ 14 ที่พบในคู่ไพรเมอร์

(ก) E-ACT/M-CAG

(ข) E-ATC/M-CAC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 ผลการวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข่าทั้ง 20 ตัวอย่าง

วิเคราะห์ เดนโดรแกรม ของข่าโดยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01d ด้วยวิธี UPGMA ซึ่งค่า genetic distances ที่ได้มีความหมายคือค่าที่เข้าใกล้ 1 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก ส่วนค่าที่เข้าใกล้ 0 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ส่วนค่า similarity coefficient แสดงในตาราง ที่ 9 ซึ่งจะมีความหมายคือค่าที่เข้าใกล้ 1 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ส่วนค่าที่เข้าใกล้ 0 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก จาก เดนโดรแกรม (ภาพที่ 20) สามารถแบ่งข่าออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 มี 10 ตัวอย่าง คือ ข่าแดง ตัวอย่างที่ 1 (KD1) ข่าแดง ตัวอย่างที่ 3 (KD3) ข่าแดง ตัวอย่างที่ 8 (KD8) ข่าหยวก ตัวอย่างที่ 10 (KY10) ข่าหยวก ตัวอย่างที่ 11 (KY11) ข่าหยวก ตัวอย่างที่ 12 (KY12) ข่าหยวก ตัวอย่างที่ 13 (KY13) ข่าหยวก ตัวอย่างที่ 14 (KY14) ข่าลิง ตัวอย่างที่ 15 (KL15) ข่าแดง ตัวอย่างที่ 16 (KD16)

กลุ่มที่ 2 มี 2 ตัวอย่าง คือ ข่าแดง ตัวอย่างที่ 6 (KD6) และข่าเหลือง ตัวอย่างที่ 9 (KLE9)

กลุ่มที่ 3 มี 2 ตัวอย่าง คือ ข่าหยวก ตัวอย่างที่ 2 (KY2) และข่าหยวก ตัวอย่างที่ 5 (KY5)

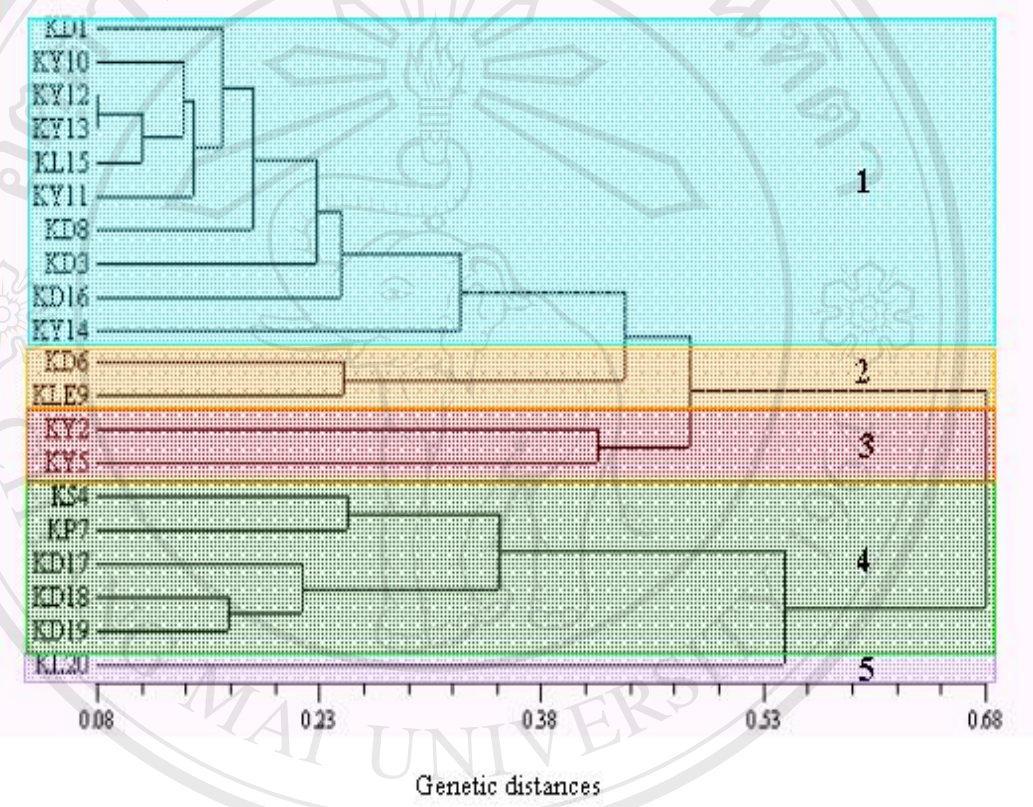
กลุ่มที่ 4 มี 5 ตัวอย่าง คือ ข่าสาคู ตัวอย่างที่ 4 (KS4) ข่าป่า ตัวอย่างที่ 7 (KP7) ข่าแดง ตัวอย่างที่ 17 (KD17) ข่าแดง ตัวอย่างที่ 18 (KD18) และข่าแดง ตัวอย่างที่ 19 (KD19) ซึ่งในกลุ่มที่ 4 นี้ สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 2 กลุ่มคือ 4.1) กลุ่มของข่าแดง (KD17, KD18, KD19) และ 4.2) กลุ่มของข่าพันธุ์ป่า (KS4, KP7)

กลุ่มที่ 5 คือ ข่าลิง ตัวอย่างที่ 20 (KL20)

พบว่าในกลุ่มที่ 1 มีส่วนใหญ่จะเป็นพันธุ์ปลูกทางการค้า ยกเว้นข่าลิง ตัวอย่างที่ 15 และทุกตัวอย่างมีความสัมพันธ์กันในลักษณะของสีเหง้า ซึ่งทุกตัวอย่างมีหน่อเป็นสีแดง และมีสีเหง้าเป็นสีอมชมพู ส่วนด้านของปริมาณสาร 1´ acetoxychavicol acetate พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณสารน้อยทั้งหมด โดยเฉพาะ ข่าหยวก ตัวอย่างที่ 14 คือมีปริมาณสาร 41.90 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 พบว่าถ้าดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีส่วนที่สัมพันธ์กันเฉพาะ ขนาดของเหง้าเท่านั้น และมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในด้านของสีเหง้า คือข่าแดง ตัวอย่างที่ 6 จะมีเหง้าสีแดงอมชมพู ส่วนข่าเหลือง ตัวอย่างที่ 9 จะมีสีเหง้าเป็นสีเหลืองแตกต่างจากทุกตัวอย่าง กลุ่มที่ 3 พบว่าทั้ง 2 ตัวอย่างมีความสัมพันธ์กันอย่างมาก โดยเฉพาะสีเหง้าซึ่งจะแตกต่างจากตัวอย่างอื่นอย่างชัดเจนกล่าวคือ เหง้ามีสีขาวซีด หน่อมีสีชมพู และลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆมีความคล้ายคลึงกันอย่างมาก ส่วนด้านของเปอร์เซ็นสาร 1´ acetoxychavicol acetate พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มให้เปอร์เซ็นต์สารน้อยเช่นเดียวกัน กลุ่มที่ 4 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย พบว่ากลุ่ม 4.1 เป็นกลุ่มที่เป็นพันธุ์ป่าทั้ง 2 ตัวอย่าง และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

มีลักษณะอื่นๆที่คล้ายคลึงกัน ส่วน กลุ่ม 4.2 มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันเช่นกัน แต่ในด้านของเปอร์เซ็นต์สารพบว่า ข่าแดง ตัวอย่างที่ 17 กับ 19 จัดอยู่ในกลุ่มของข่าที่มีเปอร์เซ็นต์สารสูง คือ 66.76 และ 69.68 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 5 ข่าลิงตัวอย่างที่ 20 พบว่าเป็นข่าที่มีความแตกต่างจากข่าทุกตัวอย่าง อย่างชัดเจน โดยเฉพาะในด้านของลักษณะทางสัณฐานวิทยา กล่าวคือ มีลักษณะของเหง้าขนาดเล็ก ลำต้นเทียมเตี้ย ใบแหลมเล็ก



ภาพที่ 20 เดนโดรแกรม แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมของข่าทั้ง 20 ตัวอย่างจากไพรเมอร์ 15 คู่ (KD= ข่าแดง, KY=ข่าหยวก, KL=ข่าลิง, KLE=ข่าเหลือง, KP=ข่าป่า, KS=ข่าสาคู)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 9 ค่า Similarity Coefficient ของข่าทั้ง 20 ตัวอย่าง

	KD1	KD2	KD3	KD4	KD5	KD6	KD7	KD8	KD9	KD10	KD11	KD12	KD13	KD14	KD15	KD16	KD17	KD18	KD19	KD20
KD1	1.00																			
KD2	0.77	1.00																		
KD3	0.96	0.76	1.00																	
KD4	0.56	0.52	0.56	1.00																
KD5	0.78	0.83	0.77	0.52	1.00															
KD6	0.81	0.78	0.80	0.53	0.79	1.00														
KD7	0.58	0.52	0.58	0.94	0.54	0.55	1.00													
KD8	0.96	0.77	0.94	0.55	0.79	0.82	0.57	1.00												
KD9	0.81	0.77	0.80	0.53	0.78	0.94	0.54	0.81	1.00											
KD10	0.98	0.77	0.96	0.56	0.78	0.81	0.58	0.97	0.81	1.00										
KD11	0.96	0.76	0.94	0.57	0.77	0.81	0.57	0.96	0.81	0.97	1.00									
KD12	0.97	0.77	0.95	0.56	0.77	0.82	0.58	0.97	0.82	0.98	0.98	1.00								
KD13	0.98	0.77	0.95	0.56	0.78	0.81	0.57	0.97	0.82	0.98	0.98	0.99	1.00							
KD14	0.90	0.75	0.87	0.58	0.77	0.82	0.59	0.89	0.82	0.90	0.90	0.91	0.91	1.00						
KD15	0.97	0.77	0.95	0.56	0.78	0.82	0.57	0.96	0.82	0.98	0.98	0.99	0.99	0.91	1.00					
KD16	0.94	0.75	0.91	0.58	0.76	0.80	0.58	0.93	0.80	0.94	0.95	0.95	0.95	0.87	0.96	1.00				
KD17	0.57	0.54	0.57	0.88	0.54	0.55	0.87	0.58	0.54	0.57	0.57	0.57	0.57	0.59	0.56	0.55	1.00			
KD18	0.55	0.52	0.54	0.88	0.54	0.54	0.87	0.56	0.53	0.55	0.55	0.55	0.55	0.57	0.55	0.58	0.95	1.00		
KD19	0.55	0.53	0.54	0.89	0.54	0.53	0.88	0.56	0.52	0.54	0.55	0.55	0.54	0.57	0.54	0.57	0.96	0.97	1.00	
KD20	0.47	0.46	0.47	0.69	0.47	0.48	0.67	0.48	0.46	0.47	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.48	0.71	0.73	0.73	1.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

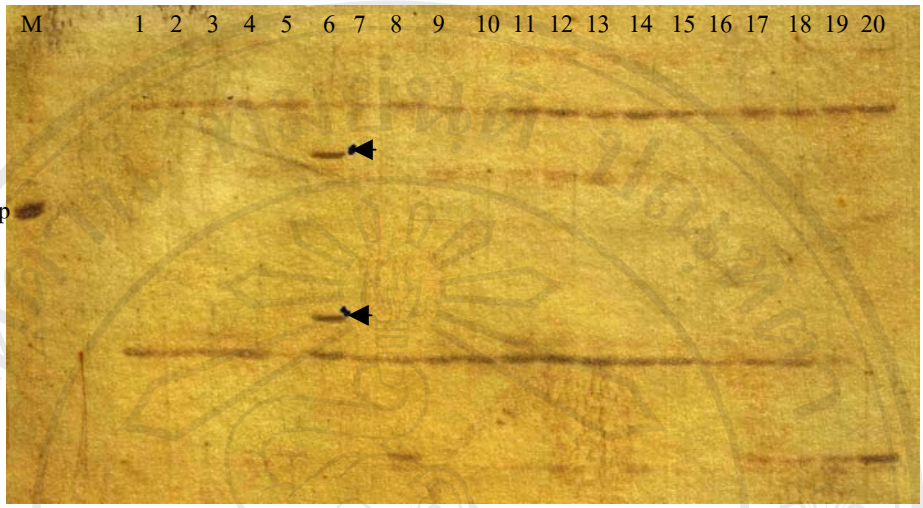
4.5 แถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจง (Specific band) กับตัวอย่างข่า

ในการทดลองครั้งนี้พบว่ามีข่า 5 ตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจง ตัวอย่างดังกล่าวคือ ข่าหยวก ตัวอย่างที่ 2 ข่าหยวก ตัวอย่างที่ 5 ข่าแดงตัวอย่างที่ 6 ข่าแดง ตัวอย่างที่ 14 ข่าลิง ตัวอย่างที่ 20 ดังแสดงในตารางที่ 10 (ภาพที่ 21 และ 22)

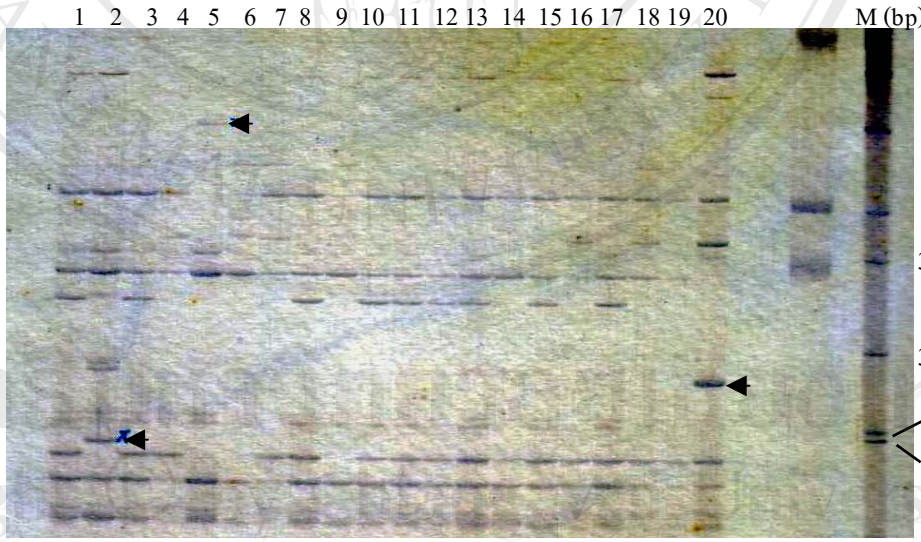
ตารางที่ 10 ตำแหน่งที่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจง (Specific band) ในข่า 5 ตัวอย่าง

ตัวอย่างข่า	ไพรเมอร์	ตำแหน่งที่พบ (คู่เบส)
ข่าหยวก 2	E-ACA/M-CAA	190-147
	E-AGT/M-CAA	590-511
	E-ACT/M-CAT	489-404
	E-ACT/M-CAG	501
	E-AAG/M-CAC	489-404
	E-AAC/M-CTA	489-404
	E-AAG/M-CTA	190-147
ข่าหยวก 5	E-AGT/M-CAA	345-310
	E-AC/M-CAA	190-147
	E-ACT/M-CAT	404-331
	E-ACA/M-CAT	692-501
	E-ACC/M-CAG	692-501
	E-ATC/M-CAC	331-242
	E-AAG/M-CAC	489-404
ข่าแดง 6	E-ATC/M-CAA	242-190 และ 190-147
ข่าหยวก 14	E-ACT/M-CAG	404
	E-ATC/M-CAC	489-404
ข่าลิง 20	E-ACA/M-CAA	692-501 2 ตำแหน่ง และ 190-147
	E-AGT/M-CAA	590-511 และ 218-150
	E-ATC/M-CAA	331-242
	E-AC/M-CAA	242-190
	E-ACT/M-CAG	692-501
	E-ACC/M-CAC	692-501
	E-ACA/M-CAC	404-331
	E-AC/M-CAC	692-501, 489-404 และ 190
	E-AAG/M-CTA	692-501 และ 190-147

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 21 แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับ ข่าแดงตัวอย่างที่ 6 จากคู่ไพรเมอร์ E-ATC/M-CAA



ภาพที่ 22 แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับ ข่าลิง ตัวอย่างที่ 20 ข่าหยวก ตัวอย่างที่ 2 และ 5 จากคู่ไพรเมอร์ E-AGT/M-CAA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved