อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัย

การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง

(Optimization Methods for DNA Extraction from *Rhynchostylis* sp.)

ผู้วิจัย

นายอนุพันธ์ กงบังเกิด, Dr.rer.nat (Botanik)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 13 JUL 2011
เลขทะเบียน 15670267
เลขเรียกหนังสือ SB
409
0194 ก
2551

หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณรายได้ ของคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยดังกล่าว ขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินการวิจัย ขอบพระคุณอาจารย์ ดร.อภินันท์ ลิ้มมงคล อาจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมจิตต์ ทินกระโทก ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ให้โครงการนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี ขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา ที่ช่วยเหลือให้การสนับสนุนให้การวิจัยครั้งนี้

(อนุพันธ์ กงบังเกิด)
หัวหน้าโครงการวิจัย
13 พฤศจิกายน 2550

ชื่อโครงการวิจัย : การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง

: Optimization Methods for DNA Extraction from *Rhynchostylis* sp.

ผู้วิจัย : ผศ.ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด

หน่วยงานที่สังกัด : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

หมายเลขโทรศัพท์ : 0-5526-1000 ต่อ 3321 หรือ 3352

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสาขา เกษตรศาสตร์และชีววิทยา จากเงินงบประมาณรายได้ประจำปี 2550 ของคณะวิทยาศาสตร์ จำนวนเงิน 50,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2549 ถึง กันยายน 2550

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้างทั้ง 3 วิธี ได้แก่ วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) วิธีสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lim และคณะ (1997) และชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant พบว่า วิธีสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lim และคณะ (1997) นั้นไม่เหมาะสมในการนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง ส่วนวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) เมื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้างแต่ละชนิดโดยตรวจสอบผลจากวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล และวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้เทคนิค spectrophotometer ผลการทดลองที่ได้มีความใกล้เคียง และไม่แตกต่างจากวิธีสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นของกล้วยไม้สกุลช้าง

Abstract

Optimization methods for DNA extraction from *Rhynchostylis* sp. were examined. Three different methods; Doyle and Doyle (1987), Lim et.al. (1997) and NucleoSpin® Plant DNA extraction kit were used for DNA isolation and compared. The results indicated that DNA isolation from leaf of *Rhynchostylis* sp. using Doyle and Doyle (1987) and NucleoSpin® Plant DNA extraction kit showed no significant different in quantity of DNA and gave higher quality of DNA than Lim's method when detected by electrophoresis and UV/Visible absorption spectrophotometer. Therefore, Doyle and Doyle (1987) method is suitable for isolation of DNA from leaf of *Rhynchostylis* sp.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
คำย่อ	ซ
บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	5
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	11
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	27
ข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	28

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของกล้วยไม้สกุลช้างชนิดต่างๆ	12
2	แสดงผลค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ Spectrophotometer	26

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1(ก-ฌ)	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและรากกล้วยไม้สกุลช้างต่างๆ	15
2(ก-ซ)	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกกล้วยไม้สกุลช้างบางชนิด	19
3(ก-ค)	แสดงลักษณะสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการ Doyle และ Doyle (1987) (ก) วิธีสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant (ข) และ วิธีการสกัดของ Lim และคณะ (1997) (ค)	24
4(ก-ค)	แสดงจากการตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล (ก) เป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) (ข) วิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีของ Lim และคณะ (1997) และ (ค) วิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีของ NucleoSpin® Plant โดยช่องที่1-4 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นได้แก่ λ 25 ng, λ 50 ng, λ 50 ng, และ λ 100 ng ตามลำดับ ช่องที่ 5-6 ช้างกระ ช่องที่ 7-8 ช้างเผือก ช่องที่ 9-10 ช้างแดง ช่องที่ 11-12 เขาแกะ ช่องที่ 13-14 ไอยเรศ ช่องที่ 15-16 ไอยเรศดำ และช่องที่ 17 ไอยเรศดำในสภาพปลอดเชื้อ	25

คำย่อ

°C	องศาเซลเซียส
NaOH	Sodium hydroxide
HCl	Hydrochloric acid
g/l	กรัมต่อลิตร
mg/l	มิลลิกรัมต่อลิตร
cm	เซนติเมตร
$HgCl_2$	Mercuric chloride

บทที่ 1
บทนำ

กล้วยไม้สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) จัดเป็นกล้วยไม้พื้นเมืองที่มีบทบาทสำคัญในยุคเริ่มแรกของการพัฒนาวงการกล้วยไม้ไทย เนื่องจากเป็นกล้วยไม้ที่มีขนาดกลางจนไปถึงค่อนข้างใหญ่ มีช่อดอกเด่นสวยงามสะดุดตา ดอกมีกลิ่นหอม และเป็นกล้วยไม้ประเภทช่อที่มีความงามมากในบรรดากล้วยไม้ป่าที่พบตามธรรมชาติ กล้วยไม้สกุลช้างเป็นที่นิยมเลี้ยงกันมาก เนื่องจากปลูกเลี้ยงได้ง่ายและออกดอกทุกปี กล้วยไม้สกุลช้างที่พบในประเทศไทยนั้น สามารถจำแนกได้ 3 ชนิด คือ ช้างกระ (*R. gigantea* (Lindl.) Ridl.) เขาแกะ (*R. coelestis* Rchb.f.) และไอยเรศ (*R. retusa* (L.) Blume)

กล้วยไม้สกุลช้างมีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย พม่า ทางตอนใต้ของจีน ประเทศในแถบอินโดจีน อินโดนีเซีย และหมู่เกาะทะเลจีนใต้ สำหรับในประเทศไทยพบกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในแถบภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือต่ำลงมาจนถึงตอนเหนือของภาคกลางและภาคตะวันออก กล้วยไม้ช้างกระ (*R. gigantea*) มีรูปร่างใหญ่โตกว่ากล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ ในสกุลเดียวกัน ลักษณะช่อดอกเป็นพวงห้อยรูปทรงกระบอกโค้งลง ช่อดอกยาวประมาณ 20-40 เซนติเมตร มีดอกแน่นช่อ ช่อละ 25-60 ดอก ดอกมีกลิ่นหอมฉุน หอมไกล ดอกบานทนได้ประมาณสองหรือสามสัปดาห์ กล้วยไม้ช้างกระเป็นที่นิยมเลี้ยงกันมาก เนื่องจากปลูกเลี้ยงได้ง่ายและออกดอกทุกปี โดยช่วงระยะเวลาที่ดอกบานจะอยู่ระหว่างเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ กล้วยไม้สกุลช้างแบ่งออกเป็น 3 ประเภทตามลักษณะสีของดอก คือ ช้างกระ ช้างแดง (*R. gigantea* (Lindl.) Ridl. var. *rubrum* Sagarik) และช้างเผือก (*R. gigantea* (Lindl.) Ridl. var. *harrisonianum* (Hook.) Holttum) ทั้งสามประเภทเป็นพันธุ์แท้พันธุ์เดียวกัน มีลักษณะลำต้น ใบ ราก ช่อดอก และดอกคล้ายคลึงกัน แต่ต่างกันตรงที่สีของดอก คือช้างกระมีดอกสีขาวประด้วยจุดสีม่วงแดง ช้างแดงดอกมีสีม่วงแดงทั้งดอกหรือเกือบทั้งดอก และช้างเผือกมีดอกสีขาวล้วน นอกจากนี้ยังมี ช้างพลาย ซึ่งเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างช้างแดงกับช้างกระ สีของดอกมีจุดสีม่วงแดงใหญ่กว่าช้างกระ บางต้นจุดสีมีขนาดใหญ่จนเกือบเต็มกลีบดอก คล้ายกับสีของดอกช้างแดง แต่ยังมีสีขาวของพื้นกลีบดอกเหลืออยู่ ส่วนช้างประหลาด (*R. gigantea* (Lindl.) Ridl. var. *albasepala*) จะมีกลีบปากสีขาวอมชมพู ส่วนกลีบดอกและกลีบเลี้ยงจะมีสีขาวล้วน หรือมีจุดประสีชมพูอมม่วงบ้างเล็กน้อย และช้างค่อม (*R. gigantea* (Lindl.) Ridl. var. *illustre* Rchb.f.) ที่มีลักษณะเด่นที่แตกต่างจากช้างกระคือ ใบจะอวบหนา และสั้นมาก

ไอยเรศหรือพวงมาลัย (*R. retusa*) ไอยเรศมีใบยาวกว่าและแคบกว่าใบของกล้วยไม้ช้างใบ ตามความยาวของใบมีทางสีเขียวแก่สลับกับสีเขียว ปลายใบมีลักษณะเป็นฟันแหลมไม่เท่ากัน ช่อดอกโค้งห้อยลง เป็นรูปทรงกระบอก ดอกแน่นช่อ ในหนึ่งช่อมีดอกประมาณ 150 ดอก ยาวประมาณ 30 - 50 เซนติเมตร สีพื้นของกลีบนอกและกลีบในของดอกเป็นสีขาว มีจุดสีม่วงประปราย เดือยดอกมีสีม่วงอ่อน แผ่นปากมีลักษณะโค้งขึ้นบนแล้วยื่นไปข้างหน้า มีแต้มสีม่วงตรงกลางแผ่นปากส่วนโคนและปลายสุดแผ่นปากเป็นสีขาว ออกดอกประมาณเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ไอยเรศเป็นกล้วยไม้ที่มีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติกว้างตั้งแต่ภาคเหนือจรดภาคใต้

เขาแกะ (*R. coelestis*) เขาแกะมีถิ่นกำเนิดกระจายอยู่ทุกภาคของประเทศไทย มักพบขึ้นในป่าโปร่ง ผลัดใบ ทั้งในภูมิภาคที่เป็นภูเขา และที่ราบ เป็นกล้วยไม้ชนิดเดียวในสกุลช้างที่มีลักษณะช่อดอกตั้งขึ้น ใบมีลักษณะแบนคล้ายแวนด้า โคนใบซ้อนกันเป็นแผง ใบโค้งสลับกันในทางตรงกันข้าม ด้วย ช่อดอกเป็นรูปทรงกระบอก มีดอกแน่นช่อ กลีบดอกทั้งกลีบนอก และกลีบในมีพื้นสีขาว มีแต้มสีม่วงคราม ที่ปลายกลีบทุกกลีบ ฐานของแผ่นปากและครึ่งหนึ่งของแผ่นปากที่ต่อกับฐานมีสีขาว ส่วนอีกครึ่งหนึ่งของแผ่นปากเป็นสีม่วงครามเช่นเดียวกับที่ปลายกลีบแต่สีเข้มกว่า ปากของเขาแกะคล้ายกับปากของไอยเรศ สีม่วงครามของเขาแกะบางต้นอาจมีสีต่างออกไป เช่น มีสีม่วงมากจนเกือบแดง เรียกว่า "เขาแกะแดง" ดอกบานทนประมาณสองสัปดาห์ ฤดูออกดอกประมาณเดือนพฤษภาคมถึงกรกฎาคม (http://orchids21.tripod.com/Html/Rhynchostytis.html)

ตามการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะเด่นทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ทั้งลักษณะใบ ลำต้น ดอกและช่อดอก อย่างไรก็ตาม การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นยังไม่มีความชัดเจนมากนัก ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะขึ้นกับสภาพแวดล้อม ทำให้ไม่สามารถแยกกลุ่มของกล้วยไม้ป่าบางชนิดได้อย่างชัดเจน และอาจส่งผลให้ตรวจสอบผลผิดพลาดได้ ปัจจุบันข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้างนั้นยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง และข้อมูลทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ไอยเรศยังมีค่อนข้างจำกัด ดังนั้นเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมในระดับชีววิทยาโมเลกุลของกล้วยไม้สกุล เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้าง

สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับข้อมูลทางพันธุกรรมที่เป็นรหัสชีวิตของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการ สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะถูกคัดเลือกจากธรรมชาติ (natural selection) เพื่อให้ดำรงสายพันธุ์เป็นไปอย่างสมดุลต่อสภาวะแวดล้อมนั้น ๆ (Filatov and Charlesworth, 1999; Mauricio *et al*., 2003) การเปลี่ยนแปลงอาจจะเป็นไปได้ทั้งการจัดเรียงตัวใหม่ภายในโครโมโซมหรือการเปลี่ยนตำแหน่งดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซม การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ความแตกต่างของรูปแบบพันธุกรรมมากกว่า 1 แบบขึ้นไปจะทำให้สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มี polymorphism ที่แตกต่างกัน ซึ่งความหลากหลายดังกล่าวสามารถตรวจพบได้โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการเป็นตัวตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชที่ต้องการได้ ดีเอ็นเอเทคโนโลยีเป็นเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ที่มีความสำคัญ ในทุกสาขาวิชาทางด้านชีววิทยา การประยุกต์ใช้เทคนิคด้านนี้ มีทั้งทางด้านพืช สัตว์ ด้านการเกษตร อุตสาหกรรมเกษตร การแพทย์รวมถึง ทางกฎหมาย ฯลฯ เกี่ยวกับดีเอ็นเอเทคโนโลยีในการศึกษามวลสารพันธุกรรม (Genome) นั้นมีการศึกษาการกลายพันธุ์ (Mutation) ของทั้งพืชและสัตว์ การพัฒนาและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ หรือแม้แต่โครงสร้างภายในประชากรนั้น ๆ หรือจัดลำดับวิวัฒนาการของประชากรของสิ่งมีชีวิตแต่ละประชากรได้อย่างชัดเจน แม้แต่การกลายพันธุ์ของพืชและสัตว์ การใช้เทคนิคดีเอ็นเอก็สามารถทำให้ตรวจพิสูจน์ได้อย่างชัดเจน ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้

หลายวิธีไม่ว่าจะเป็น การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อเป็นเครื่องหมายติดตามเฉพาะตัว ซึ่งรวมไปถึงการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพอีกด้วย (สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง, 2543)

เทคนิคการคัดเลือกทางอณูพันธุศาสตร์นั้นเริ่มแรกด้วยขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งคือขั้นตอนของการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิต และก็เป็นเรื่องที่ทำได้ยากในพืชแต่ละชนิด เนื่องจากเนื้อเยื่อแต่ละชนิดนั้นมี Polysaccharide และ / หรือ สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นปัญหาหลักในการสกัดดีเอ็นเอ (Porebski *et al.*, 1997) โดยเฉพาะการสกัดดีเอ็นเอจากพืชในวงศ์กล้วยไม้ ซึ่งมักพบปัญหาหลายประการที่ทำให้ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณและคุณภาพที่ไม่เพียงพอในการนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ การตรวจพิสูจน์พันธุ์พืช โดยวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุล เป็นสิ่งจำเป็น (Smith and Smith, 1992) เนื่องจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชยังมีปัญหาในการจำแนกความแตกต่างของพันธุ์ เพราะลักษณะดังกล่าวสามารถผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม ทำให้ผลการตรวจสอบที่ได้มีความแปรปรวนหรือมีความผิดพลาดอยู่บ้าง ในการศึกษาวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุลนั้น ขั้นตอนแรกที่เป็นขั้นตอนสำคัญขั้นตอนหนึ่งคือ ขั้นตอนในการสกัดดีเอ็นเอ การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากพืชนั้นมีหลายวิธี ซึ่งมีรายงานไว้แล้ว (Murray and Thompson, 1980; Hattori *et al.*, 1987; Doyle and Doyle, 1987, 1990; Rogstad, 1992; Rowland and Nguyen, 1993; Scott and Playford, 1996; Lim *et al.*, 1997. Csaikl *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1998; Zhang and Stewart, 2000; Buldewo and Jaufeerally-Fakin, 2002; Drabkova *et al.*, 2002; Schlink and Reski, 2002; Sharma *et al.*, 2002) และหลายวิธีการที่พบว่ามีรายงานนั้น ได้แสดงถึงวิธีการต่าง ๆ ในการแยกสารที่สามารถปนเปื้อน เช่น polyphenolic และ polysaccharides ซึ่งเป็นเหตุให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพต่ำ และสารเหล่านี้จะมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของพืชที่นำมาทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยทั่วไปแล้ววิธีสกัดดีเอ็นเอนั้น มีอยู่หลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความเหมาะสมกับชนิดของเนื้อเยื่อ เซลล์ แต่ละชนิด และรูปแบบของงานที่ต้องนำดีเอ็นเอไปใช้ กล่าวคือ ต้องการปริมาณดีเอ็นเอมากน้อยเพียงใดและมีความบริสุทธิ์เพียงใด เช่น ในการโคลนยีนหรือวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี Southern hybridization นั้น ต้องการดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ แตกหักน้อย และต้องมีความบริสุทธิ์พอสมควร สำหรับในพืชนั้น นิยมทำการสกัดดีเอ็นจากใบอ่อนหรือต้นอ่อนเพราะมีเส้นใยน้อย ทำให้เซลล์แตกและปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาได้ง่ายกว่า (สุรินทร์, 2545) อย่างไรก็ตาม สัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ ไม่ว่าจะเป็นส่วนของใบ และต้นที่เจริญเติบโตในธรรมชาตินั้น มักมีโครงสร้างที่ค่อนข้างแข็ง และมีเส้นใยมาก จึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนดังกล่าว เพื่อให้ได้ปริมาณและคุณภาพที่ดี และทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกบางประการของกล้วยไม้สกุลช้างชนิดต่างๆ และหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ สำหรับที่จะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้างดังกล่าว โดยวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ ได้แก่ AFLP technique ในโอกาสต่อไป

ขอบเขตการวิจัย

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลช้างพันธุ์ป่า (*Rhynchostylis* sp.) จากแหล่งต่างๆ ที่เป็นเขตการกระจายพันธุ์ตามจังหวัดต่างๆ ศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นบางประการ และนำใบจากตัวอย่างกล้วยไม้สกุลช้างที่สำรวจพบมาศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธีการสกัดแบบต่างๆ 3 วิธี เปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบของกล้วยไม้สกุลช้าง

ระยะเวลาและสถานที่ทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2549 และสิ้นสุดการวิจัยเดือนกันยายน พ.ศ.2550

บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุพืช

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลช้าง ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ *Rhynchostylis gigantea*, *Rhynchostylis retusa* และ *Rhynchostylis coelestis*

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงแรงหนีศูนย์กลางชนิดควบคุมความเย็นได้ (Refrigerated centrifuge)
2. ตู้เก็บรักษาตัวอย่าง (Deep freezer -20 ^{0}C และ -80 ^{0}C)
3. เครื่องบ่มเพาะ (Incubator)
4. เครื่องแยกสารด้วยเจลชนิด Agarose (Agarose gel electrophoresis set)
5. เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
7. เครื่องกวนสารแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer)
8. เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Uiitraspec 2000 UV/Visible Spectrophotometer)
9. เตาอบไมโครเวฟ (Microwave oven)
10. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
11. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
12. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
13. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet)
14. ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้
15. หลอดใส่สารขนาด 0.5 และ 1.5 ml
16. Disposable tips (1000-µl, 20-µl and 10-µl)
17. หลอดทดลองสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR tube)
18. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
19. โกร่งบดตัวอย่าง
20. Cuvette
21. อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ถุงมือ ปากคีบ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร ถาดพลาสติก กระดาษติดป้าย ปากกาเคมี แผ่นอลูมิเนียมฟอลย์ มีดผ่าตัด แท่งแก้วคน บีกเกอร์ กระบอกตวง

สารเคมี

สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

1. cethyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)
2. Polyvinylpyrollidone (PVP)
3. NaCl

4. 2-mercaptoethanol
5. potassium acetate
6. Tris-HCl
7. EDTA
8. chloroform-isoamyl alcohol (24:1)
9. phenol : chloroform (1:1)
10. Isopropanol
11. RNase A
12. Ethanol 70% 80% และ 100%
13. Sodium acetate

สารเคมีสำหรับการทำวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส

1. Agarose
2. λ DNA marker
3. Ethidium bromide
4. Tris-base
5. Bromophenol blue (BPB)
6. Xylene cyanol

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองหลัก ได้แก่

1. วิธีการดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกบางประการของกล้วยไม้สกุลช้าง ชนิดต่างๆ ที่สำรวจพบ และที่ปลูกเลี้ยงไว้

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก บันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ ลักษณะของต้น ใบ ราก และดอก เป็นต้น

การทดลองที่ 2 ศึกษาและเปรียบเทียบเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของกล้วยไม้สกุลช้าง เพื่อให้ได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP analysis โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของกล้วยไม้สกุลช้าง เปรียบเทียบกัน 3 วิธี ดังนี้

1. วิธีสกัดดีเอ็นเอของ Doyle และ Doyle (1987) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการสกัดดีเอ็นเอจากพืชทั่วไป มีขั้นตอนดังนี้

1) นำใบพืชสดประมาณ 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวแล้วถ่ายใส่ Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2) เติม 2X CTAB buffer [2% CTAB, 1% PVP, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl,0.2 % 2-mercaptoethanol (เติมก่อนใช้)] 600 ไมโครลิตร
3) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที ผสมโดยกลับหลอดไปมาเป็นครั้งคราว

4) เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าเบา ๆ
5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 10 นาที
6) ดูดสารละลายใสใส่ใน Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่
7) ทำขั้นตอน 5-6 ซ้ำอีก 2 รอบ
8) เติม Isopropanol 600 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C เป็นเวลา 15 นาที
9) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 10 นาที
10) เทส่วน Isopropanol ทิ้ง
11) เติม 80% Ethanol 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 10 นาที
12) เทส่วน 80% Ethanol ทิ้ง
13) ทำขั้นตอน 11-12 ซ้ำอีก 2 รอบ
14) เทส่วน 80% Ethanol ทิ้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 ^{0}C นาน 20 นาทีเพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนใน TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 50 ไมโครลิตร และเติม RNase A (10 mg/ml) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที
15) เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C จนกว่าจะใช้งาน

2. วิธีสกัดดีเอ็นเอของ Lim และคณะ (1997) เป็นวิธีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ มีขั้นตอนดังนี้

1) นำใบพืชสดประมาณ 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว
2) เติม PVP (100 mg/cm^{3}) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร
3) ถ่ายใส่ Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม extraction buffer [100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl, 100 mM 2-mercaptoethanol (เติมก่อนใช้)] 600 ไมโครลิตร
4) เติม 20% SDS ปริมาตร 40 ไมโครลิตร
5) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 ^{0}C เป็นเวลา 10 นาที ผสมโดยกลับหลอดไปมาเป็นครั้งคราว
6) เติม 1/10 ส่วนปริมาตร ของ 5 M potassium acetate (pH 5.2) ผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 20 นาที
7) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 20 นาที
8) ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม 400 ไมโครลิตร isopropanol และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่ อุณหภูมิ -80 ^{0}C เป็นเวลา 15 นาที
9) ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

10) เติม TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ RNase A (10 mg/ cm^3) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที

11) เติม phenol : chloroform (1:1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4^{0}C เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วทำซ้ำอีกครั้ง

12) เติม 3M sodium acetate (pH 5.2) 0.1 เท่าของปริมาตร และ 100% Ethanol 2.5 เท่าของปริมาตร นำไปบ่มที่ -80 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที

13) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 10 นาที

14) ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 ^{0}C นาน 20 นาทีเพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง

15) ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

16) เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ -20 ^{0}C

3. ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant มีขั้นตอนดังนี้

1) Homogenize sample โดยชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม สำหรับตัวอย่างพืชสด บดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วถ่ายใส่ Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (คำแนะนำ: เลือกใช้ Buffer C0 ในการสกัดดีเอ็นเอ ต้องนำไปอุ่นที่ 45^{0}C เป็นเวลา 10 นาที)

2) Cell lysis โดยทำการเติม Buffer C1 หรือ C0 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเติม RNase A ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (อาจผสม Buffer C1 หรือ C0 กับ RNase A ก่อนได้)

3) Filtration / Clarification of lysate เป็นขั้นตอนที่ต้องเทสารละลายตัวอย่างลงใน Nucleospin® Plant column สีม่วง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เวลา 5 นาที

4) Adjust DNA binding condition ซึ่งทำการดูดสารละลายจาก Nucleospin® collecting tube มา 300 ไมโครลิตร ใส่ใน Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นเติม Buffer C4 300 ไมโครลิตร (Buffer C4 มาจากการผสม Buffer C3: Buffer C2 ในอัตราส่วน 1:4) และเติม Ethanol 200 ไมโครลิตร (คำแนะนำ: อาจผสม Buffer C4 เข้ากับ Ethanol ก่อนได้)

5) Bind DNA ทำโดยเทสารละลายลงใน Nucleospin® Plant column สีเขียว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เวลา 1 นาที

6) Wash silica membrane ซึ่งกระทำ 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 (1st) ทำการเติม Buffer CW ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เวลา 1 นาที และครั้งที่ 2 (2nd) ทำการเติม Buffer C5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เวลา 1 นาที

7) Wash / Dry silica membrane เป็นครั้งที่ 3 (3rd) โดยเติม Buffer C5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เวลา 2 นาที และทิ้งไว้ให้แห้ง

8) Elute highly pure DNA กระทำโดยนำ Nucleospin® Plant column สีเขียว ใส่ลงใน Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Buffer CE ปริมาตร 60 ไมโครลิตร (ก่อนใช้ Buffer CE ต้องอุ่นที่ อุณหภูมิ 70^{0}C) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เวลา 1 นาที จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20^{0}C

จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ 2 วิธี คือวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ Spectrophotometer และวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบไมด์หลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส

วิธีการตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล

วัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบรไมด์หลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโพรีซีส ทำโดยนำดีเอ็นเอที่เตรียมไว้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วยเอธิเดียม โบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว จะสามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างโดยประมาณได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบปริมาณได้ถึงระดับนาโนกรัม ดังนั้นกรณีที่ปริมาณดีเอ็นเอมีน้อยไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้จะใช้วิธีนี้ นอกจากนี้การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีทำอิเล็กโทรโฟรีซีสยังสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอว่ามีการปนเปื้อนจากอาร์เอนเอหรือไม่ และดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความสมบูรณ์มากน้อยอย่างไร โดยจะทำการแยกดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแผ่นเจลอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดและปริมาณ จากนั้นจึงย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบการเรืองแสงกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยการส่องผ่านด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

ในการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่เตรียมจากเนื้อเยื่อพืช จะใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ โดยมีวิธีการดังนี้

1) เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย
2) ชั่งผงอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 กรัม เติมบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซีส (0.5x TBE) 100 มิลลิลิตร
3) หลอมอะกาโรสโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรสละลายจนหมด
4) ตั้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 ^{0}C แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ปล่อยเจลให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง
5) เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อย ๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ใส่บัฟเฟอร์ให้ท่วมเจล โดยให้สูงกว่าผิวเจล 2-3 มิลลิเมตร
6) ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร loading dye 2 ไมโครลิตร และผสมกับ DI water 3 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงไปในช่องในแผ่นเจลที่เตรียมไว้

7) ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีสแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าโดยใช้แรงดันไฟฟ้าในช่วง 5 - 10 โวลต์ต่อเซนติเมตร
8) ปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ตามระยะทางที่ต้องการ
9) นำเจลมาย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 5 นาที
10) นำเจลมาใส่กล่องพลาสติก ล้างสารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์ที่ไม่ได้เกาะกับดีเอ็นเอในขั้นตอน destaining โดยแช่แผ่นเจลในน้ำเปล่า 1 นาที
11) นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)

การตรวจสอบผลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ Spectrophotometer

เนื่องจากเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร (ส่วนโปรตีนจะดูดแสงได้ดีที่สุดความยาวช่วงคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตร) ดังนั้นจึงใช้หาปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้ โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นสามารถดูดกลืนแสงได้ค่า Absorbance (A) ที่ 260 นาโนเมตร (A_{260} หรือ OD_{260}) เท่ากับ 1 ส่วนสารละลายอาร์เอนเอหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ดูดแสงได้ A_{260} = 1 มีความเข้มข้น 40 และ 33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งการคำนวณกลับไปหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้โดยใช้สูตร

Concentration of DNA (µg/ml) = A_{260} x (50 µg/ml) / (1 absorbance unit) x dilution factor

การวัดดีเอ็นเอโดยวิธีนี้จะใช้ได้ดีในกรณีที่สารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ ไม่มีอาร์เอนเอและโอลิโกนิวคลีโอไทด์เจือปน และต้องมีปริมาณมากพอที่จะอ่านค่า A ได้ ซึ่งอยู่ในระดับไมโครกรัมการวัดปริมาณทำได้ โดยเปรียบเทียบค่า A_{260} และ A_{280} สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/ A_{280} ประมาณ 1.8 ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมีอาร์เอนเอปน และถ้าค่าต่ำแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนและ ฟีนอล

ขั้นตอนวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ Spectrophotometer

1. เจือจางสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่น 500 เท่า
2. ใช้น้ำกลั่นเป็นสารมาตรฐาน (Blank)
3. วัดค่าการดูดกลืนแสง (A) ของสารลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้ว (1: 500) โดยวัดที่ช่วงความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร
4. นำค่าการดูดกลืนแสง (A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 มาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

บทที่ 3
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกบางประการของกล้วยไม้สกุลช้าง ได้แก่ ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea*) เขาแกะ (*R. coelestis*) ไอยเรศ (*R. retusa*) และ ไอยเรศดำ (*R.* sp.) จากตัวอย่างที่เก็บมาและจากการปลูกเลี้ยง พบว่ามีความแตกต่างกันออกไปตามชนิดที่ได้จัดจำแนกไว้แล้ว (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตาม ภายในกลุ่มของกล้วยไม้ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea*) นั้น ยังพบว่ามีความแตกต่างกันออกไปภายในชนิดเดียวกัน ซึ่งมีความหลากหลายในสายพันธุ์ (variety) ที่อาจเกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์หรือความผันแปรทางพันธุกรรมตามธรรมชาติ แม้แต่การผสมข้าม จึงทำให้ได้กล้วยไม้ช้างกระสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้น อันได้แก่ ช้างกระ ช้างเผือก ช้างแดง ช้างพลาย ช้างประหลาด ช้างค่อม ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกบางประการ ที่นอกจากจะใช้ดอกในการจำแนกสายพันธุ์ต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วนั้น ยังอาจสามารถจำแนกสายพันธุ์ของช้างกระต่างๆ ดังกล่าวออกมาได้ตามโครงสร้าง สี และลักษณะเฉพาะบางประการของใบ ลำต้น ราก ดังแสดงในภาพที่ 1(ก-ฌ) และ 2(ก-ช)

และลักษณะบางประการทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลช้าง เขาแกะ และไอยเรศ ที่ศึกษานั้น พบว่าสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวถึงอนุกรมวิธานและการจำแนกลักษณะต่างๆ ของกล้วยไม้สกุลช้าง ได้แก่ ช้างกระ ไอยเรศ และเขาแกะ (ไพบูลย์, 2520 และ 2531) อย่างไรก็ตาม ยังคงมีลักษณะบางประการทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลช้างโดยเฉพาะไอยเรศดำ ที่ยังไม่มีความชัดเจนในข้อมูลทางพันธุกรรมว่ามีความแตกต่างกันในระดับโมเลกุลที่สามารถจำแนกไอยเรศน่าน หรือไอยเรศดำ ออกเป็นชนิดใหม่ได้หรือไม่ แต่จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษาเบื้องต้น รวมไปถึง ลักษณะของดอก ฤดูกาลในการออกดอก นั้น แตกต่างไปจากไอยเรศทั่วไป จึงน่าสนใจที่จะศึกษาในเชิงลึกระดับชีวโมเลกุลเพื่อจำแนกและ/หรือแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างชัดเจนต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของกล้วยไม้สกุลช้างชนิดต่าง ๆ

ชนิดของกล้วยไม้สกุลช้าง	ลักษณะ			
	ต้น	ใบ	ราก	ช่อดอกและดอก
ช้างกระ	ลำต้นตั้งตรงหรือเอนเล็กน้อย	ใบขนาดใหญ่ รูปขอบขนาน หนา อวบน้ำ และเหนียว รูปขอบขนาน เรียงสลับระนายเดียว บนแผ่นใบ มีเส้นสีจาง แผ่นใบยาวและโค้ง ปลายใบหยัก	รากใหญ่ สีขาว ผิวขรุขระ ปลาย รากสีน้ำตาลปนเขียว	ช่อดอกห้อยลง ดอกขนาด 2 ซม. กลีบเลี้ยงรูปรี กลีบดอกรูปขอบขนาน ปลายกลีบมน ทั้งห้ากลีบสีขาวและมีจุดสีม่วงแดง บางครั้งสีขาวหรือสีแดง กลีบปากรูปขอบขนาน อวบหนา ปลายกลีบมนหรือหยัก โคนกลีบมีสัน กลีบมีเดือยดอกขนาดใหญ่ ดอกสีขาวประด้วยจุดสีม่วงแดง
ช้างเผือก	ลำต้นตั้งตรงหรือเอนเล็กน้อย	ใบขนาดใหญ่ รูปขอบขนาน หนา อวบน้ำ และเหนียว รูปขอบขนาน เรียงสลับระนายเดียว บนแผ่นใบ มีเส้นสีจาง แผ่นใบยาวและโค้ง ปลายใบหยัก	รากใหญ่ สีขาว ผิวขรุขระ ปลาย รากสีเขียว	ช่อดอกห้อยลง ลักษณะดอกคล้ายช้างกระ แต่ดอกสีขาวล้วน
ช้างแดง	ลำต้นตั้งตรงหรือเอนเล็กน้อย	ใบขนาดใหญ่ รูปขอบขนาน หนา อวบน้ำ และเหนียว รูปขอบขนาน เรียงสลับระนายเดียว บริเวณโคนกาบใบ และที่ปลายใบจะมีสีแดงเข้ม แผ่นใบยาว และโค้ง	รากใหญ่ สีขาว ผิวขรุขระ ปลาย รากสีน้ำตาลปนเขียว	ช่อดอกห้อยลง ลักษณะดอกคล้ายช้างกระ แต่ดอกมีสีแดงเข้มทั้งดอก

ตารางที่ 1(ต่อ)

ชนิดของกล้วยไม้สกุลช้าง	ลักษณะ			
	ต้น	ใบ	ราก	ช่อดอกและดอก
ช้างพลาย	ลำต้นตั้งตรงหรือเอนเล็กน้อย	ใบขนาดใหญ่ รูปขอบขนาน หนา อวบน้ำ และเหนียว รูปขอบขนานเรียงสลับระนายเดียว บนแผ่นใบมีเส้นสีจาง แผ่นใบยาวและโค้ง ปลายใบหยัก	รากใหญ่ สีขาว ผิวขรุขระ ปลายรากสีน้ำตาลปนเขียว	ช่อดอกห้อยลง ดอกมีจุดสีม่วงแดงใหญ่กว่าช้างกระ บางต้นจุดสีมีขนาดใหญ่จนเกือบเต็มกลีบดอก คล้ายกับสีของดอกช้างแดง แต่ยังมีสีขาวของพื้นกลีบดอกเหลืออยู่
ช้างประหลาด	ลำต้นตั้งตรงหรือเอนเล็กน้อย	ใบขนาดใหญ่ รูปขอบขนาน หนา อวบน้ำ และเหนียว รูปขอบขนานเรียงสลับระนายเดียว บนแผ่นใบมีเส้นสีจาง แผ่นใบยาวและโค้ง ปลายใบหยัก	รากใหญ่ สีขาว ผิวขรุขระ ปลายรากสีน้ำตาลปนเขียว	ช่อดอกห้อยลง กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีสีขาวล้วน ไม่มีจุดกระ กลีบปากสีม่วงแดงคล้ายช้างกระ
เขาแกะ	ลำต้นตั้งตรงหรือเอนเล็กน้อย	ใบขนาดเล็กกว่าใบช้างกระ รูปแถบเรียงสลับระนาบเดียว แผ่นใบหนา เหนียวคล้ายหนังและยาวโค้งมาก บิดเหมือนครึ่งวงกลม ปลายใบหยัก	รากสีขาวผิวเรียบ ปลายรากมีสีเขียว	ช่อตั้งขึ้น กลีบเลี้ยงบนรูปรีแกมรูปไข่กลับ กลีบเลี้ยงคู่ข้างรูปไข่กลับ กลีบดอกรูปขอบขนานแกมรูปไข่ ทั้งห้ากลีบสีขาวปลายกลีบมนและขอบกลีบเป็นสีม่วงจาง กลีบปากรูปลิ่ม สีขาวอมม่วงถึงสีม่วงเข้ม บางต้นอาจมีสีต่างออกไป เช่น มีสีม่วงมากจนเกือบแดง เรียกว่า "เขาแกะแดง" ปลายกลีบมนและมีสีเข้มกว่าโคนกลีบมีเดือยดอกที่แบนและส่วนปลายโค้งงอ

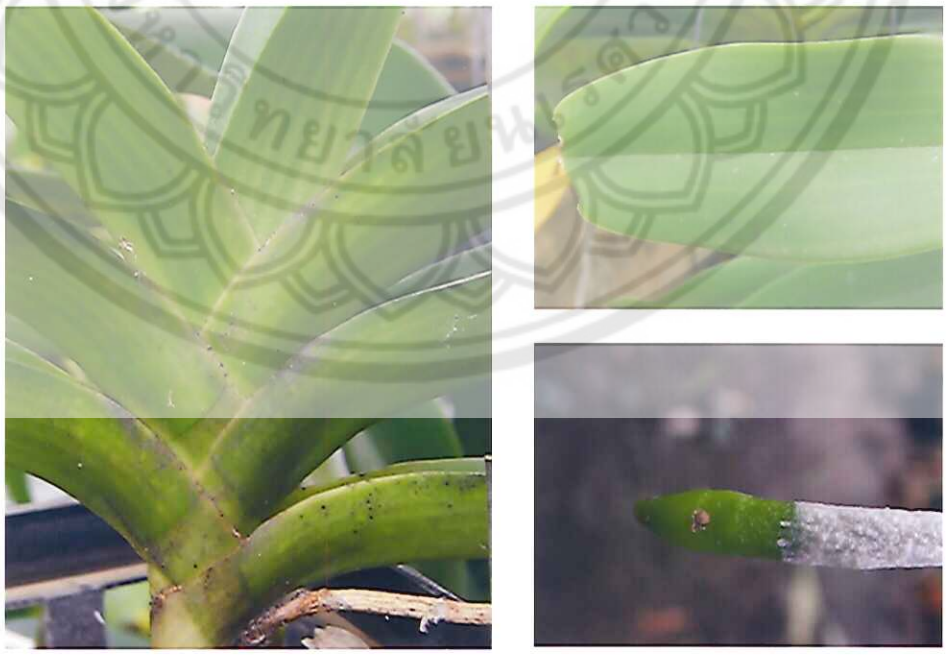
ตารางที่ 1(ต่อ)

ชนิดของกล้วยไม้สกุลช้าง	ลักษณะ			
	ต้น	ใบ	ราก	ช่อดอกและดอก
ไอยเรศ	ลำต้นเอนห้อยลงเล็กน้อย	ใบผอมยาวรูปขอบขนาน แผ่นใบยาว ไม่หนามากแต่เหนียว เรียงสลับระนาบเดียว ปลายใบเว้า	รากสีขาวผิวเรียบ ปลายรากมีสีเขียว	ช่อดอกห้อยลง ดอกมีสีขาวและมีจุดสีม่วงอ่อน กลีบเลี้ยงบนรูปรี กลีบเลี้ยงข้างเบี้ยวเล็กน้อย กลีบดอกรูปแถบขนานแกมรูปหอก กลีบปากมีเดือยใหญ่ ปลายกลีบรูปแถบ
ไอยเรศดำ	ลำต้นเอนห้อยลงเล็กน้อย	ใบขนาดใหญ่ รูปขอบขนาน แผ่นใบไม่หนามาก ยาวและปลายใบโค้ง ด้านล่างใบมีจุดสีน้ำตาลแดง หนาแน่นบริเวณโคนใบ ต้นมีจุดประสีแดง ยอดใหม่มีสีน้ำตาลแดง ปลายใบหยัก	รากสีขาวผิวเรียบ ปลายรากมีสีแดงเข้ม	ช่อดอกห้อยลง ดอกมีสีขาวจุดสีแดง กลีบเลี้ยงบนรูปรี กลีบเลี้ยงข้างเบี้ยวเล็กน้อย กลีบดอกรูปแถบขนานแกมรูปหอก กลีบปากมีเดือยใหญ่ ปลายกลีบรูปแถบ

SB 409 .ร4ก(ป) 2554
13 JUL 2011
สำนักหอสมุด

ภาพที่ 1(ก-ฌ) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและรากกล้วยไม้สกุลช้างต่างๆ

ภาพที่ 1ก ช้างกระ



ภาพที่ 1ข ช้างเผือก

ภาพที่ 1ค ช้างแดง

ภาพที่ 1ง ช้างพลาย

ภาพที่ 1จ ช้างประหลาด

ภาพที่ 1ฉ ช้างค่อม

ภาพที่ 1ช เขาแกะ

ภาพที่ 1ช ไอยเรศ

ภาพที่ 1ฌ ไอยเรศน่าน หรือไอยเรศดำ

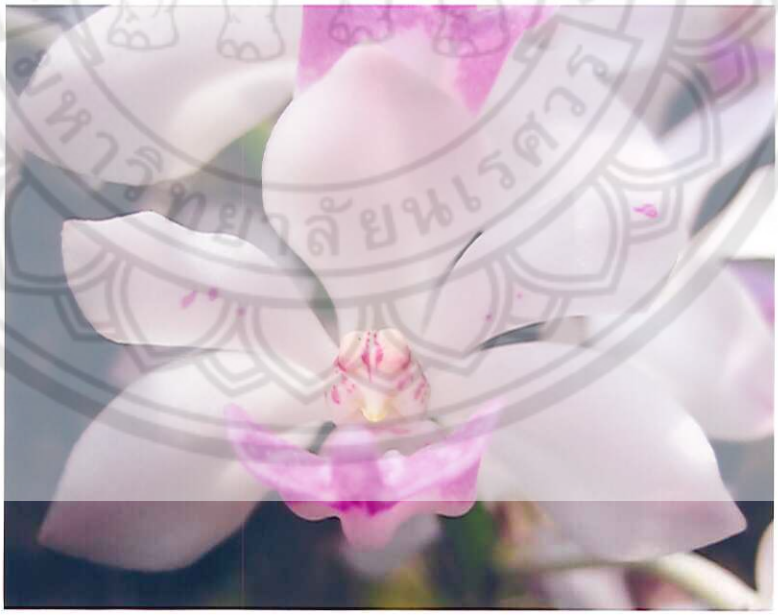
ภาพที่ 2(ก-ซ) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกกล้วยไม้สกุลช้างบางชนิด

ภาพที่ 2ก ลักษณะดอกของช้างกระ

ภาพที่ 2ข ลักษณะดอกของช้างเผือก

ภาพที่ 2ค ลักษณะดอกของช้างแดง

ภาพที่ 2ง ลักษณะดอกของช้างพลาย



ภาพที่ 2จ ลักษณะดอกของช้างประหลาด

ภาพที่ 2ฉ ลักษณะดอกของเขาแกะ

ภาพที่ 2ช ลักษณะดอกของไอยเรศ

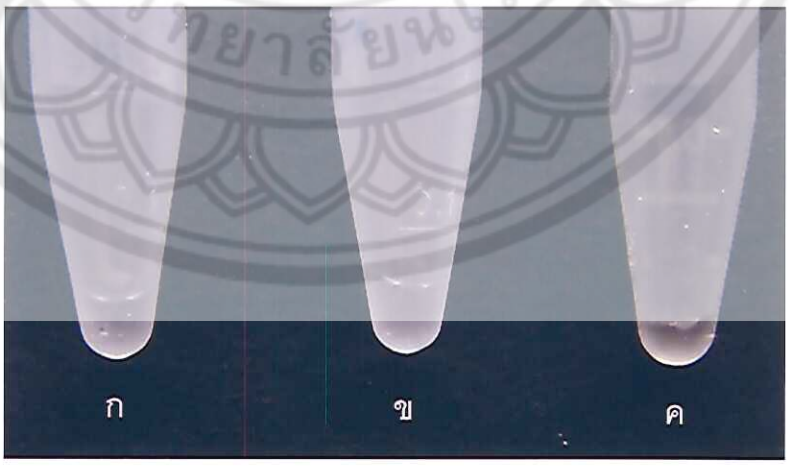
ในการศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้างนั้น ตัวอย่างที่นำมาทำการศึกษาสุ่มคัดเลือกมาจากการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลช้าง ในพื้นที่ตัวอย่างที่มีการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้ดังกล่าว ได้แก่ จังหวัดตาก นครสวรรค์ ลำปาง และน่าน รวมทั้งตัวอย่างของกล้วยไม้สกุลช้างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยขั้นตอนนี้ได้ออกทำการเก็บตัวอย่างของกล้วยไม้สกุลช้างจากพื้นที่ตัวอย่างต่างๆ ได้แก่ จากจังหวัดตาก จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea*) 4 ตัวอย่าง และไอยเรศ (*R. retusa*) 4 ตัวอย่าง จากนครสวรรค์ จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ช้างกระ (*R. gigantea*) 3 ตัวอย่าง และเขาแกะ (*R. coelestis*) 5 ตัวอย่าง จากจังหวัดลำปาง ได้แก่ ช้างกระ (*R. gigantea*) 2 ตัวอย่าง จากจังหวัดน่าน ได้แก่ ไอยเรศดำ (*R.* sp.) 2 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น ช้างกระ (*R. gigantea*) 9 ตัวอย่าง เขาแกะ (*R. coelestis*) 5 ตัวอย่าง ไอยเรศ (*R. retusa*) 4 ตัวอย่าง และไอยเรศดำ (*R.* sp.) 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่เก็บมาศึกษานั้น ทำการปลูกเลี้ยง ณ เรือนกล้วยไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และได้ทำการเก็บบันทึกข้อมูลเบื้องต้นทางสัณฐานวิทยาบางประการแล้วสุ่มเลือกตัวอย่างในกลุ่มช้าง 3 ตัวอย่าง เขาแกะ 1 ตัวอย่าง ไอยเรศ 1 ตัวอย่าง ไอยเรศดำ 1 ตัวอย่าง และไอยเรศดำในสภาพปลอดเชื้อ 1 ตัวอย่าง เพื่อใช้ศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ โดยทำการตัดใบอ่อนมาเก็บรักษาไว้โดยแช่เย็นที่อุณหภูมิ -80 ^{o}C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการต่างๆ เปรียบเทียบกัน 3 วิธี ซึ่งได้แก่ วิธีการสกัดของ Doyle และ Doyle (1987) วิธีการสกัดของ Lim และคณะ (1997) และวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant ทำการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ พบว่าให้ผลการทดลองดังนี้

จากการทดลองสกัดดีเอ็นเอเบื้องต้น เปรียบเทียบกันทั้ง 3 วิธีดังกล่าว และตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจลนั้น พบว่า DNA ที่ได้จากวิธีการสกัดของ Lim และคณะ (1997) เมื่อนำมาตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจลแล้ว ไม่พบแถบดีเอ็นเอ รวมทั้งสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ภายหลังจากการสกัดพบว่ามีสีเหลือง น้ำตาล (แสดงดังภาพที่ 3ค) เนื่องจากวิธีนี้อาจไม่เหมาะสำหรับการนำมาสกัดตัวอย่างกล้วยไม้ที่นำมาศึกษา ทำให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอภายหลังจากการตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล และอาจมีการปนเปื้อนของสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) หรือสารพวก polysaccharide ที่มีอยู่ในพืช (Lim และคณะ, 1997) ดังนั้น ในการทดลองต่อมาจึงไม่นำวิธีการสกัดของ Lim มาเปรียบเทียบในการทดลอง

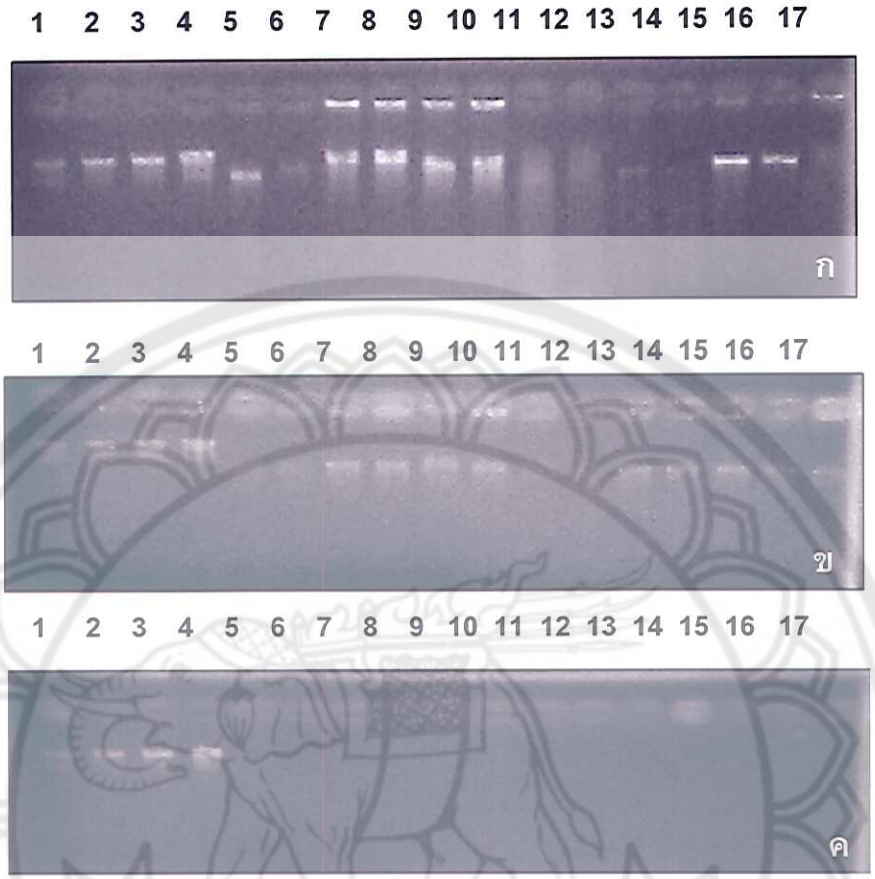
และจากการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้างโดยวิธี Doyle และ Doyle (1987) โดยแบ่งกลุ่มเป็นตัวอย่างกล้วยไม้ช้าง (lane 5-10) เขาแกะ (lane 11-12) ไอยเรศ (lane 13-17) (ภาพที่ 4ก) พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ในกลุ่มกล้วยไม้ช้าง (lane 5-10) นั้นมีปริมาณสูง เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่สังเกตได้นั้นมีความเข้มมาก (high yield) ส่วนดีเอ็นเอที่ได้การสกัดจากกล้วยไม้ในกลุ่มเขาแกะ (lane 11-12) พบว่ามีคุณภาพไม่ดี เนื่องมาจากมีการแตกหักของโมเลกุลดีเอ็นเอ ทำให้เห็นผลการตรวจสอบผลโดยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจลเป็นปื้น สำหรับกล้วยไม้ในกลุ่มของไอยเรศ (lane 13-17) พบว่า มีบางตัวอย่างที่ได้ปริมาณดีเอ็นเอมาก คุณภาพดี ดีเอ็นเอไม่แตกหัก แต่บาง

ตัวอย่าง (lane 13,14 และ 17) ได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย อาจเนื่องจากตัวอย่างมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน และชนิดของเนื้อเยื่อ ที่มีองค์ประกอบของเส้นใยมาก ทำให้ในขั้นตอนการบดตัวอย่างนั้นทำได้ยาก ซึ่งทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ต่ำไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sharma และคณะ (2003) ที่แสดงให้เห็นว่าในการสกัดดีเอ็นเอจากใบของอินทผลัม (*Phoenix dactylifera*) จะได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย และคุณภาพต่ำ เนื่องจากใบของอินทผลัมมีเส้นใยสูง ทำให้ยากต่อการบด โดยสรุปวิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Doyle-Doyle มีความเหมาะสมสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากกลุ่มตัวอย่างกล้วยไม้บางชนิด (species) หากเป็นชนิด (species) ที่เหมาะสมจะทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่มาก มีคุณภาพดี และเป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก ใช้เวลาการสกัดไม่มากนัก

และในการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant โดยแบ่งกลุ่มเป็นตัวอย่างกล้วยไม้ช้าง (lane 5-10) เขาแกะ (lane 11-12) ไอยเรศ (lane 13-17) พบว่าการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ NucleoSpin® Plant มีข้อดีคือ ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ไม่แตกหัก ได้สารละลายดีเอ็นเอที่ใสและไม่มีสี (แสดงดังภาพที่ 3ข และตารางที่ 2) การใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ NucleoSpin® Plant จึงเป็นวิธีที่ดีหากต้องการดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี เนื่องจากสามารถกำจัดสารปนเปื้อน จำพวกโปรตีน สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) และสารพวก polysaccharide ที่มีอยู่มากในพืช ออกไปได้ นอกจากนี้ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ NucleoSpin® Plant จะมีปริมาณที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน สังเกตจากความเข้มของแถบที่ได้จากการ ตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล ยกเว้นในกรณีของกลุ่มเขาแกะ (lane 11-12) ทั้งนี้อาจเนื่องจากลักษณะเฉพาะของกล้วยไม้กลุ่มเขาแกะ ที่อาจมีสารจำเพาะบางอย่างที่มีผลต่อการสกัดดีเอ็นเอ ทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอค่อนข้างน้อย จึงควรปรับหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้กลุ่มเขาแกะ ในกรณีที่ต้องการปริมาณดีเอ็นเอในการทดลองปริมาณมาก



ภาพที่ 3(ก-ค) แสดงลักษณะสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการ Doyle และ Doyle (1987) (ก) วิธีสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant (ข) และ วิธีการสกัดของ Lim และคณะ (1997) (ค)



ภาพที่ 4(ก-ค) แสดงจากการตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล (ก) เป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) (ข) วิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีของ NucleoSpin® Plant และ (ค) วิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีของ Lim และคณะ (1997) โดยช่องที่1-4 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นได้แก่ λ 125 ng, λ 250 ng, λ 375 ng, และ λ 500 ng ตามลำดับ ช่องที่ 5-6 ช้างกระ ช่องที่ 7-8 ช้างเผือก ช่องที่ 9-10 ช้างแดง ช่องที่ 11-12 เขาแกะ ช่องที่ 13-14 ไอยเรศ ช่องที่ 15-16 ไอยเรศดำ และช่องที่ 17 ไอยเรศดำในสภาพปลอดเชื้อ

การวัดคุณภาพของดีเอ็นเอโดยปกติสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เทคนิค spectrophotometer เนื่องจากดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ได้ และจากผลการทดลองสกัดดีเอ็นเอเปรียบเทียบกันทั้ง 2 วิธี ที่กล่าวมาแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงสามารถคำนวณออกมาเป็นค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าปริมาณดีเอ็นที่สกัดได้มีปริมาณใกล้เคียงกัน นอกจากนี้การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ยังสามารถทำให้ทราบได้ว่าในการสกัดดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของโปรตีนมากน้อยเพียงใด โดยพิจารณาจากอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ A260/280 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ A260/280 ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 2 วิธีนั้น ให้ค่าอัตราส่วนน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือสารละลายฟีนอล

อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตอาจไม่สอดคล้องกับผลการตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจลโดยตรง ทั้งนี้ในการสกัดดีเอ็นเอ หากมี RNA หรือมีสาร CTAB สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ปนเปื้อนในสารละลายดีเอ็นเอบางส่วน อาจมีผลรบกวนต่อค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่อาจมีความคลาดเคลื่อนจากกระบวนการวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ง่าย เนื่องจากขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ วิธีนี้จึงไม่เหมาะสำหรับการวัดดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อย ๆ (<1 µg/ml) เนื่องจากค่าที่ได้อาจไม่น่าเชื่อถือ ดังนั้นในการทดลองที่ต้องการความแม่นยำสูง ๆ จึงมีการประยุกต์ใช้ fluorometric data มาใช้ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอแทนวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ Spectrophotometer (Drabkova *et al.*, 2002)

ตารางที่ 2 แสดงผลค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ Spectrophotometer

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลช้างที่สกัดดีเอ็นเอ	Doyle และ Doyle		NucleoSpin® Plant	
	A260/A280	[DNA] ng/µl	A260/A280	[DNA] ng/µl
ช้างกระ (*R. gigantea*)	1.1	3350	1.1	2262.5
ช้างแดง (*R. gigantea* var. *rubrum*)	1.2	2887.5	1.2	2387.5
ช้างเผือก (*R. gigantea* var. *harrisonianum*)	1.1	2575	1.2	2575
เขาแกะ (*R. coelestis*)	1.1	2712.5	1.1	2450
ไอยเรศ (*R. retusa*)	1.1	1912.5	1.2	2337.5
ไอยเรศดำ (*R.* sp.)	1.1	3050	1.1	2625
ไอยเรศดำในสภาพปลอดเชื้อ	1.1	2325	1.2	2500

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลช้างนั้น นอกจากจะมีความแตกต่างกันตามชนิดที่จำแนกได้ชัดเจนแล้ว ยังมีความแตกต่างกันภายในชนิดเดียวกันด้วยโดยเฉพาะกล้วยไม้ในกลุ่ม *Rhynchostylis gigantea* ซึ่งพบว่า มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะใบ ราก ลำต้น และที่เห็นได้ชัดเจนคือ ดอก และวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลช้างคือ วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) ซึ่งให้ผลดีและไม่แตกต่างจากวิธีสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก สารเคมีสามารถเตรียมได้เองในห้องปฏิบัติการ และใช้เวลาสกัดไม่มากนัก

ข้อเสนอแนะ

จากรายงานการศึกษาเรื่องการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง นั้น พบว่า สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้าง และเป็นพื้นฐานในการศึกษาวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ ได้แก่ AFLP technique ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

http://orchids21.tripod.com/Html/Rhynchostytis.html

ไพบูลย์ มงคลถาวรชัย. 2520. ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกล้วยไม้ในสกุลช้างกับสกุลใกล้เคียง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, 50 หน้า.

ไพบูลย์ มงคลถาวรชัย. 2531. อนุกรมวิธานของกล้วยไม้ในสกุลช้าง. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 16(20): 71.73.

สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง. 2543. การประยุกต์ใช้เทคนิคด้าน DNA fingerprinting ในประเทศไทย. ใน การสัมมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืช ครั้งที่ 13 วันที่ 13-14 ธันวาคม 2543. สมาคมปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Buldewo, S. and Jaufeerally-Fakin, Y.F. (2002). Isolation of clean and PCR-amplifiable DNA from *Anthurium andreanum*. Plant Mol Biol Rep, 20: 71a-g.

Csaikl, U.M., Bastian, H., Brettschneider, R. Gauch, S., Meir, A., Schauerte, M., Scholz,F., Sperisen, C., Vornam, B. and Ziegenhagen, B. (1998). Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. Plant Mol Biol Rep, 16: 69-86.

Doyle, J., and Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh Leaf tissue. Phytochem Bulletin, 19:11–15.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissues. Focus, 12(1): 13-15.

Drabkova, L., Kirscher, J. and Vleck C. (2002). Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. Plant Mol Biol Rep, 20: 161-175.

Filatov, D.A. and Charlesworth. (1999). DNA polymorphism, haplotype structure and balancing selection in the Leavenworthia PgiC locus. Genetics, 153:1423-1434.

Hattori, J.S., Gottlob-McHugh, G. and Johnson, D.A. (1987). The isolation of higher molecular weight DNA from plants. Anal Biochem, 165: 70-74.

Kobayashi, N., Horikoshi, T., Katsuyama, H., Handa, T. and Takayanagi, K. (1998). A simple efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. Plant Tiss Cult Biotech, 4:76-80.

Lim, S.H., Liew, C.F., Lim, C.N., Lee, Y.H. and Goh, C.J. (1997). A simple and efficient method of DNA isolation from orchid species and hybrids. Biologia Plant, 41(2): 313-316.

Mauricio, R, Stahl, E.A., Korves, T., Tian, D., Kreitman, M., and Bergelson, J. (2003). Natural Selection for Polymorphism in the Disease Resistance Gene Rps2 of *Arabidopsis thaliana*. Genetics, 163:735-746.

Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res, 8:4321-4325.

Porebski, S., Bailey, L.G., and Baum, B.R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Mol Biol Rep, 15:8-15.

Rogstad, S.H. (1992). Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analysis. Taxon, 41:701-708.

Rowland, L.J. and Nguyen, B. (1993). Use of polyethylene glycol for purification of DNA from leaf tissue of woody plants. BioTechnique, 14:735-736.

Schlink, K. and Reski, R. (2002). Preparing high-quality DNA from moss (*Physcomitrella patens*). Plant Mol Biol Rep, 20: 423a-f.

Scott, K.D. and Playford, J. (1996). DNA extraction technique for PCR in rain forest plant species. BioTechnique, 20:974-979.

Sharma, A.D., Gill, P.K. and Singh, P. (2002). DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. Plant Mol Biol Rep, 20: 415a-f.

Sharma, R.m Mahla, H.R., Mohapata, T., Bhargava, S.C. and Sharma, M.M. (2003). Isolation plant genomic DNA without liquid nitrogen. Plant Mol Biol Rep, 21:43-50.

Smith, J.S.C. and Smith, O.S. (1992). Fringerprinting crop varieties. Adv Agron, 47:85-140.

Zhang, J. and Stewart, J.M. (2000). Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. J Cotton Sci, 4: 193-201.