Thai Journal of Genetics 2009, 3(1) : 41−50

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข่า (*Alpinia* spp.) ที่ใช้บริโภคโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี

Genetic diversity of edible galanga (*Alpinia* spp.) using AFLP technique

อารีย์รัตน์ ขุนภิบาล[1*] สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล[2] และ วิเชียร กีรตินิจกาล[1]

Areerat Khunpiban[1]*, Surin Peyachoknagul[2] and Vichien Keeratinijakal[1]

[1]ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[2]ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[1]Department of Agronomy, Faculty of Agriculture; [2]Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

** Corresponding author: areerat_r@hotmail.com*

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข่า (*Alpinia* spp.) ที่ใช้บริโภคในประเทศไทยจำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด *Eco*RI และ *Mse*I จำนวน 15 คู่ พบว่าสามารถให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 403 แถบ โดย 264 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้พอลิมอร์ฟิซึมระหว่างตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็น 65.51 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด โดยค่า polymorphic information contents (PICs) มีค่าระหว่าง 0.00-0.50 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.18 และเมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) และสร้างแผนภาพทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจำแนกข่าออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ซึ่งผลการวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี principal coordinate analysis (PCoA) ให้ผลค่อนข้างสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยการสร้างแผนภูมิพันธุกรรม และมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (similarity coefficient) อยู่ในช่วง 0.56-0.97 โดยมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 0.81 ซึ่งข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์และศึกษาพันธุ์ข่าต่อไปในอนาคต

ABSTRACT

Genetic diversity of 30 galanga (*Alpinia* spp.) accessions in Thailand was assessed using amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique. Fifteen *Eco*RI-*Mse*I primer combinations were used and 403 DNA bands/markers were produced. Two hundreds and sixty-four markers (65.51 %) were polymorphic. Polymorphic information contents (PICs) ranged from 0.00-0.50, with an average of 0.18. Phylogenetic tree was constructed using unweighted pair group method with arithmetic

mean (UPGMA). All galanga samples could be classified into 3 major clusters. Principal coordinate analysis (PCoA) was also performed and the result was rather consistent with phylogenetic analysis. The values of similarity coefficient varied from 0.56 to 0.97, with a mean of 0.81. This background genetic information will be useful to galanga improvement project in the future.

คำสำคัญ: ข่า, *Alpinia* spp., เอเอฟแอลพี, ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Keywords: galanga, *Alpinia* spp., AFLP, genetic diversity

บทนำ

ข่า (*Alpinia* spp.) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 48 (Saensouk, 2006) จัดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่ง ที่เป็นส่วนหนึ่งของวิถีการดำเนินชีวิตของคนไทยมายาวนาน มีการนำข่ามาใช้ในการปรุงอาหาร ทั้งส่วนของเหง้าแก่ เหง้าอ่อน และดอก (สุพจน์, 2543) นอกจากใช้เป็นอาหารแล้วยังมีสรรพคุณช่วยในการรักษาโรคได้หลายชนิด โดยมีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ ช่วยในการขับน้ำดีซึ่งทำให้การย่อยดีขึ้น ช่วยขับลม มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการแน่นจุกเสียด ลดการอักเสบ รักษาโรคผิวหนังกลากเกลื้อน แผลพุพอง ลมพิษ ลดไข้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคภูมิแพ้และรักษาโรคกระเพาะอาหาร เป็นต้น (รุ่งรัตน์, 2540; ชยันต์ และคณะ 2544; เดชา, 2546; อุไร, 2547)

ปัจจุบันผู้บริโภคส่วนใหญ่ ให้ความสำคัญในเรื่องการรักษาสุขภาพ ด้วยการใช้สมุนไพรมากขึ้น โดยเฉพาะเพื่อการป้องกันโรคมะเร็ง ข่าเป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่ง ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ มีส่วนช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้ จากงานวิจัยของ Itokawa *et al.* (1987) พบว่าสาร 1′ acetoxychavical acetate และ 1′ acetoxyeugenol acetate ในข่า มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดมะเร็งในหนูทดลองเช่นเดียวกับ Lee and Houghton (2005) รายงานว่า สาร 1′ acetoxychavical acetate จากข่า เป็นสารที่มีผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด CORL23 (human non-small cell lung cancer) และเซลล์มะเร็งเต้านม MCF7 (human breast adenocarcinoma) โดยพบว่าข่าจากประเทศไทยให้สาร 1’ acetoxychavical acetate มากกว่าข่าจากประเทศมาเลเซีย นอกจากนั้นสาร 1’ acetoxychavical acetate ที่สกัดจากเหง้าข่า ยังสามารถป้องกันการเจริญของเชื้อราได้อีกหลายชนิด (Janssen and Scheffer, 1985)

ข่า นิยมใช้เหง้าในการขยายพันธุ์ โดยในแต่ละท้องที่มีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น ข่าใหญ่ ข่าหยวก ข่าตาแดง ข่าเล็ก ข่าเหลือง ข่าหลวง ข่ากลาง ข่าลิง ข่าน้ำ เป็นต้น ซึ่งจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันออกไป เช่น ความสูงต้น รูปร่างและขนาดของใบ สีเนื้อใน ความแรงของกลิ่น ลักษณะและสีของดอก แต่ทั้งนี้ในบางลักษณะจะมีความคล้ายคลึงกันมากทำให้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ข่าได้ ซึ่งอาจเกิดจาก สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ปลูกนั้นมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของข่าทำให้เกิดความผิดพลาดในการจำแนกสายพันธุ์ หากใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ในการจำแนกเพียงอย่างเดียว

จากงานวิจัยของ Saritnum and Sruamsiri (2005) ได้รวบรวมข่าจากแต่ละพื้นที่ในประเทศไทยจำนวน 37 ตัวอย่าง ประกอบด้วยพันธุ์ปลูก 31 พันธุ์ และพันธุ์ป่า 6 พันธุ์ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA, RAPD) พบว่าพันธุกรรมของข่า จากแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ชนิดของข่า สีของเหง้า และสถานที่เก็บ นอกจากนี้ กฤษณา (2548) ได้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข่าจำนวน 20 ตัวอย่าง จากแหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism, AFLP) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 128 คู่ พบเพียง 15

คู่ ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากและชัดเจน เมื่อนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ มาสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรม พบว่าข่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แต่กลุ่มสายพันธุ์ข่าที่แบ่งตามข้อมูลทางพันธุกรรมกับกลุ่มตัวอย่างที่แบ่งตามปริมาณสาร 1' acetoxychavical acetate ไม่มีความสัมพันธ์กัน จากงานวิจัยที่ผ่านมาการจำแนกสายพันธุ์ข่ายังไม่ชัดเจน จึงได้มีแนวคิดในการนำเทคนิคเอเอฟแอลพี มาช่วยในการจำแนกสายพันธุ์ข่าเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ชัดเจนขึ้น วิธีนี้รวมเอาข้อดีของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism, RFLP) และประสิทธิภาพของพีซีอาร์เข้าด้วยกันซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ (สุรินทร์, 2545)

การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสายพันธุ์ข่าในประเทศไทยให้ชัดเจน ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคสามารถเลือกใช้ข่าแต่ละสายพันธุ์ได้ตรงตามความต้องการ และสามารถกำหนดปริมาณในการใช้ที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งถือเป็นการเพิ่มศักยภาพในการผลิตวัตถุดิบสมุนไพรอีกวิธีหนึ่ง

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างข่าและการสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างข่าพันธุ์ปลูกที่ได้รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยทั้งหมด 30 ตัวอย่าง (Table 1) มาสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธีดัดแปลงของ Agrawal *et al.* (1992)

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

นำดีเอ็นเอข่าที่สกัดได้ มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี ตามวิธีของ Vos *et al.* (1995) โดยนำดีเอ็นเอมาตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Mse*I และเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดย adapter ที่ต่อเข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ ซึ่ง adapter ที่ใช้คือ *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter มีลำดับเบสดังนี้

*Eco*RI adapter 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
*Mse*I adapter 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
3'-TACTCAGGACTCAT-5'

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ 2 ครั้ง ครั้งแรก (preselective amplification) เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 1 เบสที่ปลาย 3′ คือ E-A และ M-C (Table 2) และครั้งที่ 2 (selective amplification) นำผลผลิตที่ได้จากครั้งแรกมาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3′ เพื่อเพิ่มโอกาสในการคัดเลือกจำนวน 3 เบส คือ E-ANN และ M-CNN ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ไพรเมอร์จำนวน 15 คู่ (Table 2) จาก 42 คู่ ที่ใช้คัดเลือกเบื้องต้น และนำมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในพอลิอะคริลาไมด์เจล 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (Blum *et al.*, 1987)

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข่า ที่ได้จากการตรวจสอบโดยเทคนิคเอเอฟแอลพีมาเป็นข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ผล เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของทุกตัวอย่าง ถ้ามีแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น "1" ถ้าไม่มีแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น "0" แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์พอลิมอร์ฟิซึม โดยพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น หาค่า polymorphic information contents (PICs) จากนั้นคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Jaccard (Jaccard, 1908) แล้วนำมาสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean

Table 1 Accessions of galanga used in this study.

No.	Local name	Source
1	Kha Yuak	Kong Krailat, Sukhothai
2	Kha	Pak Chom, Loei
3	Kha Yai	Chulabhorn, Nakhon Si Thammarat
4	Kha Lueang	Sapphaya, Chai Nat
5	Kha Yai	Tha Uthen, Nakhon Phanom
6	Kha Yuak	Wang Saphung, Loei
7	Kha Leg	Chulabhorn, Nakhon Si Thammarat
8	Kha Ta Daeng	Phran Kratai, Kamphaeng Phet
9	Kha Ta Daeng	Ao Luek, Krabi
10	Kha	Ongkharak, Nakhon Nayok
11	Kha Yai	Klaeng, Rayong
12	Kha Yai	Mueang Nong Khai, Nong Khai
13	Kha Yuak	Chiang Khan, Loei
14	Kha Yuak	Si Nakhon, Sukhothai
15	Kha Yai	Lam Sonthi, Lop Buri
16	Kha Luang	Ao Luek, Krabi
17	Kha Yai	Nong Muang, Lop Buri
18	Kha Yai	Mueang Nongbua Lamphu, Nong Bua Lamphu
19	Kha Yai	Phrom Phiram, Phitsanulok
20	Kha Yuak	Pho Prathap Chang, Phichit
21	Kha Yuak	Chum Phae, Khon Kaen
22	Kha Yuak	Phaisali, Nakhon Sawan
23	Kha Yai	Non Sila, Khon Kaen
24	Kha Yuak	Mueang Chumphon, Chumphon
25	Kha Yuak	Mueang Chumphon, Chumphon
26	Kha Yuak	Khian Sa, Surat Thani
27	Kha Yai	Phunphin, Surat Thani
28	Kha Yai	Ron Phibun, Nakhon Si Thammarat
29	Kha Yai	Phana, Amnat Charoen
30	Kha Yai	Khamcha-i, Mukdahan

(UPGMA) คำนวณค่า cophenetic correlation coefficient (r) เพื่อเปรียบเทียบว่า แผนภูมิทางพันธุกรรมที่ได้จากกระบวนการจัดกลุ่มนั้น มีความสัมพันธ์กับค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเริ่มต้นอย่างไร สอดคล้องกันหรือไม่และวิเคราะห์ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มด้วยค่า bootstrap (Efron, 1979) ด้วยโปรแกรม winboot จำนวน 1000 ครั้ง โดยแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์อยู่บนกิ่งของ tree และวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี principal coordinate analysis (PCoA) เพื่อจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ในรูป 3 มิติ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.20k (Rohlf, 2005)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยบันทึกลักษณะต่างๆ ของเหง้า ได้แก่ กลิ่น สีหน่อ สีเหง้า สี

Table 2 AFLP primers and their sequences.

Pre-selective primers: (primer+1)		
*Eco*RI -primer+1 (E-A)		5'-GACTGCGTACCAATTC**A**-3'
*Mse*I -primer+1 (M-C)		5'-GATGAGTCCTGAGTAA**C**-3'
Selective primers: (primer+3)		
primer E-ANN/M-CNN		
E1-AAG/M1-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTC**AAG**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CAC**-3'
E2-ACT/M2-CAT	5'-GACTGCGTACCAATTC**ACT**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CAT**-3'
E3-ACG/M3-CTC	5'-GACTGCGTACCAATTC**ACG**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CTC**-3'
E4-AGG/M4-CTT	5'-GACTGCGTACCAATTC**AGG**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CTT**-3'
E5-AGC/M5-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTC**AGC**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CAC**-3'
E6-AAC/M6-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTC**AAC**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CAC**-3'
E7-AAC/M7-CAG	5'-GACTGCGTACCAATTC**AAC**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CAG**-3'
E8-ACC/M8-CTC	5'-GACTGCGTACCAATTC**ACC**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CTC**-3'
E9-ACC/M9-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTC**ACC**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CAC**-3'
E10-ACC/M10-CAG	5'-GACTGCGTACCAATTC**ACC**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CAG**-3'
E11-AGC/M11-CAA	5'-GACTGCGTACCAATTC**AGC**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CAA**-3'
E12-AGG/M12-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTC**AGG**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CAC**-3'
E13-AGC/M13-CTC	5'-GACTGCGTACCAATTC**AGC**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CTC**-3'
E14-AGG/M14-CTG	5'-GACTGCGTACCAATTC**AGG**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CTG**-3'
E15-AAG/M15-CAT	5'-GACTGCGTACCAATTC**AAG**-3' /	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**CAT**-3'

เนื้อ ความถี่ข้อปล้อง และขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางเหง้า

ผลการทดลองและวิจารณ์

การวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข่าที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยจำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ ชนิด *Eco*RI และ *Mse*I จากการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์จำนวน 42 คู่ ได้เลือกใช้คู่ไพรเมอร์ 15 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน พบแถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 403 แถบ โดยเฉลี่ยเท่ากับ 27 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างจำนวน 139 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เป็นพอลิมอร์ฟิซึมจำนวน 264 แถบ คิดเป็น 65.50 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายทั้งหมด โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็นพอลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ย 18 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ แสดงว่าตัวอย่างข่าที่นำมาทดลองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Saritnum and Sruamsiri (2005) ที่ได้รวบรวมข่าจากแต่ละพื้นที่ในประเทศไทยจำนวน 37 ตัวอย่าง ประกอบด้วยพันธุ์ปลูก 31 พันธุ์ และพันธุ์ป่า 6 พันธุ์ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าพันธุกรรมของข่าจากแต่ละพื้นที่ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยสามารถใช้เป็นแหล่งของเชื้อพันธุกรรม (germplasm) สำหรับการปลูกคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ค่า PICs มีค่าระหว่าง 0.00-0.50 โดยมีค่า PICs เฉลี่ยที่ได้จากการทดลองเท่ากับ 0.18 มีค่า cophenetic correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.95 ซึ่ง Sirithunya *et al.* (2001) รายงานว่า ค่า r เป็นค่าที่บอกว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ที่ได้จากกระบวนการจัดกลุ่มนั้น มีความสัมพันธ์กับค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเริ่มต้น

อย่างไร สอดคล้องกันหรือไม่ โดยค่า r ที่ต่ำกว่า 0.7 ถือว่าการจัดกลุ่มนั้นไม่สอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเริ่มต้น ค่าอยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ถือว่าสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเริ่มต้นปานกลาง ค่าอยู่ระหว่าง 0.8-0.9 ถือว่าสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเริ่มต้นค่อนข้างมาก และค่าอยู่ระหว่าง 0.9-1.0 ถือว่าสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเริ่มต้นมากที่สุด จากผลการทดลอง ถือว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่ได้จากกระบวนการจัดกลุ่ม สอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเริ่มต้นมากที่สุด เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถจำแนกข่าออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ (Figure 1) และมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมซึ่งคำนวณด้วยวิธี Jaccard อยู่ในช่วง 0.56-0.97 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 0.81 ค่อนข้างสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยวิธี PCoA (Figure 2) ที่มีองค์ประกอบหลักที่ 1, 2 และ 3 ครอบคลุมความแปรปรวน 18.92 เปอร์เซ็นต์ 12.43 เปอร์เซ็นต์ และ 8.21 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ เมื่อพิจารณาภายในกลุ่มที่ 1 พบว่ามีการกระจายตัวของตัวอย่างค่อนข้างสูง และพบว่าค่า bootstrap ส่วนมากมีค่าสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการจัดกลุ่มมีความน่าเชื่อถือค่อนข้างสูง

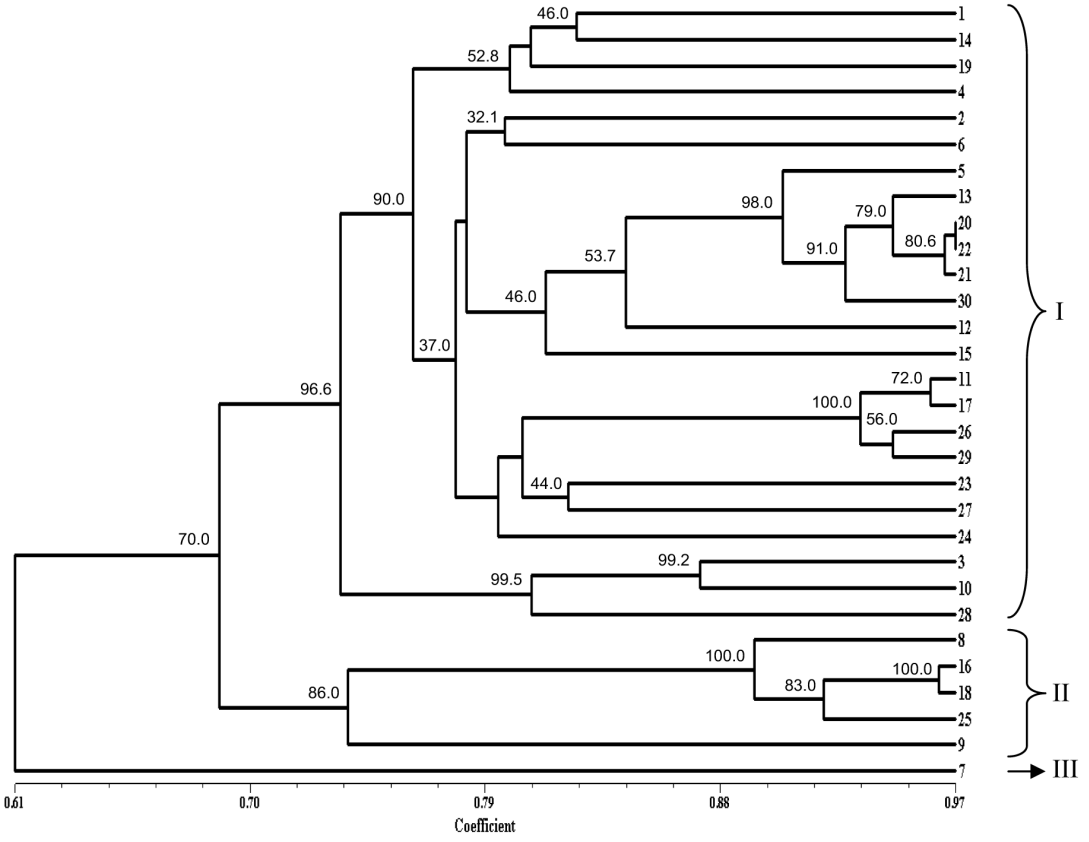

Figure 1 Phylogenetic tree of 30 galanga accessions from Thailand based on the UPGMA cluster analysis and Jaccard's similarity coefficients values obtained from the AFLP data. Bootstrap values are shown on the nodes.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถจัดกลุ่มข่าได้ แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับการจัดกลุ่ม โดยการสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมจากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่า สามารถแบ่งข่าตามขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของเหง้า (Figure 3) ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ โดยในแต่ละกลุ่ม มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันภายในกลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ข่า 24 ตัวอย่าง คือ ข่าตัวอย่างที่ 1 (ข่าหยวก จ. สุโขทัย), 14 (ข่าหยวก จ. สุโขทัย), 19 (ข่าใหญ่ จ. พิษณุโลก), 4 (ข่าเหลือง จ. ชัยนาท), 2 (ข่า จ. เลย), 6 (ข่าหยวก จ. เลย), 5 (ข่าใหญ่ จ. นครพนม), 13 (ข่าหยวก จ. เลย), 20 (ข่าหยวก จ. พิจิตร), 22 (ข่าหยวก จ. นครสวรรค์), 21 (ข่าหยวก จ. ขอนแก่น), 30 (ข่าใหญ่ จ. มุกดาหาร), 12 (ข่าใหญ่ จ. หนองคาย), 15 (ข่าใหญ่ จ. ลพบุรี), 11 (ข่าใหญ่ จ. ระยอง), 17 (ข่าใหญ่ จ. ลพบุรี), 26 (ข่าหยวก จ. สุราษฎร์ธานี), 29 (ข่าใหญ่ จ. อำนาจเจริญ), 23 (ข่าใหญ่ จ. ขอนแก่น), 27 (ข่าใหญ่ จ. สุราษฎร์ธานี), 24 (ข่าหยวก จ. ชุมพร), 3 (ข่าใหญ่ จ. นครศรีธรรมราช), 10 (ข่าแกง จ. นครนายก) และ 28 (ข่าใหญ่ จ. นครศรีธรรมราช) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหง้าโดยรวม คือเหง้ากลิ่นฉุนอยู่ในระดับปานกลาง สีของหน่อส่วนมากจะมีสีชมพูอ่อน สีเหง้ามีสีขาวถึงเหลือง สีเนื้อมีสีขาวถึงเหลือง ความถี่ข้อปล้องค่อนข้างจะมีขนาดใหญ่ คือมีขนาด 1.0-2.0 เซนติเมตร และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเหง้าประมาณ 3.0-4.5 เซนติเมตร ในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข่า 5 ตัวอย่าง คือ ข่าตัวอย่างที่ 8 (ข่าตาแดง จ. กำแพงเพชร), 16 (ข่าหลวง จ. กระบี่), 18 (ข่าใหญ่ จ. หนองบัวลำภู), 25 (ข่าหยวก จ. ชุมพร) และ 9 (ข่าตาแดง จ. กระบี่) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหง้าโดยรวม คือมีกลิ่นฉุนอยู่ในระดับปานกลาง สีของหน่อจะมีสีชมพู

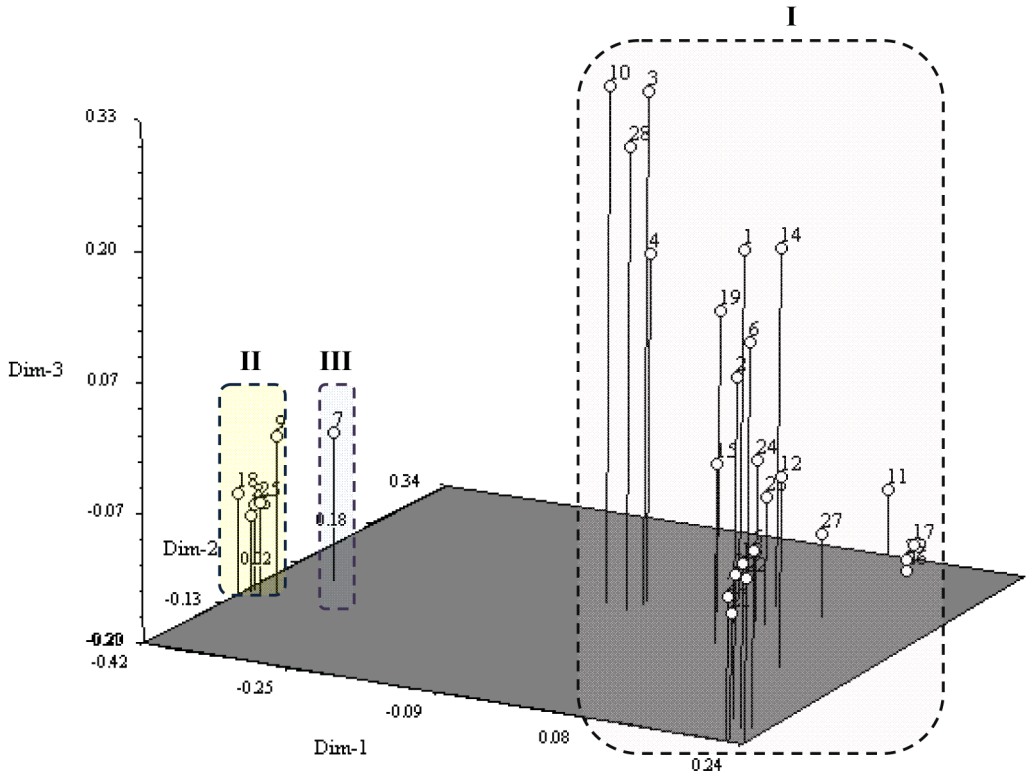

Figure 2 Patterns of relationships among 30 galanga accessions revealed by principal coordinate analysis (PCoA) based on AFLP data.

Figure 3 The size and characteristic of galanga (*Alpinia* spp.) rhizome in each group. (A) An example from group 1, (B) group 2 and (C) group 3.

อ่อนถึงแดง สีเหง้ามีสีขาวและชมพู สีเนื้อมีสีขาวถึงเหลือง ความถี่ข้อปล้องมีขนาด 1 เซนติเมตร และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเหง้าประมาณ 2.0-3.0 เซนติเมตร ในกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยข่า 1 ตัวอย่าง คือ ข่าตัวอย่างที่ 7 (ข่าเล็ก จ. นครศรีธรรมราช) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหง้า คือมีกลิ่นฉุนมาก มีหน่อสีชมพูอ่อน เหง้าสีขาว เนื้อสีขาว มีความถี่ของข้อปล้อง 1.0 เซนติเมตร และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเหง้าเท่ากับ 1.5 เซนติเมตร เมื่อพิจารณาเกี่ยวกับแหล่งที่เก็บตัวอย่างและชื่อท้องถิ่นของข่าในแต่ละกลุ่มพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับการจัดกลุ่มเนื่องจากในแต่ละกลุ่มมีความหลากหลายของแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

ผลการจัดกลุ่มตัวอย่างข่าด้วยวิธี PCoA พบว่าให้ผลการทดลองส่วนใหญ่ สอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA คือ สามารถแบ่งตัวอย่างข่าออกเป็นสามกลุ่มใหญ่ แต่จากแผนภาพสามมิติ ตัวอย่างที่ 3, 4, 10 และ 28 ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ในการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถจำแนกเป็นกลุ่มย่อยได้อย่างชัดเจน (Figure 1) เนื่องจากผลการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ตัวอย่างดังกล่าวแตกต่างจากตัวอย่างอื่นในกลุ่มที่ 1 มากที่สุด โดยจากแผนภูมิทางพันธุกรรมพบว่าตัวอย่างที่ 3, 4, 10 และ 28 แยกออกจากกลุ่มตัวอย่างอื่นในกลุ่มที่ 1 ที่ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมประมาณ 0.74 ในขณะที่ตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 ส่วนใหญ่มีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมากกว่า 0.77 ผลจากการแบ่งกลุ่มโดยใช้วิธี PCoA อาจให้ผลที่แตกต่างออกไปจากการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA เนื่องจากวิธี PCoA จะมีการแปลงข้อมูลและลดจำนวนตัวแปรลง ทำให้การจัดกลุ่มที่ได้ครอบคลุมตัวแปร หรือความแปรปรวนส่วนใหญ่ แต่ไม่ใช่ความแปรปรวนทั้งหมด ดังนั้นการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA จึงมีความน่าเชื่อถือมากกว่า

จากงานวิจัยของ Saritnum and Sruamsiri (2005) ได้รวบรวมข่าจากแต่ละพื้นที่ในประเทศไทยจำนวน 37 ตัวอย่าง ประกอบด้วยพันธุ์ปลูก 31 พันธุ์ และพันธุ์ป่า 6 พันธุ์ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าพันธุกรรมของข่าจากแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ชนิดของข่า สีของเหง้า และสถานที่เก็บ แต่จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าจากการจัดกลุ่มข่าด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี เมื่อพิจารณาร่วมกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ข้อมูลทางด้านพันธุกรรมของเครื่องหมายเอเอฟแอลพีนี้สามารถจำแนกกลุ่มข่าที่มีขนาดของเหง้าแตกต่างกันได้ ซึ่งนับว่าน่าสนใจมาก จึงควรศึกษาโดยละเอียดเพิ่มขึ้น รวมทั้งการเพิ่มจำนวนตัวอย่างข่าในแต่ละกลุ่ม โดยเฉพาะกลุ่มที่ 3 ที่มีขนาดเล็ก ซึ่งมีเพียงตัวอย่างเดียว และควรวิเคราะห์ปริมาณสาร 1’ acetoxychavical acetate ของข่าแต่ละตัวอย่างด้วย เพื่อตรวจดูว่ามีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยเทคนิคเอเอฟแอลพีหรือไม่ อย่างไรก็ตาม พบว่าข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดกลุ่มข่าไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่เก็บตัวอย่างและชื่อท้องถิ่น

สรุปผลการทดลอง

จากการรวบรวมข่า (*Alpinia* spp.) ที่ใช้บริโภคในประเทศไทยจำนวน 30 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ ชนิด *Eco*RI และ *Mse*I จำนวน 15 คู่ พบแถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 403 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่พบในทุกตัวอย่างจำนวน 139 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เป็นพอลิมอร์ฟิซึมจำนวน 264 แถบ โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็นพอลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ย 18 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ หรือคิดเป็น 65.50 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายทั้งหมด แสดงว่าตัวอย่างข่าที่นำมาศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยมีค่า PICs อยู่ระหว่าง 0.00-0.50 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.18 มีค่า cophenetic correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.95 ซึ่งถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ดีมาก และเมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถจำแนกข่าออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ สอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยวิธี PCoA และการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จะเห็นได้ว่าการใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีสามารถช่วยในการจัดกลุ่มของข่าที่ใช้บริโภคได้ โดยจะให้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น เมื่อพิจารณาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่เก็บตัวอย่างและท้องถิ่น ในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของข่า พบว่าข่าทั้ง 30 ตัวอย่างมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก ดังจะเห็นได้จากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่อยู่ในช่วง 0.61-0.97 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.81 ซึ่งข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมเหล่านี้จะเป็นประโยชน์กับการปรับปรุงพันธุ์และศึกษาพันธุ์ข่าต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรแห่งชาติ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยพันธุวิศวกรรมและวิเคราะห์จีโนม ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กฤษณา วงค์ปัญญา. 2548. *การจำแนกสายพันธุ์ข่าโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี.* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ชยันต์ พิเชียรสุนทร แม้นมาส ชวลิตร และ วิเชียร จีรวงส์. 2544. *ตำราพระโอสถพระนารายณ์* สำนักพิมพ์อมรินทร์ กรุงเทพฯ.

เดชา ศิริภัทรง. 2546. *สมุนไพรจากครัวไทย.* สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน กรุงเทพฯ.

รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2540. *พืชเครื่องเทศและสมุนไพร.* โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์ กรุงเทพฯ.

สุพจน์ คิลานเภสัช. 2543. *สมุนไพรเครื่องเทศและพืชปรุงแต่งกลิ่นรส.* สำนักพิมพ์ประพันธ์สาร์น จำกัด กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. *จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.* สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

อุไร จิรมงคลการ. 2547. *ผักพื้นบ้าน เล่ม 1.* สำนักพิมพ์บ้านและสวน กรุงเทพฯ.

Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves. *Biotech Biodiv Lett* 2: 19-24.

Blum, B., Beter, H. and Gross, H. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.

Efron, B. 1979. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Annual Stat* 7: 1-26.

Itokawa, H., Morita, H., Sumitomo, T., Totsuka, N. and Takeya, K. 1987. Antitumour principles from *Alpinia galangal*. *Planta Med* 54: 32-33.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vandoise des Sci Nat* 44: 223-270.

Janssen, A.M. and Scheffer, J.I.C. 1985. Acetoxychavicol acetate an antifungal component of *Alpinia galanga*. *Planta Med* 51: 507-511.

Lee, C.C. and Houghton, P. 2005. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *J Ethnopharmacol* 100: 237-243.

Rohlf, F.J. 2005. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System 2.2 ed.* Exeter Software. Setauket, New York.

Saensouk, S. 2006. *Taxonomy and Biology of the Genus Alpinia Roxb. (Zingiberaceae) in Thailand.* Ph.D. Thesis, Khon Kaen University.

Saritnum, O. and Sruamsiri, P. 2003**.** Random amplified polymorphic DNA analysis of galangal (*Alpinia* spp.) accessions. *CMU J* 2: 159-164.

Sirithunya, P., Roumn, E., Mongkolsamrit, S., Sriprakhon, S., Hutamekalin, P., Mayteeworakoon, S. and Sreewongchai, T. 2001. *Molecular Genetic Analysis of Diversity of Blast Pathogen in Thailand.* Yothee Laboratory Unit, Bangkok.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman ,J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23: 4407-4414.