

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยา

Genetic diversity of *Curcuma comosa* Roxb. revealed by DNA and morphological markers

กุหลาบ เหล่าสาธิต^{1*}, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล² และ วิเชียร กีร์ติณิจากุล¹

Kularb Loasatit^{1*}, Surin Peyachoknagul² and Vichien Keeratinijakul¹

¹ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

²ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Agronomy, Faculty of Agriculture;

²Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900

* Corresponding author: pigirosa@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอแฟลคพี ร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า ไพรมอร์ *EcoRI*-*MseI* จำนวน 9 คู่สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างที่ศึกษาทั้ง 33 ตัวอย่างได้ โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 161 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 102 แถบ คิดเป็น 63.35% ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด เมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA และวิธี PCoA พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน คือ สามารถจัดกลุ่มและจำแนกตัวอย่างทั้ง 33 ตัวอย่าง ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.49-1.00 จากข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มได้ โดยพิจารณาจาก

ลักษณะช่อดอกที่ต่างกัน

ABSTRACT

AFLP and morphological markers were applied to study genetic diversity of Waan Chak Modlook (*Curcuma comosa* Roxb.). Thirty-three samples of *Curcuma comosa* Roxb. were amplified with nine *EcoRI*-*MseI* primer combinations that generated a total of 161 bands, in which 102 of them or 63.35% of total bands were polymorphic. The UPGMA clusters derived from AFLP showed that they could be classified into two major groups. Principal coordinates analysis (PCoA) was also analyzed and the result was consistent with the grouping found in the dendrogram. The values of similarity coefficient ranged from 0.49-1.00.

Morphological characteristics could also be classified into two major groups with different inflorescence.

คำสำคัญ: ว่านชักมดลูก *Curcuma comosa* Roxb. เครื่องหมายเอเอฟแอลพี ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Keywords: Waan Chak Modlook, *Curcuma comosa* Roxb., AFLP marker, genetic diversity

บทนำ

ว่านชักมดลูก จัดเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้าน หัวหรือเหง้าใช้รักษาและบำรุงอาการต่างๆ ในสตรีที่เกี่ยวข้องกับมดลูก ว่านชักมดลูกที่พบในประเทศไทยมีหลายชนิด (Phiphitphibunsuk, 2007; Soontornchainaksaeng and Jenjittikul, 2010) แต่มีอยู่ชนิดหนึ่ง คือ *Curcuma comosa* Roxb. เป็นชนิดที่มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาแล้ว พบว่ามีฤทธิ์ที่สำคัญหลายประการ เช่น มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่อ่อนกว่า ซึ่งช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด เยื่อบุช่องมดลูก และช่วยเสริมสร้างความหนาแน่นของกระดูก (Piyachaturawat et al., 1995b; 1995c; Suksamrarn, 2008) ด้านอนุโมลอิสระ (Niumsakul et al., 2007) ลดคอเลสเตอรอลกระตุ้นการหลั่งน้ำดี (Piyachaturawat et al., 1995a; 1999; Suksamrarn et al., 1997) ลดการอักเสบ (Jantaratnotai, 2006; Sodsai, 2007) เป็นต้น ด้วยเหตุนี้ทำให้ว่านชักมดลูกเป็นพืชที่มีศักยภาพ ในการนำมาพัฒนาเป็นอาหารเสริม หรือยาสำหรับสตรี ทดแทนการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งมีผลข้างเคียงลงได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นเฉพาะว่านชักมดลูกชนิด *Curcuma comosa* Roxb. เท่านั้น ในปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกพันธุ์ของ *Curcuma comosa* Roxb. ยังมีข้อมูลอยู่น้อยมาก โดยคาดหวังว่า ถ้าพบพันธุ์ของ *Curcuma comosa* Roxb. ที่แตกต่างกันก็อาจจะมีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกันด้วย Soontornchainaksaeng and Jenjittikul (2010) ได้

ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน และความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก 24 ตัวอย่าง โดยใช้จำนวนโครโมโซม ลักษณะช่อดอก ดอก และลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ พบว่ามีว่านชักมดลูก 3 ชนิด คือ ชนิด *Curcuma comosa* Roxb., *Curcuma elata* และ *Curcuma latifolia* โดยว่านชักมดลูกชนิด *Curcuma comosa* Roxb. มีทั้งสิ้น 11 ตัวอย่างแบ่งเป็น 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ที่มีลักษณะช่อดอกรูปทรงกระบอกยาว มีจำนวนโครโมโซม $2n = 42$ และพันธุ์ที่มีช่อดอกรูปทรงกระบอกสั้น มีจำนวนโครโมโซม $2n = 62$ และ $2n = 63$ จากข้อมูลข้างต้น จึงน่าสนใจที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก โดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น แต่เนื่องจากการจำแนก *Curcuma comosa* Roxb. เป็นการแยกความแตกต่างภายในสปีชีส์ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนใหญ่คล้ายคลึงกันมาก ต้องอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกในการจำแนก และเนื่องจาก *Curcuma comosa* Roxb. เป็นพืชที่ออกดอกยาก ส่วนใหญ่ต้องปลูกข้ามปี และอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม จึงจะออกดอก ทำให้ต้องใช้เวลานานในการจัดจำแนกพันธุ์ จึงนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้ เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า สามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสิ่งมีชีวิตได้แม่นยำ มีความจำเพาะสูงรวมทั้งมีการประยุกต์ใช้กับพืชหลายชนิด (Powell et al., 1996) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาใช้ คือ เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism, AFLP) เนื่องจากมีความน่าเชื่อถือ ให้ผลสม่ำเสมอเมื่อทำซ้ำ ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน และไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสมาก่อน (สุรินทร์, 2552) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกพันธุ์ของ *Curcuma comosa* Roxb. โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยา

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างวัณชักมดลูกและการสกัดดีเอ็นเอ

รวบรวมตัวอย่างวัณชักมดลูกชนิด *Curcuma comosa* Roxb. จำนวน 33 ตัวอย่าง จาก 21 จังหวัด (Table 1) โดยเทียบลักษณะทางอนุกรมวิธานจาก Flora of British India (Hooker, 1894), Flora of Java (Backer and Bakhuizen van den Brink, 1968) และ Taxonomy and Phylogeny of the Genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae) with Particular Reference to Its Occurrence in Thailand (Maknoi, 2006) เพื่อให้แน่ใจว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษา เป็นวัณชักมดลูกชนิด *Curcuma comosa* Roxb. นำตัวอย่างดังกล่าวปลูกที่แปลงรวบรวมพันธุ์กรรม ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา จากนั้นนำไปอ่อนของตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธีประยุกต์จาก Agrawal *et al.* (1992)

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างที่สกัดได้ มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคเอเพอแอลพี ตามวิธีของ Vos *et al.* (1995) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอกับ adapter โดยนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *EcoRI* และ *MseI* และเชื่อมต่อกับ *EcoRI* และ *MseI* adapter (Table 2) โดยมีส่วนประกอบของสารดังนี้ ดีเอ็นเอ 250 นาโนกรัม เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *MseI* ชนิดละ 2.5 ยูนิต *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ความเข้มข้นอย่างละ 0.1 mM และ 1 mM ตามลำดับ 1 mM ATP, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate, 5 mM DTT, BSA 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และ T_4 DNA ligase ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 °C ข้ามคืน

Table 1 Waan Chak Modlook (*Curcuma comosa* Roxb.) used in this study.

No.	Source	No.	Source	No.	Source
1	Ayutthaya	12	Surin	23	Sa Kaeo
2	Phichit	13	Krabi	24	Songkhla
3	Prachuap Khiri Khan	14	Surin	25	Prachin Buri
4	Songkhla	15	Nakhon Pathom	26	Nakhon Phanom
5	Nong Khai	16	Kanchanaburi	27	Lop Buri
6	Ratchaburi	17	Maha Sarakham	28	Chiang Mai
7	unknown	18	Maha Sarakham	29	unknown
8	Ratchaburi	19	Kanchanaburi	30	Surat Thani
9	Kamphaeng Phet	20	Surin	31	Kanchanaburi
10	Chiang Mai	21	Chai Nat	32	Phetchabun
11	Nakhon Pathom	22	Chachoengsao	33	Sa Kaeo

Table 2 Nucleotide sequences of *EcoRI* and *MseI* adapters.

Adapters	Nucleotide sequences
<i>EcoRI</i> adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
<i>MseI</i> adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ครั้ง ครั้งแรก (preselective amplification) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่เพิ่มเบส 1 เบสที่ปลาย 3' คือ E-A (5'-GACTGCGTACCAATTCA-3') และ M-C (5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3') โดยมีส่วนผสมของสารดังนี้ ดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adapter แล้ว 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ E-A และ M-C ชนิดละ 0.2 μ M, 0.2 mM dNTP mix, 1x PCR buffer และ 1.5 mM $MgCl_2$ ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร โดยใช้ Taq DNA polymerase 0.2 ยูนิต ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที, 56°C นาน 1 นาที และ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 20 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจล อะกาโรสเข้มข้น 1.5% เจือจางสารละลายดีเอ็นเอ 20 เท่า ในบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่ 2 (selective amplification) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสอีก 2 เบสที่ปลาย 3' คือ E-ANN และ M-CNN ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งสิ้น 9 คู่ไพรเมอร์ คือ E-ACC/M-CAC, E-AAG/M-CAG, E-ACC/M-CAG, E-AAC/M-CAG, E-AGC/M-CAG, E-AGG/M-CAT, E-ACC/M-CTG, E-ACG/M-CTT และ E-ACT/M-CTA โดยมีส่วนผสมของสารดังนี้ สารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้ว 5 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ E-ANN และ M-CNN ชนิดละ 0.25 μ M, 0.2 mM dNTP mix, 1x PCR buffer และ 1.5 mM $MgCl_2$ ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ใช้ Taq DNA polymerase 0.2 ยูนิต ทำปฏิกิริยา touch down PCR โดยเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที, 65 °C นาน 30 วินาที และ 72 °C นาน 1 นาที จำนวน 12 รอบ แต่ละรอบจะลดอุณหภูมิ annealing จาก 65 °C จนถึง 56 °C โดยลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.7 °C หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที, 56 °C นาน 30 วินาที และ 72 °C นาน 1 นาที

จำนวน 23 รอบ

3. ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลพอลิอะครีลาไมด์ 6% และย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (Blum *et al.*, 1987)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

จากข้อมูลลายพิมพ์แอฟแอลพีที่ได้ นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอของตัวอย่าง โดยให้สัญลักษณ์เป็น “1” เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้สัญลักษณ์เป็น “0” เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.20k (Rohlf, 2002) สร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA; Sneath and Sokal, 1973) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Jaccard's similarity coefficients (Jaccard, 1908) จัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี principal coordinate analysis (PCoA) คำนวณค่า Mantel's correlation test (cophenetic correlation coefficient, r ; Mantel, 1967; Sokal and Rohlf, 1994) และค่า polymorphic information contents (PICs; Anderson *et al.*, 1993) และประเมินความเชื่อมั่นของแผนภูมิทางพันธุกรรม โดยการทำ bootstrap ด้วยโปรแกรม winboot (Yap and Nelson, 1996)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของตัวอย่าง ได้แก่ รูปร่างลักษณะหัว และการแตกเหง้าแขนง สีเนื้อในหัว รูปร่างลักษณะใบ สีของเส้นกลางใบ การมีขนที่แผ่นใบด้านล่าง และลักษณะช่อดอก

ผลการทดลองและวิจารณ์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

จากการศึกษาลายพิมพ์แอฟแอลพีของตัวอย่างจำนวน 33 ตัวอย่าง พบว่า ไพรเมอร์ *EcoRI*-*MseI*

จำนวน 9 คู่ สามารถใช้แยกความแตกต่างของตัวอย่างทั้งหมดได้ โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งสั้น 161 แถบเฉลี่ย 17.89 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไพรเมอร์ฟิชชัน 102 แถบ คิดเป็น 63.35% ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด โดยไพรเมอร์ E-AGG/M-CAT ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุด 26 แถบ และไพรเมอร์ E-ACG/M-CTT ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด 12 แถบ ไพรเมอร์ที่ให้ค่าพอลิเมอร์ฟิชชันมากที่สุด 95% คือไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG จากค่าพอลิเมอร์ฟิชชันที่มีค่าเท่ากับ 63.35% แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างที่ศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับปานกลาง เมื่อพิจารณาค่า PICs ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงโอกาสที่จะพบตัวอย่างที่สุ่มมา 2 ตัวอย่างว่ามีความแตกต่างกันอย่างน้อยเพียงใด พบว่าค่าที่ได้อยู่ระหว่าง 0.00-0.50 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.16 แสดงว่าโอกาสที่จะพบตัวอย่างที่

สุ่มมาแบบสุ่ม 2 ตัวอย่างมีความแตกต่างกัน หรือมี
 ความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง
 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาดอโลมอร์ฟิซึมของแอล
 ลีเอ็นเอที่กล่าวมาข้างต้น เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทาง
 พันธุกรรม พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทาง
 พันธุกรรมซึ่งคำนวณด้วยวิธี Jaccard's similarity
 coefficients มีค่าอยู่ในช่วง 0.49-1.00 เฉลี่ย 0.81 จาก
 ข้อมูลลายพิมพ์เอเอฟแอลพี สามารถสร้าง phylogenetic
 tree ด้วยวิธี UPGMA โดยสามารถจัดกลุ่มและ
 จำแนกตัวอย่างทั้ง 33 ตัวอย่าง ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่
 (Figure 1) โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 29 ตัวอย่าง คือ
 ตัวอย่างที่ 1-16, 18-25, 27-30 และ 32 ส่วนกลุ่มที่ 2
 ประกอบด้วย 4 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 17, 26, 31 และ
 33 เมื่อจัดกลุ่มด้วยวิธี PCoA (Figure 2) ที่มีองค์
 ประกอบหลักที่ 1, 2 และ 3 ครอบคลุมความแปร

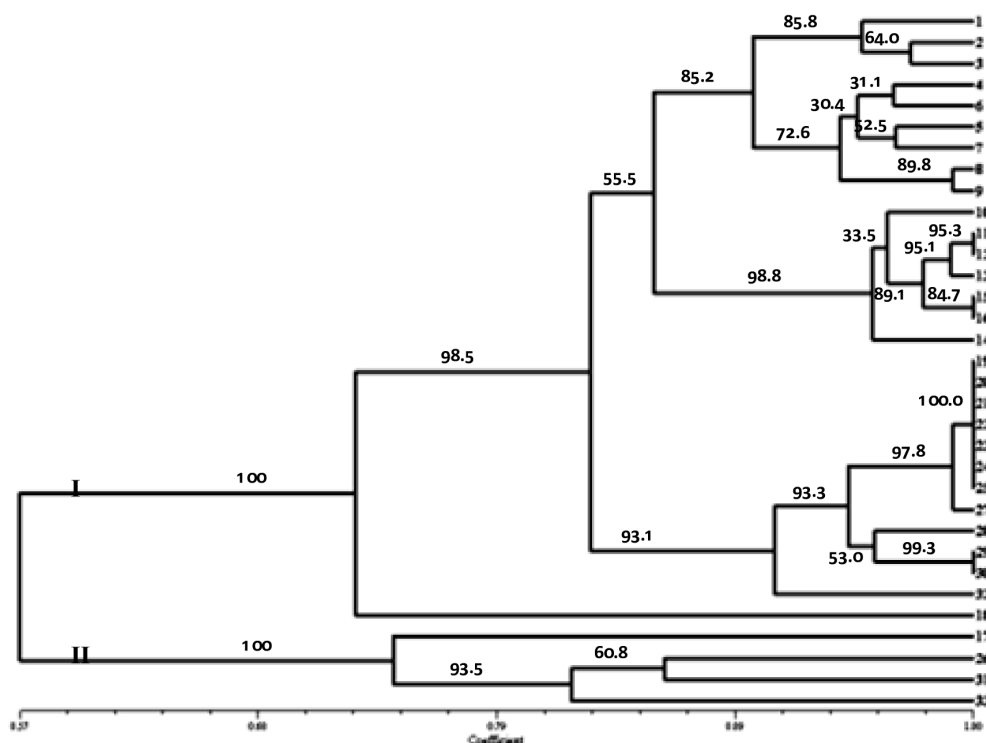


Figure 1 Dendrogram of 33 Waan Chak Modlook (*Curcuma comosa* Roxb.) accessions resulting from the UPGMA cluster analysis based on Jaccard's similarity coefficients values obtained from the AFLP data. Bootstrap values are shown on different nodes.

ปรวน 31.63%, 23.85% และ 12.96% ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ พบว่าการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ให้ผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยวิธี PCoA ส่วนค่า cophenetic correlation coefficient (r) มีค่าเท่ากับ 0.98 ซึ่งแสดงว่าข้อมูลที่ได้มีความน่าเชื่อถือสูง (Mantel, 1967; Sokal and Rohlf, 1994) สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่า bootstrap ด้วยโปรแกรม winboot ที่พบว่าส่วนใหญ่มีค่า bootstrap สูงกว่า 50 % (Figure 1)

เมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มตัวอย่างร่วมกับแหล่งที่มา พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่จัดได้ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของตัวอย่าง กล่าวคือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 1 มีความหลากหลายของแหล่งที่มาสูง ตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ รวมรวบได้จากหลายจังหวัด หลายพื้นที่ กระจายครอบคลุมทุกภูมิภาคของประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอย่างที่ 11 กับ 12, 15 กับ 16, 19-25 และ 29 กับ 30 เป็นตัวอย่างที่รวบรวมได้จากคนละจังหวัดต่างพื้นที่กัน แต่มีสายพืชมาร์เอเอฟแอลพี

เหมือนกัน มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเท่ากับ 1 แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างดังกล่าวอาจเป็นพันธุ์การค้าที่ซื้อขายกันทั่วไปทำให้พบกระจายอยู่ในหลายพื้นที่ ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 2 พบว่ารวบรวมได้จากคนละจังหวัดต่างภูมิภาคเช่นกัน แต่อาจจะไม่ครอบคลุมทุกภูมิภาคของประเทศไทยเนื่องจากตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ยังมีจำนวนน้อย และพบว่า จังหวัดมหาสารคาม กาญจนบุรี และสระแก้ว เป็นจังหวัดที่พบวุ้นชกมดลูกทั้ง 2 กลุ่ม

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของตัวอย่าง ได้แก่ รูปร่างลักษณะหัว และการแตกเหง้าแขนง สีเนื้อในหัว รูปร่างลักษณะใบ สีของเส้นกลางใบ การมีขนที่แผ่นใบด้านล่าง และลักษณะช่อดอก พบว่าตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มมีลักษณะเหมือนกัน คือ มีหัวหลักกลม ไม่มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้างมีเพียงดิ่งเล็กๆ ที่จะออกเป็นต้นใหม่

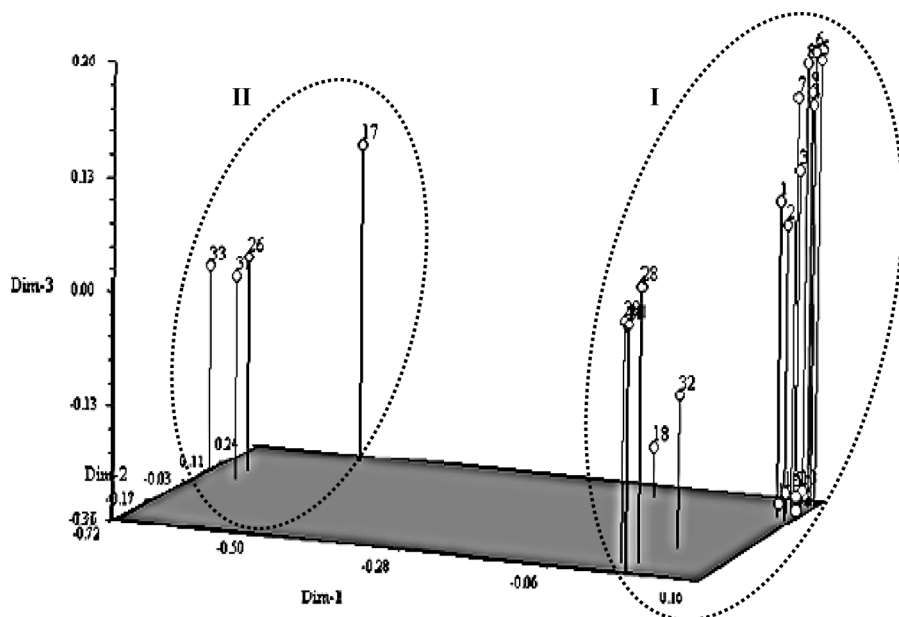


Figure 2 Patterns of relationships among 33 Waan Chak Modlook (*Curcuma comosa* Roxb.) accessions revealed by principal coordinate analysis (PCoA) based on AFLP data. Number 1-33 represents different accessions (Table 1).

หรือหัวใหม่เท่านั้น เนื้อในหัวมีสีเหลืองซีด รูปร่างใบเป็นรูปขอบขนานแกมรี สีของเส้นกลางใบตอนใบอ่อนจะมีสีแดง แต่เมื่อโตขึ้นสีแดงจะซีดจางลง ลักษณะดอกออกเป็นช่อแทงจากพื้นดิน ก้านช่อดอกสั้นมากและไม่พบขนที่แผ่นใบด้านล่าง ส่วนลักษณะที่แตกต่างกันของตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม คือ ลักษณะช่อดอก ซึ่งพบว่าตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ออกดอกทั้งหมด 15 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 29 ตัวอย่าง พบว่าลักษณะช่อดอกคล้ายทรงกระบอกสั้น (Figure 3) กลีบประดับตอนบน (coma bract) มีสีชมพูทั้งกลีบ หรือสีขาวแต้มสีชมพู กลีบประดับตอนล่าง (flower bract) มีสีขาวแต้มสีชมพู หรือสีขาวทั้งกลีบ มีดอก (flower) สีเหลืองอ่อนแถบตรงกลางสีเหลืองเข้มอยู่ภายใน ปลายกลีบประดับบน ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ออกดอกครบทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่าลักษณะช่อดอกคล้ายทรงกระบอกยาว (Figure 3) กลีบประดับตอนบนสีขาวแต้มสีชมพูอ่อน หรือสีขาวทั้งกลีบ กลีบประดับตอนล่างมีสีขาวทั้งกลีบ มีดอกสีขาวแถบตรงกลางสีเหลืองเข้มอยู่ภายใน

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่มสอดคล้องกับข้อมูลลายพิมพ์เอเอฟแอลพี ถึงแม้ว่าตัวอย่างกลุ่มที่ 1 จะยังออกดอกไม่ครบทุกตัวอย่าง แต่จากตัวอย่างทั้งหมด 15 ตัวอย่างที่ออกดอก พบว่าลักษณะดอกที่ปรากฏมีลักษณะเหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน จึงมีแนวโน้มว่าตัวอย่างที่เหลืองที่ยังไม่ออกดอกน่าจะมีลักษณะดอกที่เหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Soontornchainaksaeng and Jenjittikul (2010) คือสามารถแบ่งว่านชักมดลูกชนิด *Curcuma comosa* Roxb. ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีลักษณะช่อดอกเป็นรูปทรงกระบอกสั้น และกลุ่มที่มีลักษณะช่อดอกทรงกระบอกยาว

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของ *Curcuma comosa* Roxb. จำนวน 33 ตัวอย่าง พบว่าไพรเมอร์ *EcoRI*-*MseI* จำนวน 9 คู่ สามารถใช้แยก



Figure 3 Inflorescences of Waan Chak Modlook (*Curcuma comosa* Roxb.): cluster I (first row) and cluster II (second row).

ความแตกต่างของตัวอย่างทั้งหมดได้ เมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA วิธี PCoA และลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน คือ สามารถจัดกลุ่มและจำแนกตัวอย่างทั้ง 33 ตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม ได้แก่ รูปร่างลักษณะหัว และการแตกเหง้าแขนง สีเนื้อในหัว รูปร่างลักษณะใบ สีของเส้นกลางใบ และการมีขนที่แผ่นใบด้านล่าง พบว่ามีลักษณะเหมือนกัน แต่สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มได้ โดยพิจารณาจากลักษณะช่อดอกที่แตกต่างกัน ถึงแม้ตัวอย่างที่ศึกษาจะยังออกดอกไม่ครบ แต่ตัวอย่างที่ออกดอกแล้วและถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม มีลักษณะช่อดอกเหมือนกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าตัวอย่างในกลุ่มดังกล่าว จะมีลักษณะช่อดอกเช่นนั้น แสดงให้เห็นว่าข้อมูลลายพิมพ์เอเอฟแอลพีสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกพันธุ์ของว่านชักมดลูกได้

จากข้อมูลผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *Curcuma comosa* Roxb. มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและสามารถแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าตัวอย่างคนละกลุ่ม อาจมีชนิดและปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกันดังนั้นจึงควรศึกษาชนิดและปริมาณสารสำคัญทางเคมี และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ *Curcuma comosa* Roxb. แต่ละกลุ่มเพื่อหาสายพันธุ์ที่มีปริมาณสารและฤทธิ์ทางเภสัชที่ดีเพื่อความปลอดภัยและประโยชน์สูงสุดของผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. *เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์*. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 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.
Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E.,

Tanksley, S.D. and Sorrells, M.E. 1993. Optimising parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181-186.

Backer, C.A. and Bakhuizen van den Brink, R.C.. 1968. *Flora of Java: Spermatophytes Only*. N.V.P Noordhoff, Netherland.

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

Hooker, J.D. 1984. *Flora of British India*. L. Reeve & Co., Ltd., Ashford.

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

Jantaratnotai, N., Utaisinchaoen, P., Piyachaturawat, P., Chongthammakun, S. and Sanvarinda, Y. 2006. Inhibitory effect of *Curcuma comosa* on production and cytokine expression in LPS-activated microglia. *Life Sci* 78: 571-577.

Maknoi, J. 2006. *Taxonomy and Phylogeny of the Genus Curcuma L. (Zingiberaceae) with Particular Reference to Its Occurrence in Thailand*. Ph.D. thesis, Prince of Songkla University.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220.

Niumsukul, S., Hirunsaree, A., Wattanapitayakul, S., Junsuwanitch, N. and Prapanupan, K. 2007. An antioxidative and cytotoxic substance extracted from *Curcuma comosa* Roxb. *J Thai Trad* 5: 24-29.

Phiphitphibunsuk, W. 2007. *Identification and specification of Wan Chak Motluk (Curcuma spp.) in Thailand*. M.Sc. Thesis, Mahidol University.

- Piyachaturawat, P., Teeratagolpibal, N., Toskulkao, C. and Suksamrarn, A. 1995a. Hypolipidemic effect of *Curcuma comosa* in mice. *Artery* 22: 233-241.
- Piyachaturawat, P., Ercharuporn, S. and Suksamrarn, A. 1995b. An estrogenic activity of *Curcuma comosa* extract in rats. *Asia Pacific J Pharmacol* 10: 121-126.
- Piyachaturawat, P., Ercharuporn, S. and Suksamrarn, A. 1995c. A uterotrophic effect of *Curcuma comosa* extract in rats. *Int J Pharmacog* 33: 334-338.
- Piyachaturawat, P., Charoenpiboonsin, J., Toskulkao, C. and Suksamrarn, A. 1999. Reduction of plasma cholesterol by *Curcuma comosa* extract in hypercholesterolaemic hamsters. *J Ethnopharmacol* 66: 199-204.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSRs markers for germplasm analysis. *Mol Breed* 2: 225-238.
- Rohlf, F.J. 2002. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.20k. Exeter Software. Setauket, New York.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman and Co., San Francisco.
- Sodsai, A., Piyachaturawat, P., Sophasan, S., Suksamrarn, A. and Vongsakul, M. 2007. Suppression by *Curcuma comosa* Roxb. of pro-inflammatory cytokine secretion in phorbol-12-myristate-13-acetate stimulated human mononuclear cells. *Int Immunopharmacol* 7: 524-531.
- Sokal, R.R. and Rohlf, J. 1994. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 3rd ed. Freeman & Co, New York.
- Soontornchainaksaeng, P. and Jenjittikul, T. 2010. Chromosome number variation of phytoestrogen-producing *Curcuma* (Zingiberaceae) from Thailand. *J Nat Med* 64:370-377.
- Suksamrarn, A., Eiamong, S., Piyachaturawat, P. and Byrne, L.T. 1997. A phloracetophenone glucoside with choleric activity from *Curcuma comosa*. *J Phytochem* 45: 103-105.
- Suksamrarn, A., Ponglikitmongkol, M., Wongkrajang, K., Chindaduang, A., Kittidanairak, S., Jankam, A., Yingyongnarongkul, B., Kittipanumat, N., Chokchaisiri, R., Khetkam, P. and Piyachaturawat, P. 2008. Diarylheptanoid, new phytoestrogens from the rhizomes of *Curcuma comosa*: isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation. *Bioorg Med Chem* 16: 6891-6902.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D., 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.
- Yap, V. and Nelson, R.J. 1996. *Winboot: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-Based Dendrograms*. IRRI, Philippines.