Thai J. Genet. 2012, 5(1) : 67-78

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระดับต่ำของกระชายกระบี่ พืชเฉพาะถิ่นที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

Low genetic variation of *Boesenbergia tenuispicata*, a species endangered and endemic to Thailand, using RAPD markers

โองการ วณิชาชีวะ

Ongkarn Vanijajiva

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร, กรุงเทพฯ 10220

Faculty of Science and Technology, Phranakhon Rajabhat University, Bangkok 10220

E-mail: vanijajiva@pnru.ac.th

บทคัดย่อ

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระชายกระบี่ (*Boesenbergia tenuispicata* K. Larsen) พืชเฉพาะถิ่นของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนมกราคม 2554 – มกราคม 2555 ในจังหวัดกระบี่ ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบมาทดสอบด้วยไพรเมอร์อาร์เอพีดีจำนวน 19 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 8 ชนิด ได้แก่ OPA-18, OPAM-01, OPAM-03, OPAM-12, OPB-14, OPD-03, OPD-18 และ OPZ-03 ใช้ทดสอบพบว่าให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนทั้งหมด 72 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 100 ถึง 2,800 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 12 แถบ (16.66%) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรมเอสพีเอสเอส (เวอร์ชั่น 18) พบว่าสามารถแบ่งประชากรของกระชายกระบี่ ตามบริเวณแหล่งที่พบได้เป็นสามกลุ่มใหญ่ โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง 0.840-1.000 จึงสรุปได้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดี เป็นเทคนิคที่นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมในกระชายกระบี่ได้ อย่างไรก็ตาม พบความแตกต่างน้อยในแถบดีเอ็นเอของกระชายกระบี่จากเทคนิคอาร์เอพีดี การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าทุกตัวอย่างมีพันธุกรรมที่ใกล้กัน และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อย จึงควรมีการอนุรักษ์ในทุกประชากรที่เก็บตัวอย่าง

ABSTRACT

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker was used to analyze genetic structure of the endemic Thai plant *Boesenbergia tenuispicata* K. Larsen. Twenty samples from each population were collected during January 2011 – January 2012 in Krabi, Thailand. Genomic DNA was extracted from fresh leaves. Nineteen RAPD primers were initially screened and eight primers (OPA-

18, OPAM-01, OPAM-03, OPAM-12, OPB-14, OPD-03, OPD-18 and OPZ-03) were chosen for further analysis. A total of 72 DNA fragments, varying from 100-2,800 bp, were amplified, of which 12 (16.66%) were polymorphic. A dendrogram was constructed based on polymorphic bands using the SPSS program (version 18). Three clusters could be separated with similarity coefficients ranging from 0.840-1.000. Therefore, RAPD marker is a rapid and suitable method for analysis of genetic diversity among endemic *B. tenuispicata* samples. Nevertheless, low polymorphic bands were detected, indicating that the genetic diversity of *B. tenuispicata* was low, and all populations most likely consisted of the same genotype. The result suggested that the management for the conservation of genetic variability in *B. tenuispicata* should aim to preserve every population.

คำสำคัญ: กระชายกระบี่ เครื่องหมายอาร์เอพีดี ความแปรปรวนทางพันธุกรรม

Keywords: *Boesenbergia tenuispicata*, RAPD marker, genetic variation

บทนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายของพรรณพืชสูง มีรายงานจำนวนชนิดของพรรณไม้ไว้กว่า 300 วงศ์ มากกว่า 15,000 ชนิด ซึ่งคิดเป็น 8 % ของชนิดพันธุ์พืชทั่วโลก (OEPP, 1992) ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อจัดทำหนังสือพรรณพฤกษชาติแห่งประเทศไทย (Flora of Thailand) โดยความร่วมมือของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช รวมทั้งนักพฤกษศาสตร์จากสถาบัน การศึกษาต่างๆ ทั้งชาวไทยและต่างประเทศ และได้จัดพิมพ์หนังสือ Flora of Thailand รวมทั้งสิ้น จำนวน 24 ตอน ในจำนวนนี้มีเฟิร์นจำนวน 659 ชนิด จาก 35 วงศ์ 133 สกุล และพืชเมล็ดเปลือย (Gymnosperm) จำนวน 25 ชนิด จาก 6 วงศ์ 7 สกุล และพืชดอก (Angiosperm) จำนวนมากกว่า 3,000 ชนิด ซึ่งยังมีพืชดอกอีกกว่า 94 วงศ์ ที่ยังไม่มีการศึกษาทบทวน ตัวอย่างเช่น กลุ่มพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีศูนย์กลางการกระจายพันธุ์ในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Larsen *et al*., 1998) พืชวงศ์ขิงเป็นพืชอีกกลุ่ม ที่ยังไม่มีการจัดพิมพ์ในหนังสือพรรณพฤกษชาติแห่งประเทศไทย (สำนักงานหอพรรณไม้, 2555) สันนิษฐานว่าในประเทศไทยมีจำนวนสมาชิกของพืชในวงศ์นี้ราว 200 ชนิด (Sirirugsa, 1998) ซึ่งพืชวงศ์นี้มีลักษณะพิเศษ คือทุกส่วนของต้นมีกลิ่นของน้ำมันหอมระเหย มีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร เป็นเครื่องเทศปรุงแต่งรสอาหาร ใช้ทำอาหาร สีย้อม เครื่องสำอาง และบางชนิดมีใบหรือดอกสวยงาม เป็นดอกไม้ประดับที่มีการปลูกในเชิงการค้า

พืชสกุลกระชาย (*Boesenbergia* O. Kuntze) เป็นพืชสกุลหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมากในกลุ่มของพืชวงศ์ขิง สกุลกระชายมีสมาชิกทั่วโลกราว 90 ชนิด (Sirirugsa, 1992) พบว่าศูนย์กลางการกระจายพันธุ์อยู่บริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศไทย สันนิษฐานว่าเป็นแหล่งวิวัฒนาการที่สำคัญของพืชในกลุ่มนี้ (Holttum, 1950; Larsen *et al*., 1998) ปัจจุบันมีรายงานไว้ราว 19 ชนิด (Sirirugsa, 1992; Larsen, 1993; Saensouk and Larsen, 2001) โดยกระชาย (*Bosenbergia rotunda* (L.) Mansf.) จัดเป็นพืชเพียงชนิดเดียวในสกุลนี้ ที่ใช้เป็นเครื่องเทศในการประกอบอาหาร และปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจ อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดจากเหง้าของกระชายมีคุณสมบัติในทางสมุนไพรและเภสัชวิทยาหลาย

ประการ (Mahidol *et al*., 1984) เช่น พบสาร cincole ที่ช่วยลดอาการปวดเกร็งของลำไส้ และยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบสารอีกหลายชนิด เช่น pinocembrin chalcone, cardamonin, pinocembrin และ pinostrobin เป็นต้น ที่สามารถป้องกันการเกิดเนื้องอกอันเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งได้ (Trakoontivakorn *et al*., 2001) รวมถึงสารที่ต่อต้านการเจริญเติบโตของไวรัส HIV อันเป็นสาเหตุของโรคเอดส์ได้ (Tuchinda *et al*., 2002) จากคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพืชในกลุ่มกระชาย พบว่ามีประโยชน์และน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง หากมีการศึกษาพืชชนิดอื่นๆ ในสกุลนี้อย่างจริงจัง อาจพบสมบัติทางเภสัชวิทยาสำคัญในอนาคต กระชายกระบี่ (*Boesenbergia tenuispicata* K. Larsen) (Larsen, 1993) เป็นพืชชนิดใหม่ของสกุลกระชาย มีรายงานการค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1993 บริเวณอำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการค้นพบพืชชนิดนี้จากบริเวณอื่น รวมทั้งยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ ทั้งในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม รวมถึงการกระจายพันธุ์ของพืชชนิดนี้มาก่อน

ความหลากหลายทางพันธุกรรม เป็นองค์ประกอบหนึ่งของความหลากหลายทางชีวภาพที่มีความสำคัญต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการอนุรักษ์ทรัพยากรทางชีวภาพที่มีอยู่ในประเทศให้มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องมีข้อมูลด้านพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพื่อใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อการอนุรักษ์ต่อไป ทั้งนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด นับว่าเป็นองค์ประกอบพื้นฐานสำคัญ ที่จะทำให้สิ่งมีชีวิตมีโอกาสในการอยู่รอดและปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อม ที่หลากหลายและผันแปร โดยหากสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม อาจส่งผลทำให้ไม่สามารถคงอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อม ที่เปลี่ยนแปลงไปในปัจจุบันและในระยะยาว (Beadmore, 1983; Vida, 1994) รวมถึงไม่สามารถทนต่อการแข่งขันและการต้านทานโรค และอาจสูญพันธุ์ได้ในอนาคต (van Valen, 1973) ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม นับว่าเป็นวิธีการสำคัญในการพัฒนากลยุทธ์ด้านการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ เพื่อนำข้อมูลหลากหลายทางพันธุกรรมไปใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์ทรัพยากรทางชีวภาพในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพต่อไป

เครื่องหมายทางโมเลกุลเป็นเครื่องมือที่สามารถช่วยในยืนยันการจำแนกสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphism DNA) คิดค้นโดย William *et al*. (1990) เป็นวิธีสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่นิยมใช้ศึกษากันในพืชวงศ์ขิง โดย Rout *et al.* (1998) นำมาใช้ตรวจสอบพันธุกรรมของขิง (*Zingiber officinale*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับการขยายพันธุ์แบบใช้เหง้า โดยใช้ไพรเมอร์ 15 ชนิด พบว่ามี 3 ไพรเมอร์ ที่ให้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน Prathepha (2000) ตรวจสอบความหลากหลายพันธุกรรมของกระเจียว (*Curcuma aeruginosa*) โดยใช้ไพรเมอร์ 20 ชนิด พบว่ามี 19 ไพรเมอร์สามารถให้ข้อมูลในการจำแนกพืชสกุลกระเจียวออกจากกันได้ นอกจากนี้พบว่าการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี สามารถนำไปใช้ในการยืนยันการจำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชวงศ์ขิงอีกหลายสกุล เช่น กลุ่มขิง (*Zingiber* spp.) (Rout *et al*., 1998) กลุ่มข่า (*Alpinia* spp.) (Dasuki *et al*., 2000) และ กลุ่มขมิ้น (*Curcuma*) (Prathepha, 2000; Zou *et al*., 2011) ในกลุ่มของพืชสกุลกระชาย

พบว่ามีเพียงงานวิจัยของ Vanijajiva *et al*. (2005) ที่ได้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อใช้ในจำแนกและหาความสัมพันธ์ของพืชในสกุลกระชายและสกุลใกล้เคียงจำนวน 19 ชนิด ในประเทศไทยได้ โดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด พบว่ามี 5 ไพรเมอร์ ให้รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นที่มีความหลากหลาย อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาการประยุกต์ใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระชายกระบี่ ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม ในระดับประชากรของพืชในกลุ่มกระชายมาก่อน

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ความหลากหลายทางด้านการกระจายตัวประชากร และลักษณะทางพันธุกรรมของกระชายกระบี่ที่พบในประเทศไทย ซึ่งผลการวิจัยจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต เพื่อป้องกันการสูญพันธุ์ไปของพืชชนิดนี้ รวมทั้งเป็นการสะท้อนภาพของทรัพยากรท้องถิ่นที่มีอยู่ในประเทศให้เป็นที่ประจักษ์ และมีส่วนช่วยผลักดันให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องเข้ามาช่วยเหลือ สนับสนุน และช่วยกันพัฒนาพืชชนิดนี้ให้อยู่คู่กับท้องถิ่นของตนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพืช

กระชายกระบี่จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเวลา ระหว่างเดือนมกราคม 2554 – มกราคม 2555 จากบริเวณพิกัดต่างๆ และหมายเลขตัวอย่าง ที่ได้เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ดังแสดงไว้ใน Table 1

การสกัดดีเอ็นเอ และการทำพีซีอาร์

นำส่วนใบอ่อนจำนวน 100-150 กรัม มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาบดในไนโตรเจนเหลวด้วยสารละลาย CTAB ดัดแปลงตามวิธีของ Vanijajiva *et al.* (2005) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้น 0.8 % นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบ กับไพรเมอร์จำนวน 19 ชนิด จากบริษัท Operon Technologies, California, USA (Table 2) โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 25 µl ประกอบด้วย 10x Promega reaction buffer (100 mM Tris–HCl pH 9, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 0.4 mM dNTP, 0.6 mM primer, 0.5 unit *Taq* polymerase (Promega), $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 3, 4, 5 mM และ 25, 50, 100 ng ของดีเอ็นเอกระชายกระบี่ต้นแบบ นำใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermohybaid PX2 (USA) ที่มีอุณหภูมิในขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ 94 °C นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 °C นาน 1 นาที 30 วินาที, 36 °C นาน 1 นาที และ 72 °C นาน 2 นาที จำนวน 45 รอบ และที่ 72 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจผลโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้น 1.8 % จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, UK) โดยใช้โปรแกรม Gene Snap นำผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Gene Tools (Syngene, Cambridge, UK) คัดเลือกไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณ และให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวแทนประชากรแต่ละชนิด และนำไปวิเคราะห์

Table 1 Samples of *Boesenbergia tenuispicata* used in this study with the coordinates and number.

Sample number	Sample site		Vouchers
	Latitude (North)	Longitude (East)	
BT1	N 8° 23'22.76"	E 98° 44'10.97"	OVB0305-11
BT2	N 8° 23'20.76"	E 98° 44'16.97"	OVB0505-11
BT3	N 8° 23'23.76"	E 98° 44'8.96"	OVB0705-11
BT4	N 8° 23'25.77"	E 98° 44'8.96"	OVB0805-11
BT5	N 8° 23'23.77"	E 98° 44'8.96"	OVB0905-11
BT6	N 8° 23'22.77"	E 98° 44'9.96"	OVB1105-11
BT7	N 8° 23'20.78"	E 98° 44'13.95"	OVB1305-11
BT8	N 8° 23'19.78"	E 98° 44'15.95"	OVB1505-11
BT9	N 8° 23'18.79"	E 98° 44'6.95"	OVB0406-11
BT10	N 8° 23'17.79"	E 98° 44'7.95"	OVB0506-11
BT11	N 8° 23'15.80"	E 98° 44'8.95"	OVB0906-11
BT12	N 8° 23'15.81"	E 98° 44'7.94"	OVB2105-11
BT13	N 8° 23'13.81"	E 98° 44'9.94"	OVB2205-11
BT14	N 8° 23'18.82"	E 98° 44'11.94"	OVB1106-11
BT15	N 8° 23'17.82"	E 98° 44'7.93"	OVB1406-11
BT16	N 8° 23'15.83"	E 98° 44'9.93"	OVB1506-11
BT17	N 8° 23'10.83"	E 98° 44'11.93"	OVB1805-11
BT18	N 8° 23'9.84"	E 98° 44'9.92"	OVB2005-11
BT19	N 8° 23'7.84"	E 98° 44'11.92"	OVB1706-11
BT20	N 8° 23'3.82"	E 98° 44'13.94"	OVB1906-11

การวิเคราะห์ข้อมูลและการจัดกลุ่ม (cluster analysis)

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างของกระชายกระบี่ โดยการนำข้อมูลที่ได้จากการให้คะแนน จากขนาดและจำนวนแถบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแทนด้วย “1” และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏที่ตำแหน่งเดียวกันแทนด้วย “0” แล้วนำค่าความแตกต่างทั้งขนาดและจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของกระชายกระบี่แต่ละตัวอย่าง นำข้อมูลไปเปรียบเทียบความเหมือน และความแตกต่างทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชั่น 18 เพื่อคำนวณความสัมพันธ์ และสร้างสายสัมพันธ์ที่เหมาะสม บ่งบอกความใกล้ชิดและความแตกต่างทางพันธุกรรมของกระชายกระบี่ทุกตัวอย่าง

การวิเคราะห์ผลของเทคนิคอาร์เอพีดี โดยวิเคราะห์ข้อมูลหาความสัมพันธ์ คำนวณหาค่าความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอในรูป similarity coefficient (Nei and Li, 1979) นำข้อมูลที่ได้มา

สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) โดยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA; Sneath and Sokal, 1973) และสร้างแผนผังการกระจายตัวและการรวมกลุ่ม โดยใช้วิธี principal component analysis (PCA) จากโปรแกรม SPSS version 18 (Norusis, 1990)

Table 2 Nucleotide sequences of the 10 deca nucleotide primers used in this study.

Primer number	Nucleotide sequence 5´ to 3´	% GC
OPA-02	TGCCGAGCTG	70
OPA-03	AGTCAGCCAC	60
OPA-04	AATCGGGCTG	60
OPA-10	GTGATCGCAG	70
OPA-18	AGGTGACCGT	70
OPAM-01	TCACGTACGG	70
OPAM-03	CTTCCCTGTG	60
OPAM-12	TCTCACCGTC	60
OPAM-18	ACGGGACTCT	60
OPB-01	GTTTCGCTCC	60
OPB-14	TCCGCTCTGG	70
OPC-01	TTCGAGCCAT	60
OPC-05	GATGACCGCC	70
OPD-02	GGACCCAACC	70
OPD-03	GTCGCCGTCA	70
OPD-08	GTGTGCCCCA	70
OPD-18	GAGAGCCAAC	60
OPK-05	TCTGTCGAGG	60
OPZ-03	CAGCACCGCA	70

ผลการทดลอง

การกระจายตัวของกระชายกระบี่

จากการสำรวจทั่วประเทศไทย พบว่ากระชายกระบี่เป็นพืชประจำถิ่นที่พบบริเวณภาคใต้ของประเทศไทยเท่านั้น (Larsen, 1993) โดยเฉพาะภาคใต้ฝั่งตะวันตกของประเทศไทย ซึ่งในอดีตได้มีการพบตัวอย่างพืชชนิดนี้ในจังหวัดพังงา และจังหวัดสุราษฎร์ธานี อย่างไรก็ตามจากการสำรวจพบว่าจำนวนประชากรของพืชชนิดนี้ลดลงอย่างมาก ในปัจจุบันพบกลุ่มประชากรของพืชชนิดนี้ในจังหวัดกระบี่ บริเวณอุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี อำเภออ่าวลึกเท่านั้น (Larsen, 1993) ซึ่งเป็นแหล่งประชากรสำคัญในการศึกษาครั้งนี้ โดยเลือกมา 20 ตัวอย่าง จาก 3 บริเวณหลักที่พบพืชชนิดนี้ โดยกลุ่มแรกจะอยู่บริเวณผาหินด้านหน้าของอุทยาน ในกลุ่มที่ 2 จะเป็นบริเวณเขาหินปูนด้านหลังวนอุทยาน และในกลุ่มสุดท้ายด้านข้างของวนอุทยาน ตามพิกัดดัง Table 1 จากการศึกษาพบว่าพืชชนิดนี้มีลักษณะสำคัญที่แตกต่างจากกระชายชนิดอื่นๆ คือ มักมีลำต้นขนาดเล็ก และมีช่อดอกเด่นที่เรียวยาวมีสีม่วงเข้ม ดอกมีขนาดเล็กสีเหลืองและมีสีส้มแดงแต้มตรงกลาง มักพบอยู่ตามบริเวณหน้าซอกหน้าผาหินปูน ออกดอกในช่วงจะอยู่ในราวเดือนพฤษภาคม จนถึง ตุลาคม และพักตัวราวเดือนพฤศจิกายน จนถึง เมษายน ในแต่ละรอบปี (Figure 1)

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมกระชายกระบี่

จากการทดสอบไพรเมอร์ 19 ชนิดที่มีปริมาณ G+C ตั้งแต่ 60 % ขึ้นไป (Table 2) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกระชายกระบี่ทั้ง 20 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าไพรเมอร์ที่เหมาะสมมี 8 ชนิดได้แก่ OPA-18, OPAM-01, OPAM-3, OPAM-12, OPB-14, OPD-03, OPD-18 และ OPZ-03 โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 72 แถบ เฉลี่ย 9 แถบต่อไพรเมอร์ โดยขนาดแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 100-2,800 คู่เบส

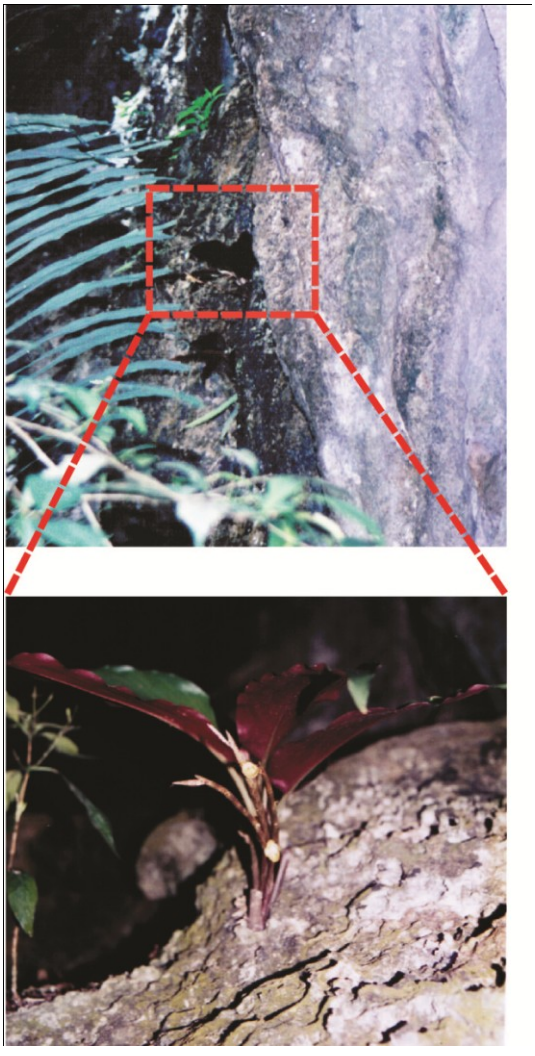

Figure 1 *Boesenbergia tenuispicata* is naturally found on limestone cliffs. See color figure on the website.

การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระชายกระบี่

จากข้อมูลรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อนำข้อมูลของขนาดและจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 8 ชนิด จำนวนทั้งหมด 72 แถบมาวิเคราะห์พบว่า มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 12 แถบ ที่แสดงความแตกต่างในกระชายกระบี่ทั้ง 20 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของการปรากฏของดีเอ็นเอโดยใช้สัญลักษณ์ “1” และเมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันโดยให้สัญลักษณ์ “0” นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS 18 เพื่อคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของกระชายกระบี่ทีละคู่ จนครบทั้ง 20 ตัวอย่าง แล้วนำมาสร้างเป็นตารางดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index) (Table 3) ซึ่งใช้เป็นข้อมูลในการสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) ที่เหมาะสม พบความสัมพันธ์ของกระชายกระบี่ทั้ง 20 ตัวอย่าง (Figure 2) และมีกลุ่มความสัมพันธ์ใน Figure 3 เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่ามีความใกล้ชิดกันสูงมีค่าอยู่ในช่วง 0.840-1.000 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า มีความหลากหลายหรือความแตกต่างของพันธุกรรมในระดับต่ำ

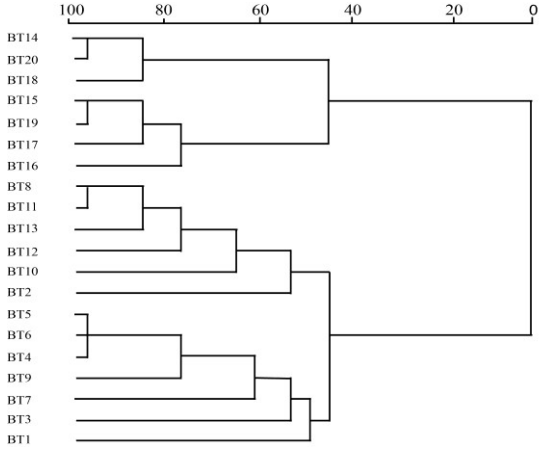

Figure 2 Dendrogram based on UPGMA analysis of genetic similarity of 20 samples of *B. tenuispicata* obtained from RAPD, showing relationships among individual plants.

Table 3 Pair-wise genetic similarity of 20 samples of *B. tenuispicata* according to the index of Nei and Li (1979).

	BT1	BT2	BT3	BT4	BT5	BT6	BT7	BT8	BT9	BT10	BT11	BT12	BT13	BT14	BT15	BT16	BT17	BT18	BT19	BT20
BT1	1.000																			
BT2	.964	1.000																		
BT3	.964	.963	1.000																	
BT4	.964	.926	.963	1.000																
BT5	.964	.926	.963	1.000	1.000															
BT6	.964	.926	.963	1.000	1.000	1.000														
BT7	.964	.963	.963	.963	.963	.963	1.000													
BT8	.906	.941	.941	.902	.902	.902	.902	1.000												
BT9	.926	.885	.923	.962	.962	.962	.923	.939	1.000											
BT10	.945	.943	.943	.906	.906	.906	.943	.960	.941	1.000										
BT11	.906	.941	.941	.902	.902	.902	.902	1.000	.939	.960	1.000									
BT12	.926	.923	.923	.923	.923	.923	.885	.980	.960	.941	.980	1.000								
BT13	.926	.962	.923	.885	.885	.885	.923	.980	.920	.980	.980	.960	1.000							
BT14	.885	.880	.880	.880	.880	.880	.840	.936	.917	.898	.936	.958	.917	1.000						
BT15	.885	.880	.880	.880	.880	.880	.920	.894	.917	.939	.894	.875	.917	.913	1.000					
BT16	.863	.857	.898	.898	.898	.898	.898	.913	.936	.917	.913	.894	.894	.933	.978	1.000				
BT17	.863	.898	.857	.857	.857	.857	.898	.913	.894	.917	.913	.894	.936	.933	.978	.955	1.000			
BT18	.906	.863	.902	.902	.902	.902	.863	.917	.939	.920	.917	.939	.898	.979	.936	.957	.913	1.000		
BT19	.885	.880	.880	.880	.880	.880	.920	.894	.917	.939	.894	.875	.917	.913	1.000	.978	.978	.936	1.000	
BT20	.885	.880	.880	.880	.880	.880	.840	.936	.917	.898	.936	.958	.917	1.000	.913	.933	.933	.979	.913	1.000

วิจารณ์ผลการทดลอง

การเตรียมดีเอ็นเอและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ใช้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อย แต่ต้องเป็นดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์และอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ (integrity) การเตรียมดีเอ็นเอจากใบกระชายกระบี่มีปัญหาค่อนข้างยาก เนื่องจากใบกระชายกระบี่มีสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) อยู่ในปริมาณมาก เช่นเดียวกับพืชวงศ์ขิงชนิดต่างๆ ดังนั้นการเตรียมดีเอ็นเอจากใบกระชายกระบี่ในครั้งนี้ ใช้วิธีการของ Doyle and Doyle (1987) ที่ปรับปรุง โดย Vanijajiva *et al.* (2005) ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดี ใช้เวลาในการสกัดน้อย สามารถทำได้หลายตัวอย่างต่อวัน การสกัดดีเอ็นเอควรสกัดจากใบอ่อน จะได้

ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีกว่าใบแก่ นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้กับพืชชนิดอื่นได้ และราคาไม่สูงมาก เมื่อเทียบกับน้ำยาสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Vanijajiva (2011) และ Vanijajiva (2012) ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอเดียวกัน โดยประยุกต์ใช้กับทุเรียน และได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สามารถนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไปได้

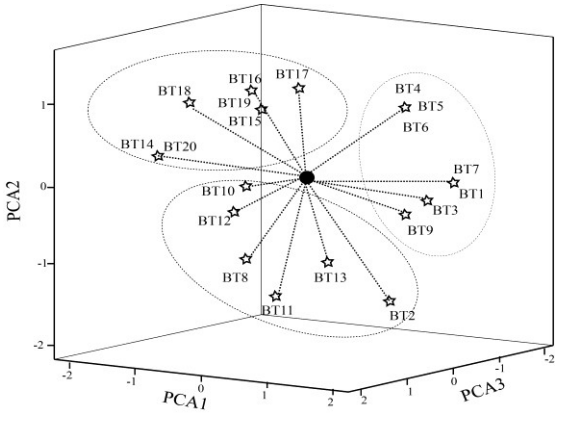

Figure 3 Plot of PCA analysis of genetic similarity of 20 samples of *B. tenuispicata* obtained from RAPD, showing groups individual plants

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระชายกระบี่

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระชายกระบี่ในครั้งนี้ พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย ซึ่งเป็นไปตามข้อสันนิษฐานที่ว่า พืชที่สามารถขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยอาศัยส่วนต่างๆ ในการขยายพันธุ์ โดยเฉพาะในกลุ่มของพืชวงศ์ขิง ซึ่งการขยายพันธุ์ของพืชในกลุ่มนี้ ส่วนใหญ่ใช้การแตกหน่อหรือเหง้า (rhizome) ในการขยายพันธุ์ จึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำกว่าพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ซึ่งมักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรค่อนข้างสูง (Hamrick and Godt, 1989) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของพืชที่มีการผสมข้ามต้นระหว่างเพศผู้และเพศเมีย พืชที่อาศัยลมเป็นพาหะในการกระจายพันธุ์ และพืชที่มีอายุหลายปี มักพบว่า มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากรสูงกว่า กลุ่มของพืชที่ขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะไม่มีการกลายพันธุ์ หรือสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้น เนื่องจากเป็นการสืบพันธุ์อย่างไม่สลับซับซ้อน ข้อดีของการสืบพันธุ์แบบนี้คือ สิ่งมีชีวิตสามารถเพิ่มจำนวนได้โดยไม่ต้องหาคู่ ในกรณีของสิ่งมีชีวิตที่เคลื่อนที่ไม่ได้สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่ต้องรอเวลาและประหยัดพลังงานในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการปฏิสนธิ (Loveless and Hamrick 1984)

จากการตรวจหาเครื่องหมายพันธุกรรมของกระชายกระบี่ 20 ตัวอย่างโดยเทคนิคอาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ 8 ชนิด พบว่าแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 100-2,800 คู่เบส แถบดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์มีจำนวนทั้งหมด 72 แถบ เฉลี่ย 9 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง จำนวน 12 แถบ (16.66 %) เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.840-1.000 (Table 3) และจากการนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี ไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของกระชายกระบี่ และนำไปสร้างรูปสายสัมพันธ์ (Figure 2) และกลุ่มความสัมพันธ์ (Figure 3) พบว่าสามารถแยกตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับบริเวณตัวอย่าง โดยกลุ่มแรกจะอยู่บริเวณผาหินด้านหน้าของอุทยาน ประกอบด้วย BT1, BT3, BT4, BT5, BT6 BT7 และ BT9 ในกลุ่มที่ 2 จะเป็นบริเวณเขาหินปูนด้านหลังวนอุทยานประกอบด้วย BT2, BT8, BT10, BT11, BT12, BT13 และในกลุ่ม

สุดท้ายจะอยู่ในบริเวณด้านข้างของวนอุทยาน ประกอบด้วย BT14, BT15, BT16, BT17, BT18, BT19 และ BT20 อย่างไรก็ตาม พบว่าดัชนีความใกล้ชิดของแต่ละตัวอย่างไม่แตกต่างกันมาก จึงสรุปได้ว่าในทุกบริเวณจากการเก็บตัวอย่างมีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นกระชายกระบี่ส่วนใหญ่ในบริเวณอุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี มีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันมาก น่าจะเกิดจากการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นส่วนใหญ่ เช่น เดียวกับพืชวงศ์ขิงชนิดอื่นๆ ทำให้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับต่ำ และบางกลุ่มประชากรมีความเหมือนกัน อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สามารถใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ในการตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระชายกระบี่ได้ และในอนาคตหากได้ตัวอย่างกระชายกระบี่จากบริเวณอื่นๆ เพิ่มเติม และเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ รวมทั้งใช้เทคนิคอื่นๆ ร่วมด้วยเช่น เอเอฟเอลพี (AFLP) ที่ให้ข้อมูลปริมาณมากขึ้น อาจทำให้ได้ข้อมูลของความหลากหลายกระชายกระบี่มากยิ่งขึ้น

การประยุกต์ใช้เพื่อการอนุรักษ์

จุดประสงค์สำคัญในการอนุรักษ์ทรัพยากรของสิ่งมีชีวิต เพื่อให้ประชากรของสิ่งมีชีวิตคงอยู่ต่อไปได้นั้น พบว่าประเด็นสำคัญคือ การสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม อาจส่งผลต่อความอยู่รอดของประชากรของสิ่งมีชีวิต ในการอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทั้งในระยะสั้นและในระยะยาว ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับการกระจายตัว รวมทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมนั้นนับเป็นหัวใจสำคัญ ในกระบวนการวางแผนในการอนุรักษ์สิ่งมีชีวิตท้องถิ่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่กำลังที่ตกอยู่ในสภาวะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Hamrick, 1983; Hamrick and Godt, 1989; Francisco-Ortega *et al*., 2000) การศึกษากระชายกระบี่ซึ่งจัดเป็นพืชเฉพาะถิ่น (endemic species) ที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดกระบี่ที่จัดว่าเป็นแหล่งที่อยู่สำคัญ และอาจเป็นบริเวณที่พบแหล่งเดียวของโลกสำหรับพืชชนิดนี้ พบว่าพืชชนิดนี้ปัจจุบันมีการกระจายตัวเฉพาะพื้นที่ ในบริเวณวนอุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับที่ต่ำ นับว่าจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหาแนวทางอนุรักษ์อย่างเร่งด่วน ก่อนที่ทรัพยากรของชาติชนิดนี้จะสูญพันธุ์ไปจากประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งเสริมการเพิ่มปริมาณพืชชนิดนี้ในธรรมชาติให้มากขึ้น โดยอาจส่งเสริมการเพิ่มจำนวนพืชชนิดนี้ในห้องปฏิบัติการ เรือนเพาะชำ และนำกลับเข้าไปสู่ธรรมชาติ รวมทั้งศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกระบวนการสืบพันธุ์ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ มาใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์ รวมถึงการจัดการให้คงอยู่ในธรรมชาติตลอดไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา และศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร.พวงเพ็ญ ศิริรักษ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. วัลลี สุวจิตตานนท์ ที่ได้กรุณาตรวจสอบและให้คำแนะนำแก้ไขปรับปรุงบทความนี้ให้มีเนื้อหาสมบูรณ์ขึ้น ด้วยความระลึกการจากไปของ Prof. Dr. Kai Larsen ผู้ค้นพบกระชายกระบี่ และผู้บุกเบิกการศึกษาพืชวงศ์ขิงในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานหอพรรณไม้. 2555. *พรรณพฤกษชาติของไทย*. http://web3.dnp.go.th/botany. 1 เมษายน

2555.

Beadmore, J.A. 1983. Extinction, survival and genetic variation. *In:* S.M. Schoenwald-Cox, B. Mc Boyde and L. Thomas (eds.). *Genetics and Conservation*. Benjamin/ Cummings, Menlo Park, CA, USA. pp. 125–151.

Dasuki, S.M., Kamaruzaman, M. and Sulaiman, S.F. 2000. Genetic variation and relation ships among the species of Zingiberaceae by using random amplified polymorphic DNA marker (RAPD-PCR). *Third Regional IMT-GT Uninet Conference*. Universitas Sumatera Utara, Indonesia. p. 52.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11–15.

Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Kim, S.C. and Crawford, D.J. 2000. Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *Am J Bot* 87: 909–919.

Hamrick, JL. and Godt, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plantspecies. *In:* A.H.D Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler and B.S. Weir (eds.). *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*, Sinauer, Sunderland, MA, USA. pp. 43–63.

Hamrick, J.L. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. *In*:S.M. Schoenwald-Cox, B. Mc Boyde and L. Thomas (eds.). *Genetics and Conservation*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, USA. pp. 335–348.

Holttum, R.E. 1950. The Zingiberaceae of the Maley peninsular. *Gard Bull Sing* 13: 1–249.

Larsen, K. 1993. *Boesenbergia tenuispicata* (Zingiberaceae): a new species from Thailand. *Nord J Bot* 13: 281–283.

Larsen, K., Lock, J.M., Maas, H. and Mass, P.J.M. 1998. Zingiberaceae. *In:* K. Knubitzki, (ed.). *The Families and Genera of Vascular Plants*. Vol. IV, Springer, Berlin, Germany. pp. 474–495.

Loveless, M.D. and Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetics structure in plant populations. *Ann Rev Ecol Syst* 15: 65–95.

Mahidol, C., Tuntiwachwuttikul, P., Reutrakul, V. and Taylor, W.C. 1984. Constitutes of *Boesenbergia pandurata* (syn. *Kaempferia pandurata*). III Isolation and synthesis of (+) -boesenbergin B. *Aust J Chem* 37: 1739–1745.

Nei, M. and Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5269–5273.

Norusis, M.J. 1990. SPSS Base System User's Guide. Spss Inc., Chicago.

OEPP (Office of Environment Policy and Planning). 1992. *Thailand Country on Biodiversity*. Ministry of Science Technology and Environment, Bangkok, Thailand.

Prathepha, P. 2000. Screening of random primer to evaluate DNA diversity in Thai *Curcuma* using random amplified polymorphic DNAs. *Songklanakarin J Sci Technol* 22: 7–13.

Rout, G.R., Das, P., Goel, S. and Raina, S.N. 1998. Determination of genetic stability of micropropagatedplants of ginger using random

amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Bot Bull Acad Sin* 39: 23–27.

Saensouk, S. and Larsen, K. 2001. *Boesenbergia baimaii*, a new species of Zingiberaceae from Thailand. *Nord J Bot* 21: 595–597.

Sirirugsa, P. 1992. A revision of genus *Boesenbergia* Kuntze (Zingiberaceae) in Thailand. *Nat His Bull Siam Soc* 40: 67–90.

Sirirugsa, P. 1998. Thai Zingiberaceae: Species diversity and their uses. *Pure Appl Chem* 70: 2111–2118.

Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco, USA.

Trakoontivakorn, G., Nakahara, K., Shinmoto, H., Takenaka, M., Onishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., Nagata, T. and Tsushida, T. 2001. Structural analysis of a novel antimutagenic compound, 4-hydroxy panduratin A, and the antimutagenic activity of flavonoids in a Thai spice, Fingerroot (*Boesenbergia pandurata* Schult.) against mutagenic heterocyclic amines. *J Agr Food Chem* 49: 3046–3050.

Tuchinda, P., Reutrakul, V., Claeson, P., Pongprayoon, U., Sematong, T., Santisuk, T. and Taylor, W.C. 2002. Anti-inflammatory cyclohexenyl chalcone derivatives in *Boesenbergia pandurata*. *Phytochem* 59: 169–173.

Vanijajiva, O., Sirirugsa, P. and Suvachittanont, W. 2005. Confirmation of relationships among *Boesenbergia* (Zingiberaceae) and related genera by RAPD. *Biochem Syst Ecol* 33: 159–170.

Vanijajiva, O. 2011. Genetic variability among durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand detected by RAPD analysis *J Agri Tech* 7: 1105–1114.

Vanijajiva, O. 2012. The application of ISSR markers in genetic variance detection among Durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand. *Proc Eng* 32: 155–159.

Van Valen, L. 1973. A new evolutionary law. *Evol Theor* 1: 1–30.

Vida, G. 1994. Global issues of genetic diversity. *In:* V. Loeschcke, J. Tomiuk and S.K. Jain (eds.) *Conservation Genetics.* Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 9–19.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, V.S. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18: 6531–6535.

Zou, X., Dai, Z., Ding, C., Zhang, L., Zhou, Y. and Yang, R. 2011. Relationships among six medicinal species of *Curcuma* assessed by RAPD markers. *J Med Plants Res* 5: 1349–1354.