

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการจำแนกพืชสกุลขมิ้นโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน *trnS*(UGA) และ *trnfm*(CAU)

Phylogenetic Relationships and Identification of *Curcuma* Using *trnS*(UGA)-*trnfm*(CAU) Intergenic Spacer Region

พัทธมน แสงอินทร์* และปราณี นางงาม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

Pattamon Sangin* and Pranee Nangngam

Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Thapo, Maung, Phitsanulok 65000

บทคัดย่อ

พืชสกุลขมิ้น (*Curcuma*) เป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี มีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีการนำมาใช้ประโยชน์ทั้งด้านสมุนไพร เครื่องเทศ และเครื่องสำอาง ซึ่งพืชในสกุลนี้มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก ทำให้ประสบปัญหาในการจัดจำแนก จึงได้นำเทคนิคการจัดจำแนกในระดับโมเลกุลมาใช้ เพื่อความถูกต้องชัดเจนมากขึ้น ซึ่งการศึกษารั้วนี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีนในคลอโรพลาสต์บริเวณ *trnS*(UGA)-*trnfm*(CAU) จากพืชสกุลขมิ้น 10 ชนิด จำนวน 19 ตัวอย่าง และไม่ทราบชนิด 1 ตัวอย่าง โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 1,008-1,123 คู่เบส จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบจำนวนซ้ำของเบส AT และการแทนที่ของเบสที่แตกต่างกันสามารถใช้ในการจำแนกขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยได้ และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum likelihood พบว่าสามารถจำแนกพืชสกุลขมิ้นเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย *Curcuma* sp., *C. amada*, *C. comosa*, *C. longa* และ *C. mangga* ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *C. aeruginosa*, *C. aromatica*, *C. ecomata*, *C. rubescens*, *C. rubrobracteata* และ *C. zedoaria*

คำสำคัญ : พืชสกุลขมิ้น; คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ; แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Abstract

The genus *Curcuma* is perennial herb which is widely distributed in Thailand especially in the North and Northeast. It has been widely used as medicinal plants, spices and cosmetics. However, the samples identification is quite difficult due to morphological similarity. Recently, the molecular

techniques provide valuable tools for identification and accurate detection. Therefore, in this study, sequences data from non-coding region of chloroplast DNA, *trnS* (UGA)-*trnFM* (CAU), were used to elucidate phylogenetic relationships and identification within 19 samples of 10 species and 1 unknown sample of *Curcuma*. The *trnS* (UGA)-*trnFM* (CAU) region varied in length from 1,008-1,123 bp. DNA sequences alignment represented different numbers of AT repeats and base substitution which can be used discriminate between *C. longa* and *C. zedoaria*. A maximum likelihood analysis was performed on DNA sequences to generate phylogenetic tree which could be divided into two clades. The first clade was *Curcuma* sp., *C. amada*, *C. comosa*, *C. longa* and *C. mangga*. The second clade consisted of *C. aeruginosa*, *C. aromatic*, *C. ecomata*, *C. rubescens*, *C. rubrobracteata* and *C. zedoaria*.

Keywords: *Curcuma*; chloroplast DNA; phylogenetic tree

1. บทนำ

พืชสกุลขมิ้นหรือ *Curcuma* เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี จัดอยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ซึ่งมีสมาชิกอยู่ประมาณ 120 ชนิด เจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นที่มีความชื้นสูง พบกระจายพันธุ์อยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นส่วนใหญ่ ส่วนพืชสกุลขมิ้นบางชนิดสามารถพบที่จีน ออสเตรเลีย และแถบแปซิฟิกตอนใต้ [1] สำหรับในประเทศไทยมีรายงานพบพืชสกุลขมิ้น 38 ชนิด [2] มีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มักพบบริเวณป่าเต็งรัง ป่าเบญจพรรณ ป่าดิบแล้ง และป่าสน เป็นต้น การจัดกลุ่มพืชในสกุลขมิ้นที่พบในประเทศไทย แบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มปทุมมา (*Alismatifolia*) กลุ่มมหาอุตม (*Cochinchinensis*) กลุ่มกระเจียวสุเทพ (*Ecomata*) กลุ่มขมิ้นแท้ (*Eucurcuma*) และกลุ่มบัวขิ้น (*Petiolata*) [3] พืชสกุลขมิ้นเป็นพืชสมุนไพร มีประโยชน์ในการรักษาโรคหลายชนิด เช่น บรรเทาอาการอาหารไม่ย่อย รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ลดการบีบตัวของลำไส้ และมี

สารออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย มีสาร curcuminoid อยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก เป็นสารที่สำคัญในการรักษาโรค และยังใช้เป็นเครื่องเทศ แต่งกลิ่นและสีของอาหาร เครื่องสำอาง บางชนิดมีใบหรือดอกสวยงามสามารถปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับ และจัดเป็นพืชเศรษฐกิจ [4,5]

การจำแนกพืชสกุลขมิ้นโดยใช้ลักษณะฐานวิทยาศาสตร์ เช่น ลักษณะเหง้า สีของเหง้า ตำแหน่งช่อดอก สีและรูปร่างของดอก ยังมีความสับสนอยู่มากและไม่ชัดเจน เนื่องจากเกิดความผันแปรของลักษณะต่าง ๆ ตามสภาพแวดล้อม ทำให้พืชสกุลขมิ้นต่างชนิดกันแต่อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกันมีลักษณะบางประการเหมือนกัน ดังนั้นจึงต้องอาศัยวิธีการอื่นมาช่วยในการจัดจำแนก ซึ่งปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล เช่น การใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาช่วยในการจำแนกพืช และสามารถบอกถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชแต่ละชนิดได้ ซึ่งการใช้นิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์มาจัดจำแนกพืชเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ยินยมนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีข้อได้เปรียบคือ คลอโรพลาสต์มีจีโนมขนาดเล็ก ยืนในคลอโร

พลาสต์เป็นยีนเดี่ยว (single copy gene) คือ ยีนที่พบเพียง 1 ครั้งต่อ 1 จีโนม ซึ่งแตกต่างจากยีนที่พบในนิวเคลียส นอกจากนี้คลอโรพลาสต์ยังมีส่วน non-coding region คือ ลำดับดีเอ็นเอที่ไม่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน ประกอบด้วย 2 บริเวณ คือ intron และ intergenic spacer ทั้ง 2 บริเวณ นี้มีความแปรผันที่สูง (highly variable) มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการจำแนกพืชที่มีลักษณะใกล้เคียงกันในระดับพันธุ์ (variety level) หรือระดับประชากร (population level) [6]

มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและจำแนกพืชสกุลขมิ้น โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ 3 บริเวณ คือ *trnL-trnF* *psbA-trnH* และ *matK* ร่วมกับบริเวณ ITS ในนิวเคลียส ซึ่งสามารถใช้จำแนกพืชในสกุลย่อย *Ecomata* ของพืชสกุลขมิ้น [7] และการจำแนกพืชสกุลขมิ้นที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* และ *trnL-F*) และนิวเคลียส (ITS) พบว่า *matK* สามารถจำแนกชนิดของพืชสกุลขมิ้นได้ดีที่สุด [8] เช่นเดียวกันกับการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnS(UGA)-trnfm(CAU)* ในการจำแนกขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ที่ผลิตสาร curcumin ในปริมาณสูง [9] สอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ขิง 4 สกุล จำนวน 11 ชนิด ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP) พบว่าบริเวณ *trnS(UGA)-trnfm(CAU)* สามารถจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสกุลของพืชวงศ์ขิงได้ดีที่สุด [10] นอกจากนี้การจำแนกพืชสกุลกระชาย (*Boesenbergia*) ในประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ 3 บริเวณ (*matK*, *psbA-trnH* และ *petA-psbI*) พบว่าสามารถจำแนกกระชายได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ในการจำแนกชนิดของพืชสกุลกระชายได้ [11] ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจัดจำแนกชนิดของพืชสกุลขมิ้นและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnS(UGA)-trnfm(CAU)* ในคลอโรพลาสต์

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างพืชสกุลขมิ้น

เก็บตัวอย่างพืชสกุลขมิ้นจากบริเวณภาคเหนือ 10 ชนิด จำนวน 19 ตัวอย่าง ไม่ทราบชนิด 1 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 1 ตัวอย่าง และ *Zingiber montanum* เป็น out group (ตารางที่ 1)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบหรือเหง้ามาล้างเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกหรือสิ่งเจือปนต่าง ๆ ออกจากพืชตัวอย่าง หลังจากนั้นนำพืชตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ซึ่งดัดแปลงจาก Agrawal และคณะ [12] ซึ่งพืชตัวอย่าง 0.1 กรัม นำตัวอย่างมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวและย้ายลงในหลอดที่มี 2x CTAB buffer [CTAB 2 %, Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM, EDTA (pH 8.0) 20 mM, NaCl 1.4 M, 0.6 % β -mercaptoethanol] ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แยกโปรตีนออกจากดีเอ็นเอโดยการเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลิตร และนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ตูดสารละลายใสด้านบนใสหลอดใหม่แล้วเติม absolute ethanol 2/3 เท่าของปริมาตรทั้งหมด และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 % ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว

10,000 rpmเป็นเวลา 10 นาที ตากตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติม RNase A (10 mg/ml) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย

เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm)

ตารางที่ 1 รายชื่อตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	แหล่งที่มา	หมายเลขเฉพาะของลำดับดีเอ็นเอ
1	<i>Curcuma longa</i> L. 1	ขมิ้นชัน	พิษณุโลก	MG591466
2	<i>Curcuma longa</i> L. 2	ขมิ้นชัน	พะเยา	MG591467
3	<i>Curcuma longa</i> L. 3	ขมิ้นชัน	อุดรดิตถ์	MG591468
4	<i>Curcuma longa</i> L. 4	ขมิ้นชัน	น่าน	MG591474
5	<i>Curcuma longa</i> L. 5	ขมิ้นชัน	พิษณุโลก	MG591470
6	<i>Curcuma longa</i> L. 6	ขมิ้นชัน	เพชรบูรณ์	MG591471
7	<i>Curcuma mangga</i> Valetton & Zijp 1	ขมิ้นขาว	พิษณุโลก	MG591473
8	<i>Curcuma mangga</i> Valetton & Zijp 2	ขมิ้นขาว	ลำพูน	MG591474
9	<i>Curcuma aromatica</i> Salisb.	ว่านนางคำ	เพชรบูรณ์	MG591475
10	<i>Curcuma amada</i> Roxb. 1	ว่านรางจืด	เพชรบูรณ์	MG591476
11	<i>Curcuma amada</i> Roxb. 2	ม้าฮ่อเล็ก	พิษณุโลก	MG591477
12	<i>Curcuma aeruginosa</i> Roxb.	ว่านมหาเขม	ตาก	MG591478
13	<i>Curcuma rubrobracteata</i> Skornick, M. Sabu & Prasanthk.	ว่านงูเห่า	ตาก	MG591479
14	<i>Curcuma rubescens</i> Roxb. 1	กระเจียวกาบแดง	พะเยา	MG591480
15	<i>Curcuma rubescens</i> Roxb. 2	กระเจียวกาบแดง	พิษณุโลก	MG591481
16	<i>Curcuma ecomata</i> Craib	กระเจียวสุเทพ	พะเยา	MG591482
17	<i>Curcuma zedoaria</i> (Christm.) Roscoe. 1	ขมิ้นอ้อย	ร้อยเอ็ด	MG591483
18	<i>Curcuma zedoaria</i> (Christm.) Roscoe. 2	ขมิ้นอ้อย	พิษณุโลก	MG591484
19	<i>Curcuma comosa</i> Roxb.	ว่านขั้กมดลูก	พะเยา	MG591485
20	<i>Curcuma</i> sp.		ตาก	MG591472
21	<i>Zingiber montanum</i> (J.Koenig) Link ex A.Dietr.	ไพล	พิษณุโลก	MG591486

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trnS* (UGA)-*trnM*(CAU) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *trnS*(UGA)-*trnM*(CAU) ด้วยเทคนิค พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ *trnS*(UGA) 5'-GAGAGAGAGG GATTCGAACC-3' และ *trnM*(CAU) 5'-CATAACCTT GAGGTCACGGG-3' [13] โดยองค์ประกอบในปฏิกิริยา คือ ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ และไพรเมอร์ *trnS*(UGA) และ *trnM*(CAU) 0.4 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 unit (RBC bioscience) เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ภายใต้สภาวะดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำใน ขั้นที่ 2 จำนวน 35 รอบ ขั้นตอนสุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตของ เทคนิคพีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

2.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการ วิเคราะห์ผล

เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามที่ต้องการแล้ว ทำ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสำเร็จรูปของ Thermo scientific และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอ ไทด์บริเวณ *trnS*(UGA)-*trnM*(CAU) ของแต่ละ ตัวอย่างมาเปรียบเทียบ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอ ไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ด้วย

โปรแกรม BLAST นำผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอ ไทด์มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 (molecular evolutionary genetics analysis) [14] ด้วยวิธี maximum likelihood แล้วเก็บข้อมูลลำดับ ดีเอ็นเอดังกล่าวไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยมีหมายเลข ลำดับดีเอ็นเอเฉพาะ (accession number) ดังตาราง ที่ 1

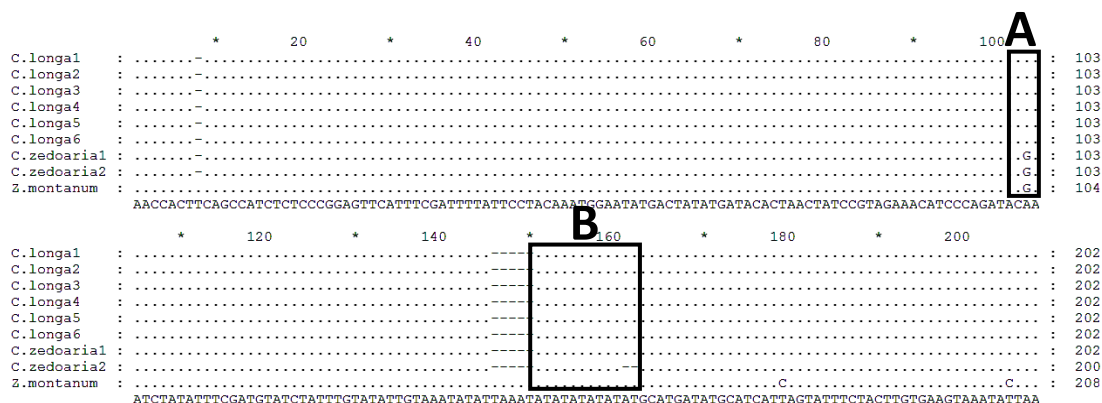
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *trnS*(UGA)-*trnM*(CAU) พบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ประมาณ 1,000 คู่เบส มีขนาดที่แตกต่างกับพืชสกุล อื่นในวงศ์ขิง [10] ซึ่งพืชจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ บริเวณ *trnS*(UGA)-*trnM*(CAU) ระหว่าง 800-1,800 คู่เบส [15] และผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มีขนาดอยู่ระหว่าง 997 (*C. rubescens* 2) ถึง 1,004 (*C. longa* 4) คู่เบส นำข้อมูลไปเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยใช้ โปรแกรม BLAST ซึ่งพบว่าตรงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอ ไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnS*(UGA)-*trnM*(CAU) ของ พืชสกุลขมิ้นและพืชชนิดอื่น และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้ง 20 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบ (alignment) โดยใช้ โปรแกรม ClustalW ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ จากการเปรียบเทียบเท่ากับ 1,070 คู่เบส มีค่าการ แทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน (transition, Tv) คือ การแทนที่เบสพิวรีนด้วยเบสพิวรีน และการแทนที่เบส ไพริมิดีนด้วยเบสไพริมิดีนเท่ากับ 4.134 และมีการ แทนที่ระหว่างเบสต่างกลุ่ม (transversion, Ts) คือ การแทนที่เบสพิวรีนด้วยเบสไพริมิดีนและการแทนที่ เบสไพริมิดีนด้วยเบสพิวรีนเท่ากับ 2.457 และ อัตราส่วน Ts/Tv เท่ากับ 1.413 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่มีความผันแปร (variation characters) 35 ตำแหน่ง

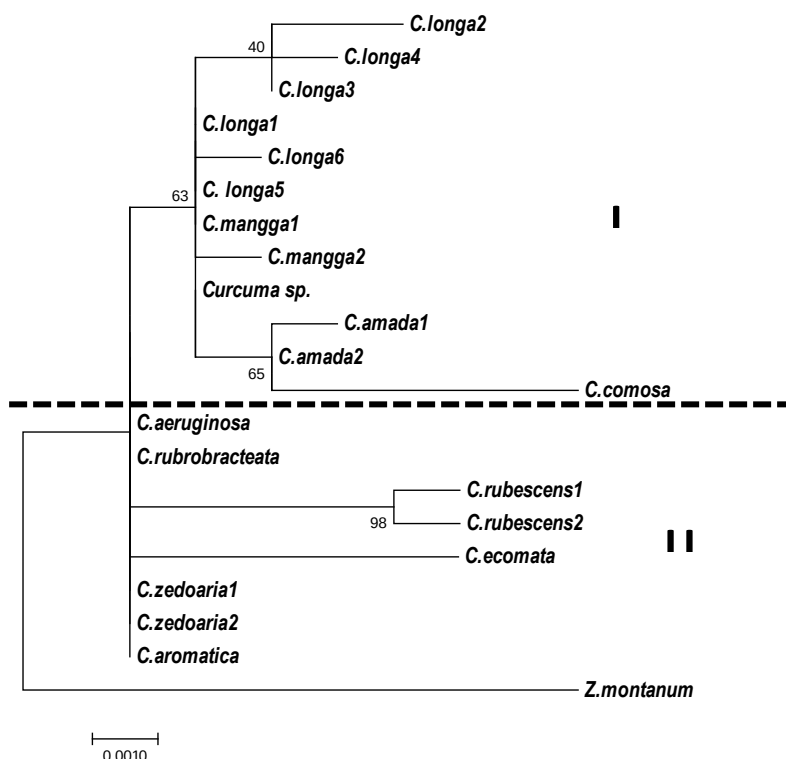
ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลในการวิเคราะห์ (information characters) 8 ตำแหน่ง เพราะบริเวณระหว่างยีน *trnS(UGA)-trnfM(CAU)* ประกอบด้วยยีน *lhbA* และ *trnG(UCC)* จึงให้ข้อมูลในการวิเคราะห์ค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตาม บริเวณระหว่างยีน *trnS(UGA)-trnfM(CAU)* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ คือ AT ตั้งแต่ 2-9 ซ้ำ สามารถใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชได้ ซึ่งขมิ้นชัน (*C. longa*) 6 ตัวอย่าง ที่มาจากแหล่งต่างกันพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 103 คือ A และตำแหน่ง 151-162 มีจำนวนซ้ำของเบส AT ทั้งหมด 6 ซ้ำ ($(A-AT)_6$) จำนวนซ้ำของเบส AT ในขมิ้นชันจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิด ซึ่งขมิ้นชันแถบเอเชียตะวันออก (ญี่ปุ่นและไต้หวัน) พบเบส AT 9 ซ้ำ ในขณะที่ขมิ้นชันแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (เวียดนามและอินโดนีเซีย) พบเบส AT 6-7 ซ้ำ [16] ในขณะที่ขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria*) พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 103 คือ G และมีความแตกต่างของจำนวนซ้ำของเบส AT จากขมิ้นอ้อยจังหวัดร้อยเอ็ดพบเบส AT 6 ซ้ำ แต่ขมิ้นอ้อยจากจังหวัดพิษณุโลกพบเบส

AT 5 ซ้ำ (รูปที่ 1) จะเห็นได้ว่าขมิ้นอ้อยในประเทศไทยมีจำนวนซ้ำของเบส AT 5-6 ซ้ำ แตกต่างจากงานวิจัยที่ศึกษาความสัมพันธ์ของการผลิตสาร curcumin และจำนวนซ้ำของเบส AT บริเวณระหว่างยีน *trnS(UGA)-trnfM(CAU)* ของพืชสกุลขมิ้น 4 ชนิด พบว่าขมิ้นอ้อยจากประเทศไทยมีจำนวนซ้ำของเบส AT 6 ซ้ำ ในขณะที่ขมิ้นอ้อยจากประเทศญี่ปุ่นจำนวนเบส AT 5 ซ้ำ อาจเป็นเพราะตัวอย่างที่ใช้มีแค่เพียงตัวอย่างเดียวจากประเทศไทย [15] ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnS(UGA)-trnfM(CAU)* สามารถใช้ในการจำแนกขมิ้นชันกับขมิ้นอ้อยได้ ขมิ้นทั้ง 2 ชนิด นี้มีลักษณะของเหง้าที่คล้ายคลึงกันแต่สรรพคุณในการนำมาใช้เป็นสมุนไพรแตกต่างกัน [17]

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (รูปที่ 2) วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood ที่ค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 ซ้ำ พบว่า *Zingiber montanum* (outgroup) ไม่สามารถแยกออกจากกลุ่มพืชสกุลขมิ้นอย่างชัดเจน เช่นเดียวกับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในวงศ์ Zingiberaceae ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์จากนิวเคลียส



รูปที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnS(UGA)-trnfM(CAU)* บางส่วนจากขมิ้นชัน (*C. longa*) และขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria*) โดยมี *Z. mantanum* เป็น outgroup (A) ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 103 ในขมิ้นชัน คือ A ส่วนขมิ้นอ้อย คือ G (B) ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 151-162 ที่มีชุดซ้ำของเบส AT ที่แตกต่างกันระหว่างขมิ้นชัน (6 ซ้ำ) และขมิ้นอ้อย (5-6 ซ้ำ)



รูปที่ 2 dendrogram ของพืชสกุล *Curcuma* 20 ตัวอย่าง โดยมี *Z. montanum* เป็น outgroup วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood ที่ค่า bootstrap 1,000

บริเวณ ITS และยีน *matK* ในคลอโรพลาสต์ ไม่สามารถแยกพืชสกุลขมิ้นออกจากสกุลอื่น แสดงให้เห็นว่าพืชสกุลขมิ้นจัดเป็นกลุ่ม paraphyletic เนื่องจากพืชกลุ่มนี้มีการผสมข้ามชนิดทำให้จำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้น [18] แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบ่งพืชสกุลขมิ้นออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรกประกอบด้วย *C. amada* 1, *C. amada* 2, *C. comosa*, *C. longa* 1-6, *C. mangga* 1, *C. mangga* 2 ซึ่งส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มขมิ้นแท้ (*Eucurcuma*) และ *Curcuma* sp. ภายในกลุ่มนี้ยังพบว่า *C. longa* 2 (พะเยา) *C. longa* 3 (อุตรดิตถ์) และ *C. longa* 4 (น่าน) มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันและจัดอยู่ในกลุ่มย่อยกลุ่มเดียวกัน เพราะมาจากแหล่งพื้นที่ใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับกับ *C. amada* 1 (พืชในท้องถิ่น) *C. amada*

2 (เพชรบูรณ์) และ *C. comosa* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และมีจำนวนโครโมโซมที่เท่ากัน คือ $2n = 42$ [19,20] ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *C. aeruginosa*, *C. aromatica*, *C. ecomata*, *C. rubescens* 1, *C. rubescens* 2, *C. rubrobracteata*, *C. zedoaria* 1 และ *C. zedoaria* 2 ซึ่งไม่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มย่อย โดย *C. aromatica*, *C. aeruginosa*, *C. rubescens* และ *C. zedoaria* จัดอยู่ในกลุ่มขมิ้นแท้ ในขณะที่ *C. rubrobracteata* จัดอยู่ในกลุ่มบัวขมิ้น (*Petiolata*) ส่วน *C. ecomata* อยู่ในกลุ่มกระเจียวสุเทพ (*Ecomata*) อย่างไรก็ตาม พืชสกุลขมิ้นเหล่านี้มีจำนวนโครโมโซมมากกว่า 2 ชุด (polyploidy) เหมือนกัน [21] จากการจัดกลุ่มพบว่าขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยจัดอยู่ในคนละกลุ่ม สอดคล้องกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์

ทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคแฮดอาร์เอพีดีจากขมิ้นชัน 6 ชนิด จำนวน 10 ตัวอย่างพบว่าขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยจัดอยู่คนละกลุ่ม [22] แต่แตกต่างจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้เครื่องหมาย RAPD และ ISSR พบว่าขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน [23] แสดงให้เห็นว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnS(UGA)-trnFM(CAU)* สามารถจำแนกพืชสกุลขมิ้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน

4. สรุปผลการทดลอง

การจัดจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnS(UGA)-trnFM(CAU)* ของพืชสกุลขมิ้น สามารถจำแนกพืชสกุลขมิ้น 10 ชนิด จำนวน 19 ตัวอย่าง และไม่ทราบชนิด 1 ตัวอย่าง และแบ่ง เป็น 2 กลุ่ม จากผลการศึกษาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnS(UGA)-trnFM(CAU)* มีจำนวนซ้ำของเบส AT แตกต่างกันได้ สามารถใช้ในการจำแนกขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยเพื่อแก้ปัญหาการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขมิ้นชัน ซึ่งมักจะมีการปนเปื้อนจากขมิ้นอ้อยเพราะเหง้าของพืชทั้งสองชนิดมีความคล้ายกันมาก อย่างไรก็ตาม การระบุชนิดของพืชสกุลขมิ้นควรเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นในคลอโรพลาสต์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อให้สามารถแยกความแตกต่างของพืชสกุลขมิ้นได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายได้ กองบริหารการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร (R2558C149) ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยพันธุศาสตร์และชีววิทยาโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่วิจัย

6. รายการอ้างอิง

- [1] Skornickova, J., Sida, O., Jarolimova, V., Sabu, M., Fer, T., Travnicek, P. and Suda, J., 2007, Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae), *Ann. Bot.* 100: 505-526.
- [2] Sirirugsa, P., Larsen, K and Maknoi, C., 2007, The genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae): Distribution and classification with reference to species diversity in Thailand, *Gardens' Bull. Singapore* 59: 203-220.
- [3] จรรย์ มากน้อย และพวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2555, พืชสกุลขมิ้นในประเทศไทย, องค์การสวนพฤกษศาสตร์ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, เชียงใหม่, 160 น.
- [4] Singh, S., 2007, From exotic species to modern drug, *Cell* 130: 765-768.
- [5] Chen, J. and Xia, N.H., 2011, Pollen morphology of Chinese *Curcuma* L. and *Boesenbergia* Kuntz (Zingiberaceae): Taxonomic implications, *Flora* 206: 458-467.
- [6] Shaw, J., Lickey, E. and Schilling, E., 2007, Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III, *Am. J. Bot.* 94: 275-88.
- [7] Závěská, E., Fer, T., Sida, O., Karol, K., Marhold, K. and Skornickova, J.L., 2012,

- Phylogeny of *Curcuma* (Zingiberaceae) based on plastid and nuclear sequences: Proposal of the new subgenus *Ecomata*, Taxon 61: 747-763.
- [8] Chen, J., Zhao, J., Erickson, D.L., Xia, N., and Kress, W.J., 2015, Testing DNA barcodes in closely related species of *Curcuma* (Zingiberaceae) from Myanmar and China, Mol. Ecol. Resour. 15: 337-348.
- [9] Hayakawa, H., Kabayashi, T., Minaniya, Y., Ito, K., Miyazaki, A. and Fukuda, T., 2011, Development of a molecular marker to identified a candidate line of Turmeric (*Curcuma longa* L.) with a high curcumin content, Am. J. Bot. 2: 15-26.
- [10] Ahmad, D., Kikuchi, A., Jatoi, S.A., Mimura, M. and Watanabe, K.N., 2009, Genetic variation of chloroplast DNA in Zingiberaceae taxa from Myanmar assessed by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, Ann. Appl. Biol. 155: 91-101.
- [11] Techaprasan, J., Ngamriabsakul, C., Klinbunga, S., Chusacultachai, S. and Jenjittikul, T., 2006, Genetic variation and species identification of Thai Boesenber gia (Zingiberaceae) analyzed by chloroplast DNA polymorphism, J. Biochem. Mo. Biol. 39: 361-370.
- [12] Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P., 1992, Isolate of DNA from *Cheorospondias asillaris* leaves, Biotech. Biodiv. 2: 19-24.
- [13] Demesure, B., Sodzi, N. and Petit, R.J., 1995, A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of microchondrial and chloroplast DNA in plants, Mol. Ecol. 4: 129-131.
- [14] Kumar, S. Stecher, G. and Tamura, K., 2016, MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, Mol. Biol. Evol. 33: 1870-1874.
- [15] Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E. and Small, R.L., 2005, The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis, Am. J. Bot. 92: 142-166.
- [16] Minami, M., Nishio, K., Ajioka, Y. Kyushima, H., Shigeki, K., Kinjo, K. Yamada, K., Nagai, M., Satoh, K. and Sakurai, Y., 2009, Identification of *Curcuma* plants and curcumin content level by DNA polymorphisms in the *trnS-trnfM* intergenic spacer in chloroplast DNA, J. Nat. Med. 63: 75-79.
- [17] Tohda, C., Nakayama, N., Hatanaka, F. and Komatsu, K., 2006, Comparison of anti-inflammatory activities of six curcuma rhizomes: A possible curcuminoid-independent pathway mediated by *Curcuma phaeocaulis* extract, Evid Based Complement Alternat Med. 3: 255-260.
- [18] Kress, W.J. Prince, L.M. and Williams, K.J., 2002, The phylogeny and a new classify

- cation of the gingers (Zingiberaceae) evidence from molecular data, *Am. J. Bot.* 89: 1682-1696.
- [19] Bhadra, S. and Bondvopadhvav, M., 2015, Karyomorphological investigations on some economically important members of Zingiberaceae from Eastern India, *Caryologia* 68: 184-192.
- [20] Joseph, R. Joseph, T. and Joseph, J., 1999, Karyomorphological studies in the genus *Curcuma* Linn., *Cytologia* 64: 313-317.
- [21] Chen, J. and Xia, N., 2013, Chromosome numbers and ploidy levels of Chinese *Curcuma* species, *Hort. Sci.* 48: 525-530.
- [22] วริสรา แทนสง่า, ชีระชัย ธนानันต์, บุญหงษ์ จงคิด และนฤมล ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคแอสอาร์เอฟดี, *Thai J. Sci. Technol.* 3(1): 29-35.
- [23] Theanphong, O. Thanakijcharoenpath, W., Palanuvej, C., Ruangrungsri, N. and Rungsihirunrat, K., 2016, RAPD marker for determination of phylogenetic relationship of 15 *Curcuma* species from Thailand, *BHST* 14: 45-56.