งานวิจัย

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ สัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยาเพื่อการระบุชนิดพืช สกุล *Curcuma* L. (ZINGIBERACEAE)
(Morphology and molecular biology for identification of *Curcuma* L. (ZINGIBERACEAE))

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 05 มี.ค. 2564
เลขทะเบียน 1034665
เลขเรียกหนังสือ 2 QK
ว114
ป4ง2
2562

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปราณี นางงาม
ดร. พัทธมน แสงอินทร์

10 กรกฎาคม 2562

สัญญาเลขที่ R2558C149

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ สัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยาเพื่อการระบุชนิดพืชสกุล *Curcuma* L. (ZINGIBERACEAE)

Morphology and molecular biology for identification of *Curcuma* L. (ZINGIBERACEAE)

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปราณี นางงาม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. ดร. พัทธมน แสงอินทร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดย
งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ 2558

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ	ก
บทสรุป	ค
Executive summary	ง
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	จ
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
สัณฐานวิทยาของพืชสกุลขมิ้น	3
การศึกษาทางอณูชีววิทยาของพืชสกุลขมิ้น	6
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	8
บทที่ 4 ผลการวิจัย	19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	94
เอกสารอ้างอิง	100
ภาคผนวก ก ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการและผลที่ได้รับ	103
ภาคผนวก ข ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่	106

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
3.1	รายชื่อตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิจัย	10
3.2	ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในงานวิจัย	15
3.3	ความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาของไพรเมอร์ *trn*fM *(CAU)-trn*S (UGA)	16
3.4	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *trn*fM (CAU)-*trn*S (UGA)	16
3.5	ความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาของไพรเมอร์ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA)	16
3.6	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA)	17
4.1	แสดงอัตราการเกิด transition (Ts) และ transversion (Tv) จากการใช้ไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU)	83
4.2	แสดงองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU)	84
4.3	แสดงอัตราการเกิด transition (Ts) และ transversion (Tv) จากการใช้ไพรเมอร์ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA)	89
4.4	แสดงองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trnL* (UAA)-*trnF* (GAA)	89
5.1	การจัดกลุ่มของพืชสกุลขมิ้น	94

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
3.1	อุปกรณ์การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	8
3.2	ตัวอย่างพรรณไม้แห้ง	9
4.1	รูปร่างดอก (lower form) ของพืชสกุลขมิ้น	20
4.2	ส่วนประกอบของพืชสกุลขมิ้น	21
4.3	ลักษณะอับเรณูของกลุ่มปทุมมา (Alismatifolia)	22
4.4	ลักษณะอับเรณูของกลุ่มมหาอุดม (Cochinchinesis)	23
4.5	ลักษณะอับเรณูของกลุ่มกระเจียวสุเทพ (Ecomata)	23
4.6	ลักษณะอับเรณูของกลุ่มขมิ้นแท้ (Eucurcuma) (	24
4.7	ลักษณะอับเรณูของบัวชั้น (Petiolata)	25
4.8	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma aeruginosa* Roxb.	28
4.9	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma alismatifolia* Gagnep.	30
4.10	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma amada* Roxb.	32
4.11	รูปวาดการเจริญของช่อดอกแบบเจริญจากเหง้าของ *Curcuma angustifolia* Roxb.	33
4.12	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma aurantiaca* Zijp	35
4.13	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma bicolor* Mood & K. Larsen	37
4.14	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep.	39
4.15	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep.	40
4.16	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma comosa* Roxb.	42
4.17	ลักษณะใบและไรโซม *Curcuma comosa* Roxb.	44
4.18	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma ecomata* Craib	45
4.19	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma flaviflora* S.Q.Tong	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.20	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma glans* K. Larsen & Mood	49
4.21	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma gracillima* Gagnep.	51
4.22	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma harmandii* Gagnep.	53
4.23	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma longa* L.	55
4.24	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma parviflora* Wall.	57
4.25	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma petiolata* Roxb.	59
4.26	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma plicata* Wall.	61
4.27	ลักษณะใบ *Curcuma plicata* Wall.	62
4.28	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma plicata* Wall.	63
4.29	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma roscoeana* Wall.	65
4.30	ลักษณะใบ *Curcuma roscoeana* Wall.	66
4.31	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma rubescens* Roxb.	68
4.32	ลักษณะใบ *Curcuma rubescens* Roxb.	69
4.33	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma rubrobracteata* Škorničk., M.Sabu & Prasanthk.	71
4.34	ลักษณะใบ *Curcuma rubrobracteata* Škorničk., M.Sabu & Prasanthk.	72
4.35	รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe	74
4.36	ลักษณะใบ *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe	75
4.37	ขนาดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชสกุลขมิ้น โดยหมายเลขที่ 1-11	76
4.38	ขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.39	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่เกิดการจับกันของไพรเมอร์แบบไม่เฉพาะเจาะจง	79
4.40	ขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ *trn*L (UAA)- *trn*F (GAA)	80
4.41	ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ของไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU)	81
4.42	ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ของไพรเมอร์ *trn*L (UAA)- *trn*F (GAA)	81
4.43	Phylogenetic tree โดยวิธี Maximum parsimony จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) โดยใช้ *Zingiber ottensii* Valeton (ไพลดำ) เป็น out group	86
4.44	Phylogenetic tree โดยวิธี Maximum Likelihood จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) โดยใช้ *Zingiber ottensii* Valeton (ไพลดำ) เป็น out group	87
4.45	Phylogenetic tree โดยวิธี Maximum parsimony จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) โดยใช้ *Zingiber ottensii* Valeton (ไพลดำ) เป็น out group	91
4.46	Phylogenetic tree โดยวิธี Maximum Likelihood จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) โดยใช้ *Zingiber ottensii* Valeton (ไพลดำ) เป็น out group	92
5.1	ลักษณะอับเรณูของ *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep.	97
5.2	อับเรณูของ *Curcuma plicata* Wall. (complex)	98

บทสรุป

พืชสกุลขมิ้นเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ขิง-ข่า (Zingiberaceae) มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจและเภสัชกรรม นำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย แต่การจำแนกชนิดของพืชสกุลขมิ้นนั้นยังมีความสับสน เพราะมีหลายลักษณะที่คล้ายคลึงกัน ทำให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนก ดังนั้นการศึกษาจึงได้ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลขมิ้นจากตัวอย่างพรรณไม้แห้งและตัวอย่างสด จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาตัวอย่างพรรณไม้จำนวน 85 ตัวอย่างสามารถ จำแนกได้ 21 ชนิด พบว่าลักษณะของอับเรณูมีความแตกต่างกัน ทำให้สามารถแบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มปทุมมา (Alismatifolia) พบ 4 ชนิด ได้แก่ *Curcuma alismatifolia* Gagnep., *Curcuma gracillima* Gagnep., *Curcuma harmandii* Gagnep. และ *Curcuma parviflora* Wall. 2) กลุ่มมหาอุดม (Cochinchinesis) พบ 1 ชนิด ได้แก่ *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep. 3) กลุ่มกระเจียวสุเทพ (Ecomata) พบ 4 ชนิด ได้แก่ *Curcuma bicolor* Mood & K. Larsen, *Curcuma ecomata* Craib, *Curcuma flaviflora* S.Q. Tong และ *Curcuma glans* K. Larsen & Mood 4) กลุ่มขมิ้นแท้ (Eucurcuma) พบ 8 ชนิด ได้แก่ *Curcuma aeruginosa* Roxb., *Curcuma amada* Roxb., *Curcuma angustifolia* Roxb., *Curcuma comosa* Roxb., *Curcuma longa* L., *Curcuma rubescens* Roxb., *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe และ *Curcuma plicata* Wall. 5) กลุ่มบัวชั้น (Petiolata) พบ 4 ชนิด ได้แก่ *Curcuma aurantiaca* Zijp, *Curcuma petiolata* Roxb., *Curcuma roscoeana* Wall. และ *Curcuma rubrobracteata* Škorničk., M. Sabu & Prasanthk.โดยจำนวนชนิดที่ศึกษาครั้งนี้คิดเป็น 55.26 เปอร์เซ็นต์ของพืชสกุลกระเจียวที่พบทั้งหมดที่เคยรายงานในประเทศไทย คือประมาณ 38 ชนิด ซึ่งมีความจำเป็นต้องศึกษาให้ครบเพื่อความถูกต้องในการระบุชนิดรวบทั้งการศึกษาสัณฐานวิทยาของส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้างสืบพันธุ์ด้วย

พืชสกุลขมิ้น (*Curcuma*) เป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี มีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทยโดยเฉพาะภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พืชในสกุลนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมากจึงทำให้ประสบปัญหาในการจำแนก ดังนั้นจึงนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยเพื่อให้การจำแนกมีความถูกต้องชัดเจนมากขึ้น ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้ส่วนที่อยู่ระหว่างยีนในคลอโรพลาสต์ 2 บริเวณคือ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) และ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) จากพืชสกุลขมิ้น 34 ตัวอย่าง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณได้มีความยาว 1,008-1,123 คู่เบส และ 914-1,017 คู่เบส ตามลำดับ และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum parsimony และ Maximum likelihood พบว่าบริเวณ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) สามารถจำแนกพืชสกุลขมิ้นได้ดีกว่าบริเวณ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) แต่อย่างไรก็ตามทั้ง 2 บริเวณนี้ให้ผลที่สอดคล้องกันคือ *Curcuma* sp. (2189) กับ *Curcuma aromatic* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน

Executive summary

The genus *Curcuma* L. is the member of Zingiberaceae. It is important for economic, pharmaceutical, traditional medicine, ornamental and other purpose. *Curcuma* L. has morphology confusion and missed identification by botanist. The objectives of this study to solved taxonomic problem of *Curcuma* L. by herbarium specimens examination. The herbarium departments are from CMUB herbarium and speciemens of Biology, Faculty of Science, Naresuan University. 21 species were indentified and classified using anther characters can be separated into 5 groups including 1) Alismatifolia group with 4 species are *Curcuma alismatifolia* Gagnep., *Curcuma gracillima* Gagnep., *Curcuma harmandii* Gagnep. and *Curcuma parviflora* Wall. 2) Cochichinesis group with 1 specie is *Curcuma* aff. *Cochinchinensis* Gagnep. 3) Ecomata group with 4 species are *Curcuma bicolor* Mood & K. Larsen, *Curcuma ecomata* Craib, *Curcuma flaviflora* S.Q. Tong and *Curcuma glans* K. Larsen & Mood 4) Eucurcuma group with 8 species are *Curcuma aeruginosa* Roxb., *Curcuma amada* Roxb., *Curcuma angustifolia* Roxb., *Curcuma comosa* Roxb., *Curcuma longa* L., *Curcuma rubescens* Roxb., *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe and *Curcuma plicata* Wall. 5) Petiolata group with 4 species are *Curcuma aurantiaca* Zijp, *Curcuma petiolata* Roxb., *Curcuma roscoeana* Wall. and *Curcuma rubrobracteata* Škorničk., M. Sabu & Prasanthk. All specimens were studied occurs in northern Thailand and one specimen from Combodia. However, the result can solved the problem only 55.26% of 38 species were recorded in Thailand. Further study is needed.

บทคัดย่อ

พืชสกุลขมิ้นเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ขิง-ข่า (Zingiberaceae) มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจและเภสัชกรรม นำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย แต่การจำแนกชนิดของพืชสกุลขมิ้นนั้นยังมีความสับสน เพราะมีหลายลักษณะที่คล้ายคลึงกัน ทำให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนก ดังนั้นการศึกษาจึงได้ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลขมิ้นจากตัวอย่างพรรณไม้แห้งและตัวอย่างสด จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาตัวอย่างพรรณไม้จำนวน 85 ตัวอย่างสามารถ จำแนกได้ 21 ชนิด พบว่าลักษณะของอับเรณูมีความแตกต่างกัน ทำให้สามารถแบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มปทุมมา (Alismatifolia) พบ 4 ชนิด ได้แก่ *Curcuma alismatifolia* Gagnep., *Curcuma gracillima* Gagnep., *Curcuma harmandii* Gagnep. และ *Curcuma parviflora* Wall. 2) กลุ่มมหาอุดม (Cochinchinesis) พบ 1 ชนิด ได้แก่ *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep. 3) กลุ่มกระเจียวสุเทพ (Ecomata) พบ 4 ชนิด ได้แก่ *Curcuma bicolor* Mood & K. Larsen, *Curcuma ecomata* Craib, *Curcuma flaviflora* S.Q. Tong และ *Curcuma glans* K. Larsen & Mood 4) กลุ่มขมิ้นแท้ (Eucurcuma) พบ 8 ชนิด ได้แก่ *Curcuma aeruginosa* Roxb., *Curcuma amada* Roxb., *Curcuma angustifolia* Roxb., *Curcuma comosa* Roxb., *Curcuma longa* L., *Curcuma rubescens* Roxb., *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe และ *Curcuma plicata* Wall. 5) กลุ่มบัวชั้น (Petiolata) พบ 4 ชนิด ได้แก่ *Curcuma aurantiaca* Zijp, *Curcuma petiolata* Roxb., *Curcuma roscoeana* Wall. และ *Curcuma rubrobracteata* Škornič k., M. Sabu & Prasanthk.โดยจำนวนชนิดที่ศึกษาครั้งนี้คิดเป็น 55.26 เปอร์เซ็นต์ของพืชสกุลกระเจียวที่พบทั้งหมดที่เคยรายงานในประเทศไทย คือประมาณ 38 ชนิด ซึ่งมีความจำเป็นต้องศึกษาให้ครบเพื่อความถูกต้องในการระบุชนิดรวบทั้งการศึกษาสัณฐานวิทยาของส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้างสืบพันธุ์ด้วย

พืชสกุลขมิ้น (*Curcuma*) เป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี มีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทยโดยเฉพาะภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พืชในสกุลนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมากจึงทำให้ประสบปัญหาในการจำแนก ดังนั้นจึงนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยเพื่อให้การจำแนกมีความถูกต้องชัดเจนมากขึ้น ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้ส่วนที่อยู่ระหว่างยีนในคลอโรพลาสต์ 2 บริเวณคือ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) และ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) จากพืชสกุลขมิ้น 34 ตัวอย่าง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณได้มีความยาว 1,008-1,123 คู่เบส และ 914-1,017 คู่เบส ตามลำดับ และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum parsimony และ Maximum likelihood พบว่าบริเวณ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) สามารถจำแนกพืชสกุลขมิ้นได้ดีกว่าบริเวณ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) แต่อย่างไรก็ตามทั้ง 2 บริเวณนี้ให้ผลที่สอดคล้องกันคือ *Curcuma* sp. (2189) กับ *Curcuma aromatic* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน

Abstract

The genus *Curcuma* L. is the member of Zingiberaceae. It is important for economic, pharmaceutical, traditional medicine, ornamental and other purpose. *Curcuma* L. has morphology confusion and missed identification by botanist. The objectives of this study to solved taxonomic problem of *Curcuma* L. by herbarium specimens examination. The herbarium departments are from CMUB herbarium and speciemens of Biology, Faculty of Science, Naresuan University. 21 species were indentified and classified using anther characters can be separated into 5 groups including 1) Alismatifolia group with 4 species are *Curcuma alismatifolia* Gagnep., *Curcuma gracillima* Gagnep., *Curcuma harmandii* Gagnep. and *Curcuma parviflora* Wall 2) Cochichinesis group with 1 specie is *Curcuma* aff. *Cochinchinensis* Gagnep. 3) Ecomata group with 4 species are *Curcuma bicolor* Mood & K. Larsen, *Curcuma ecomata* Craib, *Curcuma flaviflora* S.Q. Tong and *Curcuma glans* K. Larsen & Mood 4) Eucurcuma group with 8 species are *Curcuma aeruginosa* Roxb., *Curcuma amada* Roxb., *Curcuma angustifolia* Roxb., *Curcuma comosa* Roxb., *Curcuma longa* L., *Curcuma rubescens* Roxb., *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe and *Curcuma plicata* Wall. 5) Petiolata group with 4 species are *Curcuma aurantiaca* Zijp, *Curcuma petiolata* Roxb., *Curcuma roscoeana* Wall. and *Curcuma rubrobracteata* Škorničk., M. Sabu & Prasanthk. All specimens were studied occurs in northern Thailand and one specimen from Combodia. However, the result can solved the problem only 55.26% of 38 species were recorded in Thailand. Further study is needed.

The genus *Curcuma* is perennial herb which is wildly distributed in Thailand especially in the North and Northeast. Identification has been difficult due to morphological similarity. Recently, molecular techniques provide valuable tools for identification and accurate detection. Therefore, sequences data from the two non-coding regions of chloroplast DNA, *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) and *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA), were used to elucidate phylogenetic relationships and identification within 34 samples of *Curcuma*. The *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) region varied in length from 1,008-1,123 bp and *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) was 914-1,017 bp. Maximum Parsimony and Maximum likelihood analyses were performed on separate data sets to generate phylogenetic trees. The results indicated that *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) sequences were more informative than *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) in helping resolve classification in *Curcuma*. However, in both regions showed that *Curcuma* sp. (2189) was closely related to *Curcuma aromatic*.

บทที่ 1
บทนำ

สกุล *Curcuma* หรือสกุลขมิ้น อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae หรือ Ginger family หรือวงศ์ขิงข่า เป็นกลุ่มพืชดอกที่มีลักษณะเฉพาะตัวที่มีน้ำมันหอมระเหย กลิ่นหอม แต่ละชนิดก็มีสารเคมีที่แตกต่างกัน อยู่ในความสนใจของนักวิจัยตลอดมา ทุกชนิดในวงศ์นี้เป็นพืชล้มลุกอายุมากกว่า 1 ปี (perennial herb) มีเหง้าหรือลำต้นใต้ดิน (rhizome) ที่ทอดขนานไปกับพื้นดิน วงศ์ขิงนี้ทั่วโลกมีอยู่ประมาณ 53 สกุล 1200 ชนิด (Kress *et al.*, 2002) ส่วนสกุล *Curcuma* หรือขมิ้นมีอยู่ประมาณ 120 ชนิด (Sabu, 2006) ในประเทศไทย มีรายงานพบ 38 ชนิด (จรัญ มากน้อย และ พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2555) พบกระจายทั่วไปในเขตร้อน และกึ่งร้อนในแถบเอเชีย นิยมนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพรและปรุงอาหาร รวมถึงใช้เป็นเครื่องสำอาง แต่การนำมาใช้มีความจำเป็นต้องทราบชื่อที่ถูกต้อง ซึ่งยังเป็นปัญหาสำหรับบุคคลทั่วไปที่ไม่ใช่นักอนุกรมวิธาน แม้แต่นักอนุกรมวิธานก็มีความยากที่จะระบุชนิด (scientific name) ด้วยเช่นกัน เพราะสกุลขมิ้นมีวงชีวิตที่ออกดอกและผลให้เห็นเพียงเวลาสั้นๆ หลังฤดูฝนเท่านั้น หลังจากนั้นทั้งดอกและใบจะโทรมลง หรือบางชนิดออกดอกแต่ใบยังไม่ออก แต่เมื่อดอกโทรมลงจะมีใบงอกออกมาทีหลัง แต่เหง้า (rhizome) ใต้ดินยังคงมีชีวิตและเป็นส่วนที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ ทำให้ยากต่อการระบุชนิดว่าเหง้าที่นำมาใช้นั้นคือชนิดอะไร โครงสร้างหลายส่วน เช่น ดอก สีดอก ขนาดเหง้า สีภายในของเหง้า มีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน โดยที่ยังไม่ทราบว่าความผันแปรของรูปร่างต่างๆ ที่ปรากฏนั้น เกิดจากอายุของพืชที่แตกต่างกัน หรือนิเวศที่พืชขึ้นอยู่ ดังนั้น การศึกษาทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับอณูชีววิทยาครั้งนี้จะเป็นการศึกษาที่มีความแม่นยำในการระบุชนิดมากยิ่งขึ้น จะทำให้การนำพืชไปใช้ประโยชน์ต่อได้อย่างถูกต้องต่อไป อีกทั้งนี้ การศึกษาทางอนุกรมวิธานของโครงการพรรณพฤกษชาติแห่งประเทศไทยของสำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ยังอยู่ระหว่างการดำเนินการ จึงต้องการผู้รวบรวมข้อมูลเพื่อสนับสนุนโครงการให้สมบูรณ์ด้วยเช่นกัน

การจำแนกชนิดของพืชสกุลขมิ้นให้ถูกต้องเป็นสิ่งที่สำคัญ ที่จะทำให้สามารถจำแนกชนิดหรือระบุชนิดที่สามารถผลิตสารนี้ได้ในปริมาณมาก แต่เนื่องจากการศึกษาทบทวนทางอนุกรมวิธานของสกุลขมิ้นยังไม่สมบูรณ์ โดยเฉพาะในโครงการพรรณพฤกษชาติแห่งประเทศไทย (Flora of Thailand) ที่อยู่ระหว่างการดำเนินการเช่นกัน ซึ่งจะเป็นการจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและลักษณะทางกายวิภาคในการจัดจำแนก แต่ด้วยพืชมีความผันแปรของโครงสร้างอย่างมาก ทำให้เกิดความสับสนในการระบุระบุชนิด นักอนุกรมวิธานจึงต้องการเก็บตัวอย่างหรือศึกษาจากตัวอย่างจำนวนมากให้ครบในทุกพื้นที่และทุกระบบนิเวศในประเทศไทย การศึกษาทางสัณฐานวิทยาจึงมีความจำเป็น ดังนั้น การศึกษาทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับเทคนิคทางชีวโมเลกุลครั้งนี้จะช่วยเร่งการรวบรวมข้อให้เร็วขึ้นและชัดเจนยิ่งขึ้นในงานอนุกรมวิธานของพืชสกุลขมิ้นที่พบในประเทศไทย ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยอาศัยความแตกต่างระดับดีเอ็นเอหรือยีนเข้ามาช่วยในการจัดจำแนกพืชให้มีความชัดเจนมากขึ้น ซึ่งดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ได้นำมาใช้ในการจัดจำแนกพืชเป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีข้อได้เปรียบคือคลอโรพลาสต์มีจีโนมขนาดเล็ก ยีนในจีโนมของคลอ

โรพลาสต์เป็น single copy gene คือส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสจำเพาะพบเพียง 1 ครั้งต่อ 1 จีโนม แตกต่างจากยีนที่พบในนิวเคลียส นอกจากนี้คลอโรพลาสต์ยังมีส่วน non-coding region คือดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ที่ไม่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน ประกอบด้วย 2 บริเวณ คือ intron และ intergenic spacer เนื่องจากทั้ง 2 บริเวณนี้มีความแปรปรวนที่สูง (highly variable) มีความเหมาะสมในการนำมาใช้การจำแนกพืชที่มีลักษณะใกล้เคียงกันในระดับสายพันธุ์ (variety-level) หรือระดับประชากร (population-level) ดังนั้นการจัดจำแนกพืชในสกุล *curcuma* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลจะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการจำแนกชนิดและพัฒนาสายพันธุ์ต่อไป ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาเพื่อการระบุชนิดของสกุลขมิ้น (*Curcuma* L.)
2. เพื่อใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์เพื่อระบุชนิดของสกุลขมิ้น (*Curcuma* L.)

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สัณฐานวิทยาของพืชสกุลขมิ้น

สกุล *Curcuma* L. หรือสกุลขมิ้น อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae หรือ Ginger family หรือวงศ์ขิงข่า เป็นกลุ่มพืชดอกที่มีลักษณะเฉพาะตัวที่มีน้ำมันหอมระเหย กลิ่นหอม แต่ละชนิดก็มีสารเคมีที่แตกต่างกัน อยู่ในความสนใจของนักวิจัยตลอดมา ทุกชนิดในวงศ์นี้เป็นพืชล้มลุกอายุมากกว่า 1 ปี (perennial herb) มีเหง้าหรือลำต้นใต้ดิน (rhizome) ที่ทอดขนานไปกับพื้นดิน วงศ์ขิงนี้ทั่วโลกมีอยู่ประมาณ 53 สกุล 1200 ชนิด (Kress *et al.*, 2002) ส่วนสกุล *Curcuma* หรือขมิ้นมีอยู่ประมาณ 120 ชนิด (Sabu, 2006) ในประเทศไทย มีรายงานพบ 38 ชนิด (จรัญ มากน้อย และ พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2555) พบกระจายทั่วไปในเขตร้อน และกึ่งร้อนในแถบเอเชีย นิยมนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพรและปรุงอาหาร รวมถึงใช้เป็นเครื่องสำอาง แต่การนำมาใช้มีความจำเป็นต้องทราบชื่อที่ถูกต้อง ซึ่งยังเป็นปัญหาสำหรับบุคคลทั่วไปที่ไม่ใช่นักอนุกรมวิธาน แม้แต่นักอนุกรมวิธานก็มีความยากที่จะระบุชนิด (scientific name) ด้วยเช่นกัน เพราะสกุลขมิ้นมีวงชีวิตที่ออกดอกและผลให้เห็นเพียงเวลาสั้นๆ หลังฤดูฝนเท่านั้น หลังจากนั้นทั้งดอกและใบจะโทรมลง หรือบางชนิดออกดอกแต่ใบยังไม่ออก แต่เมื่อดอกโทรมลงจะมีใบงอกออกมาทีหลัง แต่เหง้า (rhizome) ใต้ดินยังคงมีชีวิตและเป็นส่วนที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ ทำให้ยากต่อการระบุชนิดว่าเหง้าที่นำมาใช้นั้นคือชนิดอะไร โครงสร้างหลายส่วน เช่น ดอก สีดอก ขนาดเหง้า สีภายในของเหง้า มีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน โดยที่ยังไม่ทราบว่าความผันแปรของรูปร่างต่างๆ ที่ปรากฏนั้น เกิดจากอายุของพืชที่แตกต่างกัน หรือนิเวศที่พืชขึ้นอยู่ ดังนั้น การศึกษาทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับอณูชีววิทยาครั้งนี้จะเป็นการศึกษาที่มีความแม่นยำในการระบุชนิดมากยิ่งขึ้น จะทำให้การนำพืชไปใช้ประโยชน์ต่อได้อย่างถูกต้องต่อไป อีกทั้งนี้ การศึกษาทางอนุกรมวิธานของโครงการพรรณพฤกษชาติแห่งประเทศไทย ของสำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ยังอยู่ระหว่างการดำเนินการ จึงต้องการผู้รวบรวมข้อมูลเพื่อสนับสนุนโครงการให้สมบูรณ์ด้วยเช่นกัน

จากที่กล่าวมาแล้วว่า พืชสกุล *Curcuma* หรือสกุลขมิ้น อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae หรือ Ginger family หรือวงศ์ขิงข่า เป็นกลุ่มพืชดอกใบเลี้ยงเดี่ยว มีลักษณะเฉพาะตัวที่มีน้ำมันหอมระเหย กลิ่นหอม แต่ละชนิดมีสารเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งอยู่ในความสนใจของนักวิจัยตลอดมา ทุกชนิดในวงศ์นี้เป็นพืชล้มลุกอายุมากกว่า 1 ปี (perennial herb) มีเหง้าหรือลำต้นใต้ดิน (rhizome) ที่ทอดขนานไปกับพื้นดิน วงศ์ขิงนี้ทั่วโลกมีอยู่ประมาณ 53 สกุล 1200 ชนิด (Kress *et al.*, 2002) ส่วนสกุล *Curcuma* หรือขมิ้นมีอยู่ประมาณ 120 ชนิด (Sabu, 2006) ในประเทศไทย มีรายงานพบ 38 ชนิด (จรัญ มากน้อย และ พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2555) พบกระจายทั่วไปในเขตร้อน และกึ่งร้อนในแถบเอเชีย นิยมนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพร ปรุงอาหาร เป็นเครื่องเทศส่วนผสมในเครื่องสำอาง รวมถึงใช้เป็นไม้ประดับ จะยกตัวอย่างในการเป็นพืชสมุนไพรของพืชสกุล *Curcuma* หรือสกุลขมิ้น เป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์ในการใช้รักษาโรคหลายชนิด เช่น บรรเทาอาการอาหารไม่ย่อย รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ลดการบีบตัวของลำไส้ ฆ่าเชื้อราและ

เชื้อแบคทีเรีย มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง เพราะพืชในสกุลนี้จะมีสารในกลุ่ม curcuminoid เป็นสาระสำคัญในการรักษาโรค การจำแนกชนิดของพืชสกุลขมิ้นให้ถูกต้องเป็นสิ่งที่สำคัญ ที่จะทำให้สามารถจำแนกชนิดหรือระบุชนิดที่สามารถผลิตสารนี้ได้ในปริมาณมาก แต่เนื่องจากการศึกษาทบทวนทางอนุกรมวิธานของสกุลขมิ้นยังไม่สมบูรณ์ โดยเฉพาะในโครงการพรรณพฤกษชาติแห่งประเทศไทย (Flora of Thailand) ที่อยู่ระหว่างการดำเนินการเช่นกัน ซึ่งจะเป็นการจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและลักษณะทางกายวิภาคในการจัดจำแนก แต่ด้วยพืชมีความผันแปรของโครงสร้างอย่างมาก ทำให้เกิดความสับสนในการระบุระบุชนิด นักอนุกรมวิธานจึงต้องการเก็บตัวอย่างหรือศึกษาจากตัวอย่างจำนวนมากให้ครบในทุกพื้นที่และทุกระบบนิเวศในประเทศไทย การศึกษาทางสัณฐานวิทยาจึงมีความจำเป็น ดังนั้นการศึกษาทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับเทคนิคทางชีวโมเลกุลครั้งนี้จะช่วยเร่งการรวบรวมข้อให้เร็วขึ้นและชัดเจนยิ่งขึ้นในงานอนุกรมวิธานของพืชสกุลขมิ้นที่พบในประเทศไทย ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยอาศัยความแตกต่างระดับดีเอ็นเอหรือยีนเข้ามาช่วยในการจัดจำแนกพืชให้มีความชัดเจนมากขึ้น ซึ่งดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ได้นำมาใช้ในการจัดจำแนกพืชเป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีข้อได้เปรียบคือคลอโรพลาสต์มีจีโนมขนาดเล็ก ยีนในจีโนมของคลอโรพลาสต์เป็น single copy gene คือส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสจำเพาะพบเพียง 1 ครั้งต่อ 1 จีโนม แตกต่างจากยีนที่พบในนิวเคลียส นอกจากนี้คลอโรพลาสต์ยังมีส่วน non-coding region คือดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ที่ไม่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีนประกอบด้วย 2 บริเวณ คือ intron และ intergenic spacer เนื่องจากทั้ง 2 บริเวณนี้มีความแปรปรวนที่สูง (highly variable) มีความเหมาะสมในการนำมาใช้การจำแนกพืชที่มีลักษณะใกล้เคียงกันในระดับสายพันธุ์ (variety-level) หรือระดับประชากร (population-level) ดังนั้นการจัดจำแนกพืชในสกุล *curcuma* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลจะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการจำแนกชนิดและพัฒนาสายพันธุ์ต่อไป

การศึกษาทางอนุกรมวิธานพืชวงศ์ Zingiberaceae หรือ Ginger family หรือวงศ์ขิง-ข่าในประเทศไทย ได้มีการรายงานออกมาเป็นระยะ ทั้งทางอนุกรมวิธานและการใช้ประโยชน์ต่างๆ โดยเฉพาะเป็นพืชสมุนไพร ดังนั้นงานทางอนุกรมวิธานจึงควรมีความชัดเจนและก้าวหน้าพอที่จะสนับสนุนงานด้านอื่นๆ และเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ที่ถูกต้อง ในขณะเดียวกันหลายชนิดอยู่ในสถานะภาพพืชหายาก (rare species) และพืชใกล้สูญพันธุ์ (endangered species) พืชวงศ์ขิงข่าในประเทศไทยได้รายงานทางอนุกรมวิธานไว้โดย Kai Larsen (1980) โดยได้ทำรูปวิธานระดับสกุลสำหรับวงศ์ขิง-ข่าในประเทศไทย (key to the genera found in Thailand) ไว้ จำนวน 29 สกุล และได้กล่าวประมาณจำนวนชนิดไว้ว่ามีประมาณ 200 ชนิด ต่อมา Larsen และ Suksuwan Larsen (2006) ได้พิมพ์หนังสือ Gingers of Thailand และได้กล่าวว่าพืชวงศ์ขิงข่าในประเทศไทยพบอยู่ประมาณ 50 สกุล 300 ชนิด ซึ่งเป็นข้อมูลทางอนุกรมวิธานที่ก้าวหน้ามาก แต่ยังไม่สมบูรณ์เพราะบางสกุลยังไม่มีการศึกษาทบทวนทางอนุกรมวิธาน รวมถึงสกุลขมิ้นที่ต้องการศึกษาทบทวนทางอนุกรมวิธานด้วยเช่นกัน

สกุลขมิ้น (*Curcuma* L.) ได้ถูกตั้งชื่อเมื่อ 1753 โดยนักพฤกษศาสตร์ชาวสวีเดนชื่อ Carolus Linnaeus (23 May 1707-10 January 1778) มีรายงานพบในประเทศไทยประมาณ 38 ชนิด (จรัญ มากน้อย และ พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2555) แต่ Larsen และ Suksuwan Larsen

(2006) รายงานพบในประเทศไทย 34 ชนิด จากทั่วโลกมี 60 ชนิด ในขณะที่ Sabu (2006) กล่าวว่าเฉพาะในอินเดียอาจพบประมาณ 120 ชนิด ซึ่งการรายงานจำนวนชนิดที่แตกต่างมาก แสดงให้เห็นว่าการศึกษาทางอนุกรมวิธานยังไม่แน่นอน สกุลขมิ้นพบกระจายพันธุ์ตั้งแต่เอเชียเขตร้อน (tropical Asia) คือ Indo-Malesian กระจายขึ้นไปถึงจีนตอนใต้ และออสเตรเลียตอนเหนือ (northern Australia) ประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่พบจำนวนชนิดมากที่สุด สกุลขมิ้นมีลักษณะที่แตกต่างจากสกุลอื่นๆ อย่างชัดเจน อยู่ในเผ่า Hedychieae (Larsen, 1980) เป็นพืชล้มลุกอายุมากกว่า 1 ปี บางชนิดออกดอกในฤดูแล้ง ก่อนการผลิใบในฤดูฝน เช่น กระเจียวสุเทพ (*Curcuma ecomata* Craib) และมหาอุดม (*C. glans* K.Larsen) ส่วนชนิดอื่นๆ มักจะออกดอกพร้อมกับใบ Curcuma มีรากศัพท์ มากจากภาษาอาหรับ kurkum หมายถึงขมิ้น (tumeric) ที่มีสีเหง้าสีเหลือง ลักษณะโดยทั่วไป มีลำต้นสะสมอาหาร (rhizome) ใต้ดิน ส่วนลำต้นที่อยู่เหนือดินซึ่งใบนั้นเป็นลำต้นเทียม (pseudostem) ดอกออกเป็นช่อ ทรงกระบอก ออกที่ปลายยอดอ่อนที่จะกำเนิดใบหรือบางครั้งออกแยกไปตามตาด้านข้างก็ได้ มีใบประดับ ใบประดับที่อยู่ปลายช่อดอกมักเป็นหมันเรียกว่า coma ทั้งใบประดับและ coma นี้ บางครั้งมีสีสัน ที่ใกล้เคียงกันทำให้เกิดความสับสนในการระบุชนิด ใบประดับเป็นลักษณะเด่นที่ทำให้คนนิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับเพื่อโชว์ใบประดับ ทำให้พบพืชสกุลขมิ้นวางขายอยู่ในท้องตลาด จะเห็นว่ามีการใช้ประโยชน์เริ่มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แหล่งอาศัยถูกคุกคามมีปริมาณน้อยลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการศึกษาทบทวนทางอนุกรมวิธานจึงมีความเร่งด่วนที่ต้องทำต่อไป โดยต้องศึกษาทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างต่อไปนี้ คือ ลักษณะวิสัย (habit) เหง้า (rhizome) ราก (root) ลำต้นเหนือดินหรือลำต้นเทียม (leafy shoot/pseudostem) ใบ (leaves) ช่อดอก (inflorescence) ใบประดับ (bracts) รูปทรงดอก (flower form) ดอก (flower) เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes) ลาเบลลัม (labellum) มีเกสรเพศผู้ (stamen) เกสรเพศเมีย (pistil) โครงสร้างเหล่านี้ต้องการศึกษาอย่างละเอียดควบคู่กับการใช้เทคนิคชีวโมเลกุล เพื่อสนับสนุนลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งหวังว่าจะช่วยแก้ปัญหาทางอนุกรมวิธานได้เป็นอย่างดี

การศึกษาทางอณูชีววิทยาของพืชสกุลขมิ้น

การศึกษาครั้งนี้ต้องการใช้ส่วนที่อยู่ระหว่างยีนในคลอโรพลาสต์ ซึ่งคลอโรพลาสต์เป็นออร์แกเนลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงภายในพืช มีลักษณะโครงสร้างดีเอ็นเอเป็นแบบวงแหวนเกลียวคู่ (double stranded circular DNA) มีขนาดประมาณ 120-220 กิโลเบส (รูป 2.6) จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นส่วนใหญ่ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์มีลักษณะพันธุกรรมถ่ายทอดมาจากแม่ฝ่ายเดียว จึงทำให้มีรูปแบบดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์เป็นแบบโฮโมโลกัส (homozygous) คือเหมือนกันทั้งหมด ดังนั้นเมื่อเราหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน หรือดีเอ็นเอในส่วนนั้นๆจะทำให้อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ง่ายขึ้น โดยยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และสามารถใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชได้ ในปัจจุบันการหาลำดับดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีนถูกนำมาใช้บ่อยครั้งในการจัดจำแนก เนื่องจากบริเวณระหว่างยีนเป็นบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในส่วนที่ไม่มีการแสดงออก เช่น บริเวณระหว่างยีน *trn*S (UGA)–*trn*fM (CAU) ซึ่งหน้าที่ขนส่งกรดอะมิโนซีรีน (Serine) และเมไทโอนีน (Methionine) ไปต่อในสายพอลิเพปไทด์ ส่วนบริเวณระหว่างยีน *trn*L (UAA) –*trn*F (GAA) ทำหน้าที่ขนส่งกรดอะมิโนลิวซีน (Leucine) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ไปต่อในสายพอลิเพปไทด์ เป็นต้น

Ngamriabsakul *et al.*, (2004) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชวงศ์ขิงโดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 5.8S และ ITS2 ในribosomal DNA และบริเวณยีน *trn*L–F ในคลอโรพลาสต์ พบว่ามีสองกลุ่มที่เป็น monophyletic group คือ *Curcuma* และ *Hedychium* หลังจากนั้น Ngamriabsakul and Techaprasan (2006) ได้ออกแบบไพรเมอร์ *pet*A-F, *psb*J-R, *psb*L-R ขึ้นเพื่อเพิ่มชิ้นบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *petA-psbJ* ในคลอโรพลาสต์ ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาพืชสกุล *Boesenbergia* หรือสกุลกระชาย เป็นพืชสกุลหนึ่งของพืชในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) โดยจากการศึกษาในครั้งนี้มี 23 ตัวอย่าง พบว่า มี 18 ตัวอย่างเป็นพืชสกุลเดียวกัน และอีก 5 ตัวอย่าง เป็นพืชสกุลใกล้เคียงกัน จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Pasimony และ UPGMA จะเห็นได้ว่าในสกุลกระชาย เป็นกลุ่มวงศ์วานเดี่ยว (monophyletic) และถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยซึ่งเป็นไปตามจำนวนโครโมโซมที่ต่างกัน และชนิดที่คาดว่าจะเป็นพืชชนิดใหม่ คือ *Boeaenbergia bambusetorum* ซึ่งถูกจัดในกลุ่มร่วมกับ *B. longiflora*

ต่อมา Minami *et al.*, (2009) ได้พัฒนาการจัดจำแนกพืชให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันในคลอโรพลาสต์ (Chloroplast DNA) จากบริเวณทั้งหมด 19 บริเวณ ของพืชสกุล *Curcuma* พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*S - *trn*fM (*trn*SfM) สามารถจัดจำแนกพืชในสกุล *Curcuma* ทั้ง 4 ชนิดได้ คือ *C. longa* *C. aromatic* *C. zedoaria* และ *C. xanthorrhiza* ในปีต่อมา Techaprasan *et al.*, (2010) ได้ทำการศึกษาพืชสกุล *Kaempferia* หรือสกุลเปราะในประเทศไทย พืชสกุลนี้จัดอยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) โดยมีประมาณ 71 ชนิด จากการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของพืชสกุลนี้ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณของยีน *psb*A-*trn*H ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ และบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *petA-psbJ* พบว่าทั้ง 2 บริเวณให้ผลที่สอดคล้องกันคือ มี 10 ชนิด ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน คือ *Boesenbergia rotunda* *Gagnepainia godefroyi* *G. thoreliana* *Globba substrigosa* *Smithatris myanmarensis*

S. supraneanae *Scaphochlamys biloba* *S. minutiflora* *S. rubescens* และ *Stahlianthus* sp. เพราะมีค่าของลำดับนิวคลีโอไทด์ divergence ไม่แตกต่างกัน

Selvaraj *et al.*, (2008) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *mat*K ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของพืชวงศ์ขิง จากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของพืชวงศ์นี้ พบว่าสกุล *Afromonum* สกุล *Alpinia* สกุล *Globba* สกุล *Curcuma* และสกุล *Zingiber* จัดเป็น polyphyletic กันและมีอัตราการเกิด transition ต่อ transversion (Ts/Tv ratio) เท่ากับ 1.54 เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*L - *trn*F และ 5S rRNA ของพืชสมุนไพรบางชนิดที่พบในพื้นที่โคกภูตากา จังหวัดขอนแก่น ได้แก่ *Sauropus hirsute* Beille *Flacourtia indica* (Burm. f.) Merr. *Curcuma thorelii* Gagnep. *C. aeruginosa* Roxb. *Polyalthia debilis* (Pierre) Finet & Gagnep. และ *Rhodania dumetorum* (Poir) Merr. & L.M.Perry. พบว่าดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 820 - 900 คู่เบส และ 180 - 570 คู่เบส ตามลำดับ โดยขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวมีความเจาะจงต่อชนิดของพืชสมุนไพรที่นำมาศึกษา ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรได้ (ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก และ คณะ, 2552)

จากการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จำนวน 52 ตัวอย่าง โดยมี outgroup 3 ตัวอย่าง จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ *trn*L-*trn*F ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างพืชได้เป็น 2 เผ่า ได้แก่ เผ่า Ruellieae และเผ่า Acantheae โดยเผ่า Ruellieae จำแนกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ เผ่าย่อยขาไก่ (Justiciinae) เผ่าย่อยต้อยติ่ง (Ruelliinae) เผ่าย่อยฟ้าทะลาย (Andrographinae) และเผ่าย่อยอังกาบ (Barleriinae) (เจตียา ด่านธนวานิช และ คณะ, 2556)

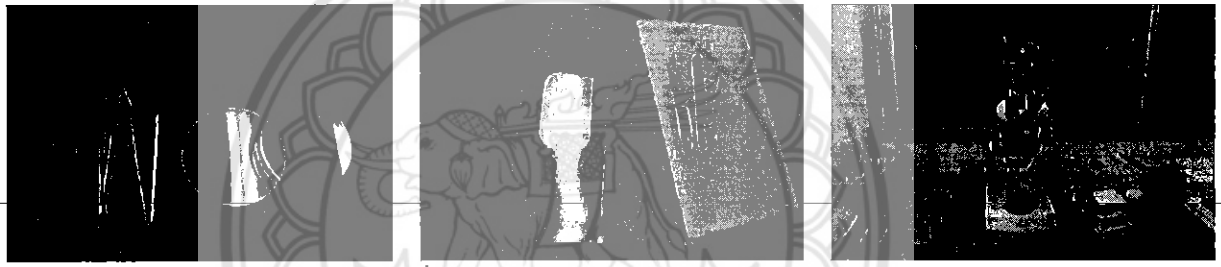
นอกจากนี้ยังมีอีกหลายเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชสกุลนี้ เช่น วริสรา แทนสง่า และ คณะ (2557) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกขมิ้นด้วยเทคนิคแฮฮอาร์เอพีดีทั้งหมด 10 ตัวอย่าง 6 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 สาย พบว่าไพรเมอร์ 35 สาย สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าสามารถจำแนกขมิ้นทั้ง 10 ตัวอย่าง เป็น 4 กลุ่ม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.83 และต่อมา อธิฐาน โนนกระโทก และ คณะ (2555) ศึกษากายวิภาคศาสตร์ผิวใบของพืชสกุลกระเจียว 19 ชนิด (26 ตัวอย่าง) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยวิธีการลอกผิวใบทั้งด้านบนและด้านล่าง พบว่าชนิด ความยาว ความหนาแน่นขน และสารแทนนินนำมาใช้ในการระบุชนิดและพืชสกุลนี้ได้

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

วิธีการศึกษาทางสัณฐานวิทยา

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

การเก็บตัวอย่างและรักษาตัวอย่างพรรณไม้ อุปกรณ์ที่จำเป็นขณะออกภาคสนาม ได้แก่ มีดกรรไกรตัดกิ่งไม้ ถุงพลาสติกขนาดใหญ่ – เล็ก พร้อมยางรัดปากถุง กระดาษใช้สำหรับทำหมายเลขติดกับตัวอย่างพืช เชือก (สำหรับผูกกระดาษหมายเลขตัวอย่างติดกับตัวอย่างพืช และสำหรับผูกแผงอัด) สมุดบันทึก แผงอัดพรรณไม้ ขนาด 30 x 46 cm. หรือ 12 x 18 นิ้ว กระดาษกล่อง ใช้สำหรับคั่นระหว่างตัวอย่างพรรณไม้แต่ละชิ้น กล้องถ่ายรูป แอลกอฮอล์ ขวดสำหรับดองตัวอย่าง กล้องจุลทรรศน์แบบเสตอริโอ กระดาษกราฟ กระดาษไข และเอกสารและตำราทางอนุกรมวิธานของพืชสกุลขมิ้น



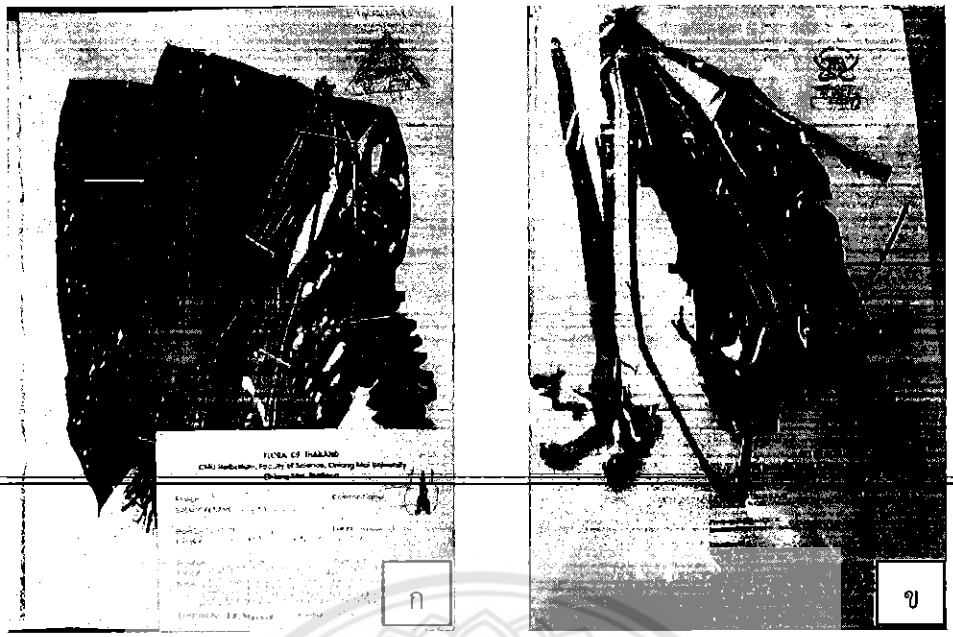
ภาพที่ 3.1 อุปกรณ์การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. การศึกษาเอกสาร ข้อมูลเกี่ยวกับพืชสกุลขมิ้นจากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลขมิ้นผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยศึกษาโครงสร้างสืบพันธุ์ และโครงสร้างที่ไม่ใช่โครงสร้างสืบพันธุ์ เช่น ราก ลำต้นและใบ พร้อมวาดภาพลักษณะลงในกระดาษกราฟ

3. ศึกษาด้านอนุกรมวิธานของพืชสกุลขมิ้น โดยนำตัวอย่างพรรณไม้แห้งจากหอพรรณไม้และตัวอย่างที่ได้จากการออกภาคสนาม นำมาตรวจลักษณะ และบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งผลการศึกษาทั้งจากตัวอย่างพรรณไม้แห้งและจากตัวอย่างที่ออกภาคสนามได้รายงานในบทที่ 4



ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างพรรณไม้แห้ง

ก. พรรณไม้แห้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (CMUB)

ข. พรรณไม้แห้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (PNU)

วิธีการศึกษาทางอณูชีววิทยา

ตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษา

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างใบพืชสกุล *Curcuma* ที่ต้องการศึกษารวมทั้งหมด 34 ตัวอย่างและพืชนอกสกุลอีก 1 ตัวอย่าง คือ *Zingiber ottensii* Valeton เพื่อใช้เป็น out group รวมทั้งหมด 35 ตัวอย่าง ซึ่งการเก็บรวบรวมพืชตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มาจากแหล่งพื้นที่ต่างกัน ในแต่ละจังหวัดต่างของประเทศไทย ซึ่งตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษาจะเป็นตัวอย่างสดทุกตัวอย่าง (ตาราง 3.1)

ตาราง 3.1 รายชื่อตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิจัย

ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อเรียก/Code	แหล่งที่มา
1	*Curcuma mangga* Valeton & Zijp (1)	ขมิ้นขาว	จังหวัดพิษณุโลก
2	*Curcuma aromatic* Salisb.	นางคำ	จังหวัดพิษณุโลก
3	*Curcuma ecomata* Craib (1)	กระเจียวสุเทพ	จังหวัดพะเยา*
4	*Curcuma ecomata* Craib (2)	กระเจียวสุเทพ	จังหวัดลำปาง*
5	*Curcuma comosa* Roxb. (1)	ว่านชักมดลูก	จังหวัดลำปาง*
6	*Curcuma comosa* Roxb. (2)	ว่านชักมดลูก	จังหวัดพะเยา**
7	*Curcuma mangga* Valeton & Zijp (2)	ขมิ้นขาว	จังหวัดลำพูน
8	*Curcuma roscoeana* Wall.	กระเจียวส้ม	จังหวัดตาก
9	*Curcuma longa* L.	ขมิ้นชัน	จังหวัดพิษณุโลก
10	*Curcuma* sp. (1)	ม้าฮ้อเล็ก	จังหวัดพิษณุโลก
11	*Curcuma* sp. (2)	รางจืด	จังหวัดพิษณุโลก
12	*Curcuma* sp. (3)	ห้าร้อยนาง	จังหวัดพิษณุโลก
13	*Curcuma* sp. (4)	พญาว่าน	จังหวัดพิษณุโลก
14	*Curcuma* sp. (5)	ทรหด	จังหวัดพิษณุโลก
15	*Curcuma* sp. (6)	ขมิ้นทอง	จังหวัดพิษณุโลก
16	*Curcuma* sp. (7)	Unknown	จังหวัดพิษณุโลก
17	*Curcuma* sp. (8)	ขมิ้นร้อยเอ็ด	จังหวัดร้อยเอ็ด
18	*Curcuma* sp. (9)	ขมิ้นสีคิ้ว	จังหวัดนครราชสีมา
19	*Curcuma* sp. (10)	2174	จังหวัดพะเยา*

ตาราง 3.1 (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อเรียก/Code	แหล่งที่มา
20	*Curcuma* sp. (11)	2178	จังหวัดลำปาง*
21	*Curcuma* sp. (12)	2182	จังหวัดลำปาง*
22	*Curcuma* sp. (13)	2184	จังหวัดลำปาง*
23	*Curcuma* sp. (14)	2189	จังหวัดพะเยา**
24	*Curcuma* sp. (15)	2191	จังหวัดพะเยา**
25	*Curcuma* sp. (16)	2193	จังหวัดพะเยา**
26	*Curcuma* sp. (17)	2194	จังหวัดพะเยา**
27	*Curcuma* sp. (18)	2199	จังหวัดลำปาง**
28	*Curcuma* sp. (19)	2201	จังหวัดลำปาง**
29	*Curcuma* sp. (20)	2204	จังหวัดเพชรบูรณ์
30	*Curcuma* sp. (21)	2207	จังหวัดลำพูน
31	*Curcuma* sp. (22)	2219	จังหวัดตาก
32	*Curcuma* sp. (23)	2221	จังหวัดตาก
33	*Curcuma* sp. (24)	2222	จังหวัดตาก
34	*Curcuma* sp. (25)	2226	จังหวัดตาก
35	*Zingiber ottensii* Valeton	ไพลดำ	จังหวัดพิษณุโลก

จังหวัดลำปาง* คือ ตำบล แม่ขะจาน อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดลำปาง

จังหวัดลำปาง** คือ บ้านชนแดน อำเภองาว จังหวัดลำปาง

จังหวัดพะเยา* คือ มหาวิทยาลัยพะเยา ตำบลแม่กา อ.เมือง จังหวัดพะเยา

จังหวัดพะเยา** คือ วนอุทยานภูลังกา ตำบลผาช้างน้อย อำเภอปง จังหวัดพะเยา

อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

- กระบอกตวง (cylinder)
- บีกเกอร์ (beaker)
- หลอดไมโครเซนติฟิวส์ (microcentrifuge tube) ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร
- หลอดเซนติฟิวส์ (centrifuge Tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- ไมโครปิเปตต์ (micropipette) และทิป (tip) ขนาด 10 100 และ1,000 ไมโครลิตร
- โกร่ง และที่บด (mortar and pestle)
- ถังบรรจุไนโตเจนเหลว (liquid nitrogen tank)
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (balance)
- ไมโครเวฟ (microwave)

- เครื่องช่วยผสม (vortex)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- ตู้เย็น (refrigerator) หรือตู้แช่แข็ง (deep freeze)
- ชุดอุปกรณ์อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
- เครื่อง UV transilluminator
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler)
- วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ เช่น ทิชชู่ อลูมิเนียมฟอยล์ และถุงมือยาง ปากกาเคมี ถุงพลาสติก กระดาษชั่งสาร

<u>สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ</u>

- 2X CTAB Buffer (CTAB 2% Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM EDTA (pH 8.0) 20 mM และ NaCl 1.4 M)
- β-mercaptoethanol
- Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)
- Absolute ethanol
- Ethanol 70%
- RNase A 10 mg/ml (Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM และ NaCl 15 mM)
- TE buffer (Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM และ EDTA pH (8.0) 1mM)
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

<u>สารเคมีที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์</u>

- RBC *Taq* DNA Polymerase
- Biotechrabbit *Taq* DNA polymerase
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- ไพรเมอร์จำนวน 14 ไพรเมอร์ ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์

<u>สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและ DNA purification</u>

- 50X TAE buffer (Tris-HCl (PH 8.0) 0.4 M Glacial acetic acid และ EDTA (pH 8.0) 0.5 M)
- Agarose (บริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด)
- Ethidium Bromide

- Marker 1kb ladder (บริษัท Bioline)

- 6X DNA Loading Dye

- ชุด purification สำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience)

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิจัย

โดยการศึกษาได้ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างใบพืชสกุล *Curcuma* ทั้งหมด 34 ตัวอย่างและพืชนอกสกุลคือ *Zingiber ottensii* Valeton (ไพลดำ) อีก 1 ตัวอย่าง เป็น out group (ตาราง 3.1) ซึ่งการเก็บรวบรวมตัวอย่างที่ใช้สำหรับการวิจัยในครั้งนี้มาจากแหล่งพื้นที่ต่างกัน

การสกัดดีเอ็นเอ

จากการเก็บรวบรวมพืชสกุล *Curcuma* ที่ต้องการศึกษา มาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยขั้นตอนแรกจะต้องทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำ เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกหรือสิ่งเจือปนต่างๆออกจากพืชตัวอย่างหลังจากนั้นนำพืชตัวอย่างโดยใช้ส่วนของใบมาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ซึ่งวิธีดัดแปลงมาจากของ Agrawal *et al.*, (1992)

1. ทำการเตรียม 2X CTAB Buffer (CTAB 2%, Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM, EDTA (pH 8.0) 20 mM, NaCl 1.4 M) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม β-mercaptoethanol ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 15 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

2. ชั่งใบพืชตัวอย่าง 0.5 กรัม นำตัวอย่างมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวเพื่อให้เซลล์แตกละเอียดและย้ายลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ในข้อ (1) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยจะต้องทำการกลับหลอดทดลองทุกๆ 15 นาที

3. ทำการแยกโปรตีนออกจากดีเอ็นเอโดยการเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร5 มิลลิลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีแล้วดูดส่วนใสที่ได้ใส่หลอดใหม่

4. ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม Absolute ethanol 2/3 เท่าของสารละลาย และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

5. ดูดส่วนใสทิ้งไปและเก็บตะกอนไว้ โดยล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol 70% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีและดูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปตากตะกอนให้แห้ง

6. ละลายตะกอนโดยใช้น้ำกลั่นหรือ TE Buffer ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร จากนั้นย้ายดีเอ็นเอลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติม RNase A ปริมาตร 5 ไมโครลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาตรวจสอบผลด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลและหวีให้เรียบร้อย

2. เตรียมเจลที่มีความเข้มข้น 0.8% (โดยชั่งอะกาโรส 0.8 กรัม) เติม 1X TAE Buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่แล้วนำไปละลายด้วยเครื่องไมโครเวฟ (microwave)

3. หลังจากนั้นวางทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงที่ 50-60 องศาเซลเซียสแล้วจึงเติม Ethidium Bromide ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเทเจลลงในถาดที่เตรียมไว้ในข้อที่ (1)

4. เมื่อเจลแข็งให้ดึงหวีออกจะได้หลุมสำหรับใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอ แล้วย้ายถาดเจลนั้นไปวางในเครื่องสำหรับการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสพร้อมทั้งเท 1X TAE Buffer ลงไปให้ท่วมเจลเล็กน้อย

5. นำสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสี 6X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บนแผ่น parafilm เมื่อผสมกันเสร็จให้นำไปหยอดใส่ในหลุมเจลและจะต้องหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานในหลุมแรกเพื่อใช้เทียบขนาดดีเอ็นเอ

6. เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และเทียบขนาดดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน(1Kb DNA ladder marker) จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้เครื่อง UV transilluminator

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องMastercycler Eppendorf โดยเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่อยู่ระหว่างยีนในคลอโรพลาสต์ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 14 ไพรเมอร์ (ตาราง 3.2) ดังต่อไปนี้

ตาราง 3.2 ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับที่	ชื่อไพเมอร์	5' ลำดับนิวคลีโอไทด์ 3'	Annealing temp (Ta)
1	*trn*Q	GCCTTACCYCT TGGCCACGC	55°C
	*psb*I	TCACGTCCAGGATTTCGTCCTG	
2	*atp*B	ACATCKARTACK GGACCAATAA	52°C
	*rbc*L	AACACCAGCTTTRAATCCAA	
3	*trn*L (UAA)	CGAAATCGGTAGACGCTACG	57°C
	*trn*F (GAA)	ATACTTGAACTGGTGACACGAG	
4	*trn*S (UGA)	GAGAGAGAGGGATTCGAACC	58°C
	*trn*fM (CAU)	CATAACCTTGAG GTCACGGG	
5	*trn*S (GCU)	AACTCGTACAACGGATTAGCAATC	55°C
	*trn*G (UUC)	GAATCGAACCCGCATCGTTAG	
6	*psb*M	AATAAATGRAGAATATTTACTTCCAT	55°C
	*trn*D	GGGATTGTAGYTCAATTGGT	
7	*Meang*1_F	AGAGTTCCAAGGACTCATAAA	50°C
	*Meang*1_R	TTGGTCCCGCTATTCGGA	
8	*rpo*C1_(intron1)_F	GTATTTCCGGGATTGGATTTC	55°C
	*rpo*C1_(intron1)_R	CTTGCATGTCCAGTGACTC	
9	*psa*J	ACCTGTGCTAAGTACTCTATG	55°C
	*RPL*_33	TTTCGGGCAACAACTGGTAC	
10	*ndh*B_F	ATTGCGCTTATATCCATCACTG	53°C
	*ndh*B_R	GTGGCTGAAGCGGAAGCA	
11	*NTCP*8_F	CCTCTCAATGAAAAATTCGAGGA	55°C
	*NTCP*8_R	CGGCTCCTTTATGGAATCTG	
12	*Ycf3*_F	CGCACCATCTCTGTAATAGGTA	55°C
	trnS (GGA)_R	TGCTACGCCTTGAACCACTC	
13	*ycf3*_(intron2)_F	GGATCAATTTCTGGTCGCGTA	55°C
	*ycf3*_(intron2)_R	ATAAGACCTCTTCAATTGTGGCC	
14	*RPS16*-F	CAAGGAAATATAGAATAGCAGGAA	55°C
	PPS16-R	TGAAACGATGTGGTAGAAAGCAA	

ซึ่งมี 2 ไพรเมอร์ที่แยกความแตกต่างได้มาก คือ ไพรเมอร์ *trnS* (UGA) - *trnfM* (CAU) และไพรเมอร์ *trn*L (UAA)–*trn*F (GAA) โดยมีความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาของแต่ละไพรเมอร์ แสดงในตารางที่ 3.3 และ 3.5 ตามลำดับ สำหรับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในแต่ละขั้นตอนจะมีความแตกต่างกันไปของแต่ละไพรเมอร์ (ตาราง 3.4 และ 3.6)

ตาราง 3.3 ความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาของไพรเมอร์ *trn*fM *(CAU) – trn*S (UGA)

ความเข้มข้นของสาร	ปริมาตรที่ใช้ (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X RBC *Taq* buffer (with $MgCl_2$ 15 mM)	5	1X
50 mM $MgCl_2$	0.8	0.8 mM
10 mM dNTPs mixture	1	0.2 mM
10 mM Forward primer	1	0.2 mM
10 mM Reverse primer	1	0.2 mM
5 U/ µl Biotechrabbit *Taq* DNA Polymerase	0.25	1.25 mM
DNA template	3	50-100 ng
Distilled water	37.95	
Total	50	

ตาราง 3.4 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *trn*fM (CAU)–*trn*S (UGA)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 (นาที)	1
Denaturation	94	15 (วินาที)	35
Annealing	58	20 (วินาที)	
Extension	72	1 (นาที)	
Final extension	72	7 (นาที)	1

ตาราง 3.5 ความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาของไพรเมอร์ *trn*L (UAA)–*trn*F (GAA)

ความเข้มข้นของสาร	ปริมาตรที่ใช้ (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X RBC *Taq* buffer (with $MgCl_2$ 15 mM)	5	1X
50 mM $MgCl_2$	1	1 mM
10 mM dNTPs mixture	1	0.2 mM
10 mM Forward primer	1	0.2 mM
10 mM Reverse primer	1	0.2 mM
5 U/ µl RBC *Taq* DNA Polymerase	0.25	1.25 mM
DNA template	3	50-100 ng
Distilled water	37.95	
Total	50	

ตาราง 3.6 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *trn*L (UAA)–*trn*F (GAA)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 (นาที)	1
Denaturation	94	30 (วินาที)	35
Annealing	57	30 (วินาที)	
Extension	72	1 (นาที)	
Final extension	72	7 (นาที)	1

การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA purification)

เป็นการนำดีเอ็นเอที่ต้องการมาทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience) โดยมีขั้นตอนตามวิธีมาตรฐานของบริษัท ดังนี้

1. นำ PCR product ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม DF Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ปริมาตร5เท่า ของตัวอย่าง) ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน

2. เตรียม Column ใส่ใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และดูดสารละลายในข้อที่ (5.1) ใส่ลงใน Column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ทิ้งแล้วใส่ Collection tube กลับไว้ที่เดิม

3. เติม Wash Buffer ลงใน Column ปริมาตร 600 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ทิ้งแล้วนำกลับไปไว้ที่เดิม และนำไปเหวี่ยงอีก 1 นาที แล้วย้าย Column ไปยังหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

4. จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 27 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาทีแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เมื่อเสร็จจะได้สารละลายดีเอ็นเอ แล้วนำไปตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส บนอะกาโรสเจล 1% และเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน(1Kb DNA ladder marker) ของบริษัท Bioline หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

ส่วนในกรณีที่ PCR product มีดีเอ็นเออื่นๆปนมาโดยมีแถบมากกว่า 1 แถบ จะต้องทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตัดเจล เพื่อให้มีแถบที่ต้องการเพียงแถบเดียว ซึ่งจะมีขั้นตอนดังนี้

1. นำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้ 1X TAE buffer ที่เตรียมใหม่

2. เจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าไว้แล้ว

3. จากนั้นนำหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ที่มีชิ้นเจลไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เพื่อหาน้ำหนักของเจล

4. เติม DF Buffer 500 ไมโครลิตร/300 มิลลิกรัมของเจลที่ตัดได้แล้วเขย่าให้เข้ากัน

5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีหรือจนเจลละลายหมด

6. DF column ใส่ใน collection tube แล้วถ่ายสารละลายเจลจากหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ลงใน DF column

7. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาทีเพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับเมมเบรน

8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวใน collection tube ทิ้ง

9. เติม Wash Buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน DF column เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวใน collection tube ทิ้ง

10. นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงอีก 2 นาทีเพื่อให้สารละลายที่ล้างตะกอนหมดไปจากตะกอนดีเอ็นเอที่เมมเบรน จากนั้นย้าย DF column ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

11. เติม Elution Buffer หรือใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร ใส่ลงตรงกลาง column บนแผ่นเมมเบรนพอดี เพื่อละลายดีเอ็นเอ

12. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

13. นำไปตรวจสอบผลขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยวิธีเอิเล็กโทรโฟรีซีส

วิเคราะห์ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มาประกอบเข้ากันเพื่อทำการแก้ไขเบสที่ผิดด้วยโปรแกรม Gene studio และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์และถูกต้องแล้วไปเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) เพื่อตรวจหาตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกัน จากนั้นตัดแต่งลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม Genedoc version 2.7.000 (Nicholas *et al.*, 1997) โดยตัดส่วนต้นและส่วนปลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ออก เนื่องจากเป็นบริเวณที่อาจเกิดความผิดพลาดในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อจัดจำแนกพืชสกุล *Curcuma* โดยทำการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 โดยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum parsimony และ Maximum Likelihood ซึ่งในแต่ละวิธีจะทำการตรวจสอบค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ ซึ่งได้ผลการศึกษาดังรายงานในบทที่ 4

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธาน

จากวิธีการศึกษาที่กำหนดไว้ ได้ตรวจตัวอย่างแห้ง (herbarium specimens) จากหอพรรณไม้เพื่อให้ทราบข้อมูลการพบพืชแต่ละชนิดว่าพบได้ที่ไหนบ้าง ตรวจดูชีพลักษณ์ เพื่อเก็บตัวอย่างที่สมบูรณ์ขณะที่ออกดอก และผล จากหอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (CMUB) จำนวน 65 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (PNU) 20 ตัวอย่าง และตัวอย่างสดที่ได้จากการออกภาคสนามจำนวน 34 ตัวอย่าง ดังแสดงไว้ในตาราง 4.1 และได้นำผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาทั้งจากตัวอย่างแห้งและตัวอย่างสด นำมาเขียนคำบรรยายลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พืชกสุลขมิ้น มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แต่ละส่วนของโครงสร้างได้วัฒนาการเปลี่ยนแปลงไปมาก ดังนั้นการเรียกโครงสร้างแต่ละส่วนจึงมีความจำเพาะ ซึ่งจะอธิบายได้ดังนี้คือ ลักษณะโดยทั่วไปเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี มีลำต้นใต้ดินที่เรียกว่าไรโซม (rhizome) มีลำต้นเทียมเหนือดิน (leafy shoot) มีกลิ่นและสีเฉพาะ ที่สามารถใช้ระบุชนิดและแยกออกจากสกุลอื่นๆ ได้ ลักษณะเด่นอีกประการหสึ่งของสกุลขมิ้นคือการมีใบประดับ (bract) ติดกันที่ฐาน หุ้มช่อดอกอยู่และทำให้มีช่อดอกที่ยืดยาวขึ้น และลักษณะที่โดดเด่นของใบประดับจึงใช้ในการจัดจำแนกระดับชนิดได้เช่นเดียวกัน โดยเฉพาะส่วนของใบประดับที่อยู่ด้านบนสุดของช่อดอก ที่มีชื่อเรียกเฉพาะว่า coma bract จะมีสีสันและขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นอีกหนึ่งลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดด้วยเช่นกัน ดังนั้น ลักษณะสำคัญต่างๆ ทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลขมิ้นที่ได้ศึกษาและใช้ในการะบุชนิดมีดังนี้

ส่วนใต้ดิน (underground parts)

ส่วนใต้ดินของพืชสกุลขมิ้นคือส่วนของลำต้นสะสมอาหาร จะมีเหง้าหลักหรือหัว เป็นหัวแรกเริ่ม (primary rhizome) ติดและชูส่วนของลำต้นเทียมขึ้นสู่บรรยากาศ ลักษณะอวบอ้วน ทรงกลม ทรงรี หรือรูปไข่ เจริญตามแนวดิ่งของโลก อีกส่วนที่อยู่ใต้ดินและสะสมอาหารเช่นกัน คือ แขนง หรือ branched rhizome เป็นลำต้นใต้ดินที่แตกแขนงออกมารอบๆ เหง้าหรือหัว เจริญทอดขนานกับพื้นดิน เปรียบเสมือนกิ่งของลำต้นทั้งเหง้าและแขนงภายจะมีสีแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดและเหง้ามักมีสีเข้มกว่าแขนง เช่น ขาว เหลือง ม่วง ส้ม หรือฟ้าอมเขียว เป็นต้น

ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)

ลำต้นเหนือดินของพืชสกุลขมิ้น เป็นลำต้นเทียม (pseudostem) ที่เจริญมาจากเหง้า (primary rhizome) ลำต้นเทียมนี้เกิดจากกาบใบ (leaf sheaths) ที่เรียงโอบซ้อนทับกัน ชูขึ้นมาเหนือพื้นดินทำให้ดูคล้ายเป็นลำต้น จึงมักจะเรียกตามลักษณะที่เห็นว่า ลำต้นเหนือดิน

ใบ (leaves)

ใบของพืชสกุลขมิ้นนั้นประกอบด้วยก้านใบที่ลักษณะเป็นแผ่นเรียกว่ากาบ ที่ม้วนซ้อนทับกันทำให้เห็นเป็นลำต้นเทียม มีสีเขียวเข้ม เขียมอมน้ำตาล หรือม่วงแดง คล้ายกับแผ่นใบ ซึ่งแผ่นใบ (leaf blade) ที่ติดกับกาบนั้นก็จะมีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปใบหอก (lanceolate) รูปรี (elliptic) ส่วนรูปแถบ (linear) พบได้น้อยมาก โคนใบและปลายเรียวแหลม (acuminate) แผ่นใบมีขนาดแตกต่างกันไป

ตั้งแต่ 15-50 เซนติเมตร ในแต่ละชนิด บางชนิดมีแถบม่วงแดงทาบอยู่สองข้าง บริเวณรอยต่อระหว่างก้านใบและกาบใบมักจะมีลิ้นใบ (ligule) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่เจริญขึ้นและมีลักษณะบาง รูปสามเหลี่ยมหรือรูปไข่ ผิวใบด้านล่างอาจพบมีขนนุ่มปกคลุมอยู่ได้

ช่อดอก (inflorescence)

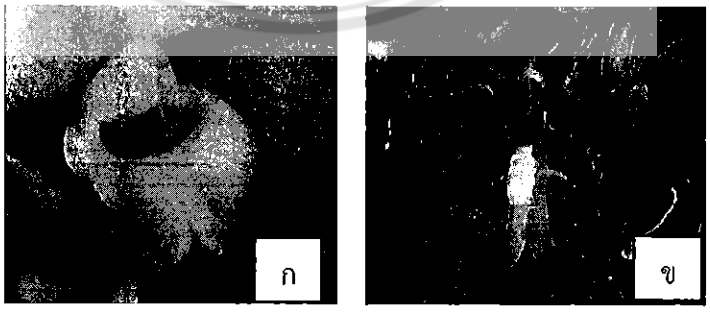
ช่อดอกของพืชสกุลขมิ้น เกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะคือ 1) เจริญออกมาจากปลายยอดของลำต้นเทียมหรือยอดของลำต้นเหนือดิน ซึ่งจะถูกโอบด้วยกาบใบ ทำให้เห็นช่อดอกโผล่ออกมาตรงยอดระหว่างใบ และ 2) ช่อดอกเกิดจากตาข้างของลำต้นใต้ดินหรือเหง้าที่แยกไปจากลำต้นใต้ดินแล้วแทงช่อดอกโผล่ขึ้นมาเหนือดินทำให้เห็นว่ามีดอกแนบชิดอยู่ข้างลำต้นเหนือดิน หรืออยู่ห่างออกไปตามนาวที่แขนงทอดเลื้อยออกไป ช่อดอกที่เกิดจากตาข้างหรือลำต้นแขนงนี้ประกอบไปด้วย ก้านช่อ (scape) ที่ชูช่อดอกเป็นแกนที่มีดอกติดอยู่

ใบประดับ (bract)

ใบประดับของพืชสกุลนี้มีขนาดใหญ่ ฐานของแต่ละใบประดับจะเชื่อมติดกันโอบล้อมแกน ทำให้เห็นเป็นช่อเดียวขนาดใหญ่ แต่จริงๆ แล้ว ในใบประดับแต่ละใบนั้นก็ประกอบไปด้วยช่อดอกย่อย ซึ่งจะเห็นได้ขณะที่ดอกบาน จะเห็นว่ามีดอกย่อยเจริญออกมาจากใบประดับแต่ละใบ ใบประดับแต่ละใบสามารถรองรับดอกได้ประมาณ 2-10 ดอก ซึ่งจะอัดรวมกันอยู่ภายใน ดอกย่อยนี้เป็นช่อดอกชนิด cincinnus ส่วนใบประดับที่อยู่ปลายช่อดอกหรือส่วนบนสุดของช่อดอกจะมีลักษณะที่แตกต่างออกไปจากใบประดับส่วนล่างและมักจะไม่มีช่อดอกย่อยเจริญอยู่ภายใน ใบประดับส่วนบนนี้มีสีที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด และมีชื่อเรียกเฉพาะว่า coma bract หรือใบประดับที่ปลายช่อ

รูปร่างดอก (flower form)

ดอกของพืชสกุลขมิ้น ที่จะมีรูปร่าง 2 แบบที่แตกต่างกัน คือ1) ดอกแบบหุบ (closed form) เกิดจากกลีบดอกเจริญหุ้มติดกับเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน หรือสเตมิโนด (staminode) ทำให้กลีบดอกบนไม่สามารถคลี่บานออกได้ และ 2) ดอกแบบบาน (open form) กลีบบนของกลีบดอกไม่หุ้มติดกับเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน หรือสเตมิโนด ทำให้กลีบบนของกลีบดอกบานออกได้อย่างอิสระ (ภาพ4.1 ก และ ข)



ภาพที่ 4.1 รูปร่างดอก (llower form) ของพืชสกุลขมิ้น
ก. ดอกแบบหุบ (closed form) ข. ดอกแบบบาน (open form)

ดอก (flower)

ดอกเป็นดอกย่อยในใบประดับ ดอกจะถูกหุ้มด้วยใบประดับย่อย (bracteole) ที่มีลักษณะบางใส สีขาว เป็นดอกสมบูรณ์ (complete flower structure) ดอกไม่สมมาตร (actinomorphic flower) โครงสร้างประกอบด้วย

ชั้นกลีบเลี้ยง (calyx) มีลักษณะเป็นหลอด ปลายแยกเป็นแฉก 3 แฉกไม่เท่ากัน ส่วนใหญ่มักเห็นเพียง 2 แฉก มีรอยแยกลงมาตามยาวด้านหนึ่งของหลอด

ชั้นกลีบดอก (corolla) มีลักษณะเป็นหลอดคล้ายปากแตร ส่วนปลายแยกเป็นแฉก 3 แฉกไม่เท่ากัน แฉกกลางจะมีขนาดใหญ่กว่า 2 แฉกข้างและตรงปลายเป็นรูปคุ่ม (hood) ภาพที่ 1 ก และ ข

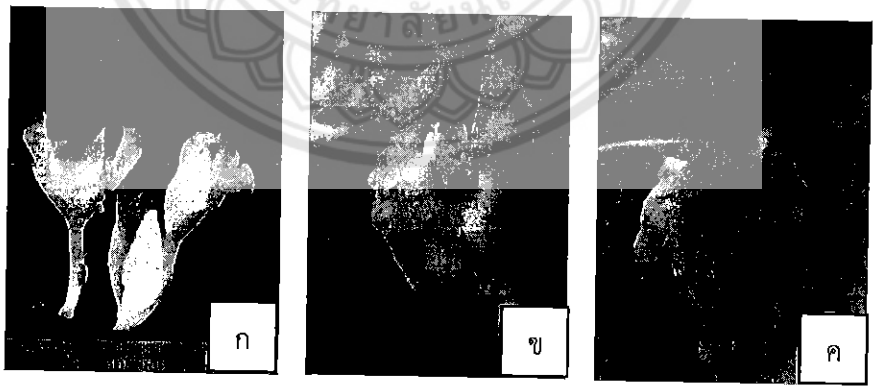
ชั้นลาเบลลัม (labellum) เป็นชั้นของกลีบดอกล่างมีลักษณะเป็นแผ่น และนับว่าเป็นส่วนที่เด่นที่สุดของดอกมีสีสันที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด เรียงซ้อนกันอยู่กับสเตมิโนดติดกันที่บริเวณฐาน กลางแผ่นจะมีแถบหนาสีเหลืองจากส่วนปลายไปตามยาวของแผ่น มีสันและร่องระหว่างสัน ส่วนปลายมักมีรอยหยักเล็กน้อย

ชั้นสเตมิโนด (staminodes) เป็นเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน มีลักษณะคล้ายกลีบดอก. อาจเป็นรูปรี รูปขนาน หรือรูปแถบ มักมีขนด้านบน

เกสรเพสผู้ (stamen) ประกอบด้วยก้านเกสรเพศผู้ (filament) มีลักษณะแบน กว้างและสั้น ปลายคอด อับเรณู (anther) ติดกับปลายก้านเกสรเพศผู้ตรงกลางอับเรณู (dorsific anther) ตรงฐานอับเรณูอาจมีเดือย (spur) รูปร่างต่างๆกัน หรือไม่มีก็ได้ มีจงอยอับเรณู (anther-crest) มีขนาดเล็ก

เกสรเพศเมีย (ovary) ผิวเกลี้ยงหรือมีขน ภายในมี 3 ช่อง อาจมีต่อมน้ำหวานเป็นแท่งยาวเหนือรังไข่

ผล (fruit) เป็นแบบแห้งแตก (capsule-baccate)

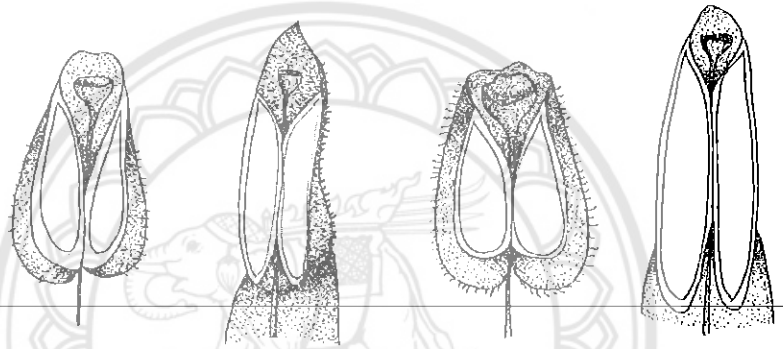


ภาพที่ 4.2 ส่วนประกอบของดอกพืชสกุลขมิ้น
ก. ลักษณะใบประดับย่อย รังไข่ และหลอดกลีบดอก
ข. กลีบปาก และเกสรเพศผู้ ค. ตำแหน่งดอกและใบประดับ

จากการศึกษาตัวอย่างทั้งหมดของพืชสกุลขมิ้น (*Curcuma* L.) ในครั้งนี้พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอับเรณู สามารถจำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม ตาม จรัญ มากน้อย (2555) ดังนี้

1. กลุ่มปทุมมา (Alismatifolia)

จากตัวอย่างพรรณไม้ของพืชสกุลขมิ้นกลุ่มปทุมมาที่นำมาศึกษาทั้งหมด 19 ตัวอย่างสามารถจัดให้อยู่ในกลุ่มปทุมมาได้ 4 ชนิด มีลักษณะของร่วมกันคืออับเรณูไม่มีเดือย รังไข่ไม่มีขน และไม่มีต่อมน้ำหวาน (epigynous glands) แต่มี 3 ชนิดคือ *Curcuma parviflora* Wall., *C. harmandii* Gagnep. และ *C. gracillima* Gagnep. อับเรณูมีขนปกคลุม (ภาพที่ 4.3 ก-ค) ส่วน *C. alismatifolia* Gagnep อับเรณูไม่มีขนปกคลุม (ภาพที่ 4.3 ง)

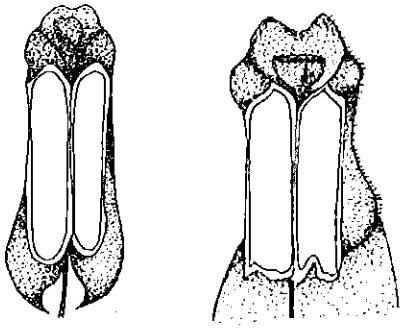


ก ข ค ง

ภาพที่ 4.3 ลักษณะอับเรณูของกลุ่มปทุมมา (Alismatifolia)
ก. *Curcuma parviflora* Wall. ข. *Curcuma harmandii* Gagnep.
ค. *Curcuma gracillima* Gagnep. ง. *Curcuma alismatifolia* Gagnep

2. กลุ่มมหาอุดม (Cochinchinensis)

ลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มมหาอุดม อับเรณูมีลักษณะเรียวยาว เดือยป้อมสั้นปลายแหลม จงอยอับเรณูหยักคล้ายรูปหัวใจ (ภาพที่ 4.4 ก) และ อับเรณูมีขนปกคลุมทั่วอับเรณู ไม่มีเดือย (ภาพที่ 4.4 ข) โดยทั้งสองตัวอย่างนี้มีลักษณะร่วมกันคือ รังไข่มีขนและมีต่อมน้ำหวาน (epigynous glands) ในการศึกษาครั้งนี้พบ 1 ชนิดคือ *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep.

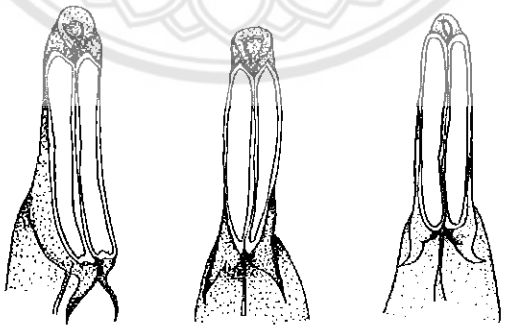


ก ข

ภาพที่ 4.4 ลักษณะอับเรณูของกลุ่มมหาอุดม (Cochinchinesis)
ก. ตัวอย่างพรรณไม้ S. Chongko 529 (CMUB)
ข. ตัวอย่างพรรณไม้ J.F. Maxwell 93-689 (CMUB)

3. กลุ่มกระเจียวสุเทพ (Ecomata)

ลักษณะโดยทั่วไป มีโคนใบรูปลิ่มถึงกลม เดือยอับเรณูเป็นแท่งยาวทำมุมกับแกนอับเรณู ไม่มี coma-bract อับเรณูมักมีความยาวตั้งแต่ 7-14 มิลลิเมตร เดือยอับเรณูปลายแหลมชี้ลงหรือชี้ออกด้านข้าง ยอดเกสรเพศเมียเปิดด้านบน รังไข่มีขนและมีต่อมน้ำหวาน (epigynous glands) ในการศึกษาครั้งนี้พบ 4 ชนิด ได้แก่ *Curcuma bicolor* Mood & K. Larsen, *C. ecomata* Craib, *C. glans* K. Larsen & Mood และ *C. flaviflora* S.Q. Tong โดยที่ *C. flaviflora* S.Q. Tong ได้ทำการศึกษาเฉพาะตัวอย่างพรรณไม้แห้ง ไม่มีตัวอย่างพรรณไม้ดองที่ถูกเก็บรักษาไว้ในแอลกอฮอล์ (in spirit collection) (ภาพที่ 4.5 ก-ค)

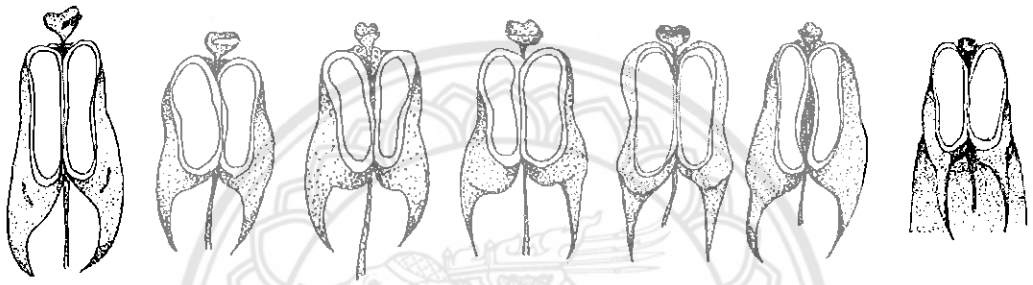


ก ข ค

ภาพที่ 4.5 ลักษณะอับเรณูของกลุ่มกระเจียวสุเทพ (Ecomata)
ก. *Curcuma bicolor* Mood & K. Larsen ข. *Curcuma ecomata* Craib
ค. *Curcuma glans* K. Larsen & Mood

4. กลุ่มขมิ้นแท้ (Eucurcuma)

ลักษณะโดยทั่วไป มีโคนใบรูปลิ่มหรือรูปกลม ใบประดับปลายเรียวแหลมหรือกลม เดือยอับเรณูเป็นแผ่นแบนปลายแหลมชี้ตรงตามแกนอับเรณู เดือยยาว 6-8 มิลลิเมตร ยอดเกสรเพศเมียปิดด้านข้าง รังไข่มีขนและมีต่อมน้ำหวาน (epigynous glands) จากตัวอย่างที่ทำการศึกษาครั้งนี้พบ 8 ชนิด (ภาพที่ 7) จากตัวอย่างพรรณไม้ทั้งหมด 18 ตัวอย่าง ได้แก่ *Curcuma aeruginosa* Roxb., *C. amada* Roxb., *C. angustifolia* Roxb., *C. comosa* Roxb., *C. longa* L., *C. rubescens* Roxb., *C. zedoaria* (Christm.) Roscoe และ *C. plicata* Wall. (ชนิดนี้จัดเป็น complex species) ที่ต้องศึกษาต่อไป



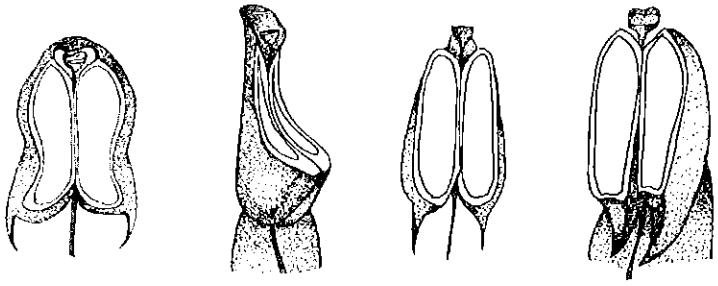
ภาพที่ 4.6 ลักษณะอับเรณูของกลุ่มขมิ้นแท้ (Eucurcuma)
ก. *Curcuma aeruginosa* Roxb. ข. *Curcuma amada* Roxb.
ค. *Curcuma comosa* Roxb. ง. *Curcuma longa* L. จ. *Curcuma rubescens* Roxb.
ฉ. *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe ช. *Curcuma plicata* Wall.

5. กลุ่มบัวชั้น (Petiolata)

ลักษณะโดยทั่วของกลุ่มบัวชั้น มีโคนใบรูปลิ่มกว้าง รูปกลม หรือหัวใจ ใบประดับปลายตัดตรงหรือกลมมน หรือยักเว้า มีลักษณะของอับเรณูที่หลากหลาย มีทั้งเดือยอับเรณูเรียวแหลม เดือยอับเรณูเป็นแท่ง และไม่มีเดือยอับเรณู กลุ่มของบัวชั้นจะมีลักษณะอื่นที่ทำให้จัดกลุ่มอยู่ด้วยกันคือ การเรียงตัวของใบประดับที่เรียงกันเป็นชั้นอย่างเป็นระเบียบ ได้แก่ *Curcuma aurantiaca* Zijp, *C. petiolata* Roxb., *C. roscoeana* Wall., และ *C. rubrobracteata* Škornick., M. Sabu & Prasanthk.

ว QK
711e
J144162
2562

สำนักหอสมุด
05 มี.ค. 2564
103,4665



ภาพที่ 4.7 ลักษณะอับเรณูของกลุ่มบัวชั้น (Petiolata)
ก. *Curcuma rubrobracteata* Škornič., M.S abu & Prasanthk.
ข. *Curcuma roscoeana* Wall. ค. *Curcuma aurantiaca* Zijp
ง. *Curcuma petiolata* Roxb.

ตาราง 4.1 กลุ่มของพืชสกุลขมิ้นที่ศึกษา

กลุ่ม	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย
Alismatifolia 4 ชนิด	*Curcuma alismatifolia* Gagnep.	ปทุมมา
	Curcuma gracillima Gagnep.	กระเจียว
	Curcuma harmandii Gagnep.	ช่อมรกต
	Curcuma parviflora Wall.	กระเจียวหิ่งห้อย
Cochinchinesis 1 ชนิด	*Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep.	มหาอุดมขาว
Ecomata 4 ชนิด	*Curcuma bicolor* Mood & K.Larsen	กระเจียวสองสี
	Curcuma ecomata Craib	กระเจียวสุเทพ
	Curcuma flaviflora S.Q.Tong	กระเจียวเหลือง
	Curcuma glans K.Larsen & Mood	กระเจียว
Eucurcuma 8 ชนิด	*Curcuma aeruginosa* Roxb.	ว่านมหาเมฆ
	Curcuma amada Roxb.	ขมิ้นขาวป่า
	Curcuma angustifolia Roxb.	อาวแดง
	Curcuma comosa Roxb.	ว่าชักมดลูก
	Curcuma longa L.	ขมิ้นชัน
	Curcuma rubescens Roxb.	กระเจียวกาบแดง
	Curcuma zedoaria (Christm.) Roscoe	ขมิ้นอ้อย
	Curcuma plicata Wall.	-
Petiolata 4 ชนิด	*Curcuma aurantiaca* Zijp	ว่านปด
	Curcuma petiolata Roxb.	บัวชั้น
	Curcuma roscoeana Wall.	กระเจียวส้ม
	Curcuma rubrobracteata Škorničk., M. Sabu & Prasanthk.	ว่านงูเห่า

พืชสกุลขมิ้นที่ได้ศึกษาทางสัณฐานวิทยาแล้วนำมาเขียนคำบรรยายลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของของแต่ละชนิด จำนวน 21 ชนิด ดังนี้

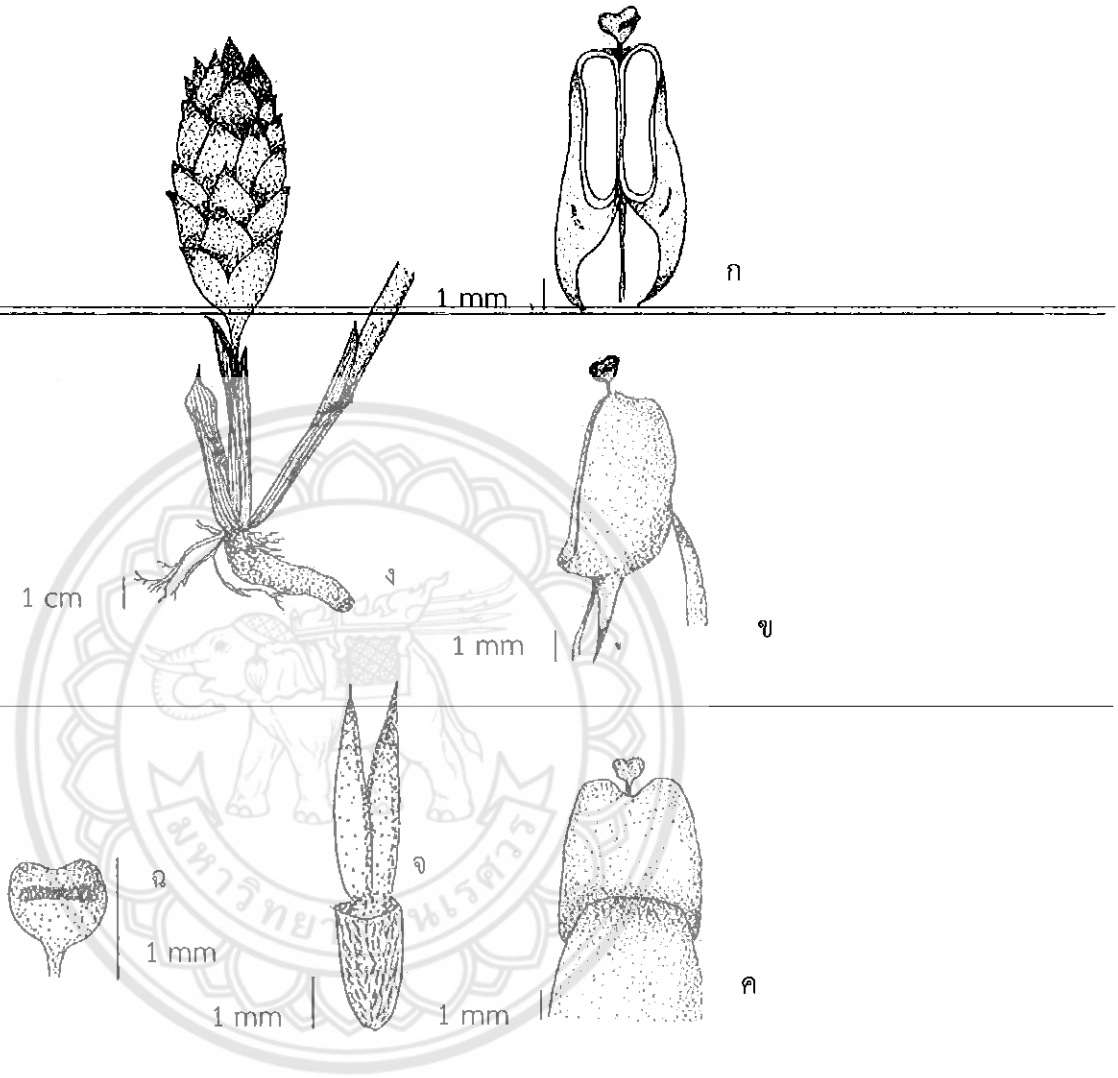
1. *Curcuma aeruginosa* Roxb. ว่านมหาเมฆ

หัว (corm) สั้น ยาว 3-4 เซนติเมตร กว้าง 1-3 เซนติเมตร **เหง้า (rhizome)** สั้น ด้านนอกสีน้ำตาล ด้านในสีครีมอ่อนถึงเหลือง **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 25-50 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปรี ปลายใบเรียวแหลม ฐานใบสอบเรียว ยาว 16-50 เซนติเมตร กว้าง 7-15 เซนติเมตร ก้านใบยาว 5-15 เซนติเมตร แผ่นใบเกลี้ยงทั้งสองด้าน **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดจากเหง้า ยาว 10-15 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) 12-15 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ด้านล่างของช่อดอกสีเขียวมีสีชมพูแต้มขอบแผ่นใบประดับ ด้านบนของช่อดอกส่วนที่เรียกว่า โคม่า (coma bract) สีชมพูถึงแดงเข้ม ปลายใบประดับมน **กลีบเลี้ยง** (calyx) หลอดกลีบเลี้ยงสีขาว พูกลีบเลี้ยงสีม่วงอ่อน **กลีบดอก** (corolla) สีขาว **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีเหลือง **กลีบปาก (labellum)** แผ่นกลีบปากสีเหลืองอ่อน ริ้วด้านในสีแดง กลางแผ่นกลีบปากมีแถบสีเหลืองเข้ม **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูมีเดือยแหลม (anther spur) อับเรณูยาว 6-8 เซนติเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านข้างมีขนครุย กว้าง 1 มิลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ ยาว 5-7 เซนติเมตร รังไข่มีขนปกคลุม ยาว 2-3 มิลิเมตร

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ นิยมปลูกทั่วไปเพื่อใช้เป็นยาสมุนไพร พบทั่วไปในพื้นที่ป่าผลัดใบกระจายพันธุ์บริเวณภาคเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย เช่น จังหวัดเชียงใหม่ และนครนายก เป็นต้น

ประโยชน์ นิยมนำเหง้ามาใช้เป็นยาสมุนไพร โดยใช้เหง้าฝนกับน้ำ ทาแก้บวม เคล็ดยอกตามร่างกาย หรือหั่น ทุบให้แตก ดองสุรารับประทานแก้ปวดมดลูก

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา A. Boonkongchart 209 (CMUB); J.F. Maxwell 04-255 (CMUB); S. Chomjang 1 (CMUB); F. Anderson 5432 (CMUB)



ภาพที่ 4.8 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma aeruginosa* Roxb. (J.F. Maxwell 04-255 (CMUB))
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านข้างของอับเรณู ค. ด้านหลังของอับเรณู
ง. ช่อดอกและการเกิดของช่อดอก จ. รังไข่และต่อมน้ำหวาน ฉ. ยอดเกสรเพศเมีย

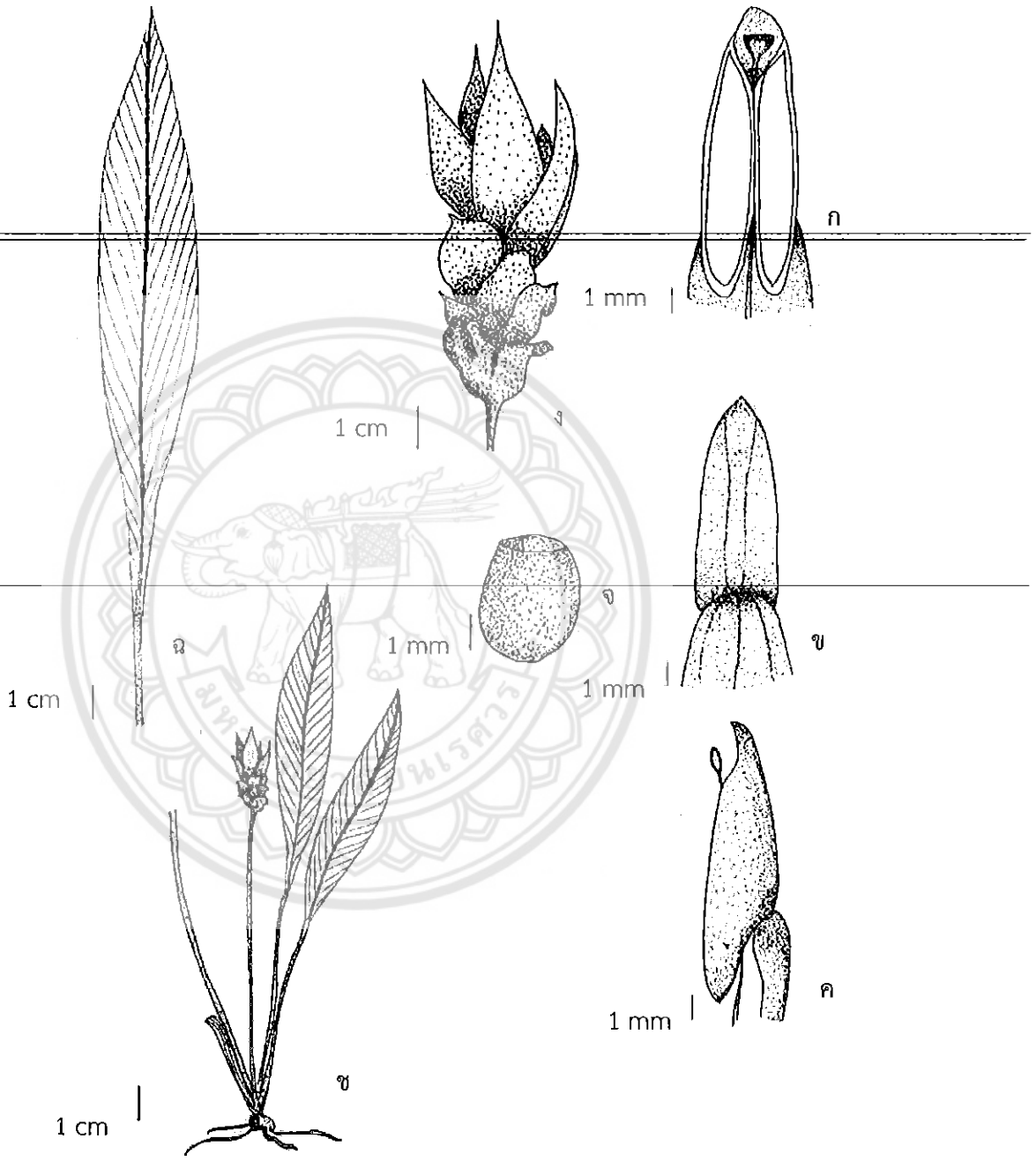
2. *Curcuma alismatifolia* Gagnep. ปทุมมา กระเจียวบัว ขมิ้นโคก

หัว (corm) สั้น ด้านนอกสีน้ำตาล ด้านในสีขาวมีกลิ่น **เหง้า** (rhizome) ยาว 1-3 เซนติเมตร **ลำต้นเหนือดิน** (leafy shoot) สูง 20-40 เซนติเมตร **ใบ** (leaves) แผ่นใบรูปหอกแกมรูปแถบ ปลายใบแหลม ฐานใบสอบเรียว ยาว 20-40 เซนติเมตร กว้าง 3-5 เซนติเมตร กาบใบยาว 10-20 เซนติเมตร ผิวเกลี้ยงทั้ง 2 ด้าน **ช่อดอก** (inflorescence) เกิดจากกลุ่มใบ ยาว 10-15 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) 20-30 เซนติเมตร **ใบประดับ** (bracts) ด้านล่างของช่อดอกสีเขียวปลายมน ด้านบนของช่อดอกหรือโคม่า (coma bract) สีเขียวอ่อนถึงชมพูเข้มปนม่วงอ่อน ปลายแหลมและมีขนาดยาวกว่าใบประดับด้านล่างของช่อดอก **กลีบเลี้ยง** (calyx) สีขาว **กลีบดอก** (corolla) สีขาว **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน** (staminodes) สีขาว **กลีบปาก** (labellum) สีม่วง โคนด้านในสีขาว เกสรเพศผู้ (stamen) สีครีม อับเรณูไม่มีเดือย (anther spur) **อับเรณูยาว** 6-8 เซนติเมตร **เกสรเพศเมีย** (pistil) ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านบนมีขนครุย กว้าง 1 มิลิเมตร ไม่มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) รังไข่ผิวเกลี้ยง ยาว 1 มิลิเมตร

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบแพร่หลายในทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออกของประเทศไทย มักขึ้นบริเวณเปิดโล่ง บริเวณป่าสน ป่าผลัดใบ

ประโยชน์ เนื่องจากดอกมีขนาดเล็ก และสีสันสวยงามจึงนิยมปลูกเป็นไม้ประดับ มีการปรับปรุงพันธุ์อย่างแพร่หลาย ผลิตและส่งออกในชื่อ "Siamse tulip"

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา J.F. Maxwell 09-194 (CMUB)



ภาพที่ 4.9 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma alismatifolia* Gagnep. (J.F. Maxwell 09-194; CMUB) ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านหลังของอับเรณู ค. ด้านข้างของอับเรณู ง. ช่อดอกและใบประดับ จ. รังไข่ ฉ. ลักษณะใบ ช. ช่อดอกและการเกิดของช่อดอก

3. *Curcuma amada* Roxb. ขมิ้นขาวป่า

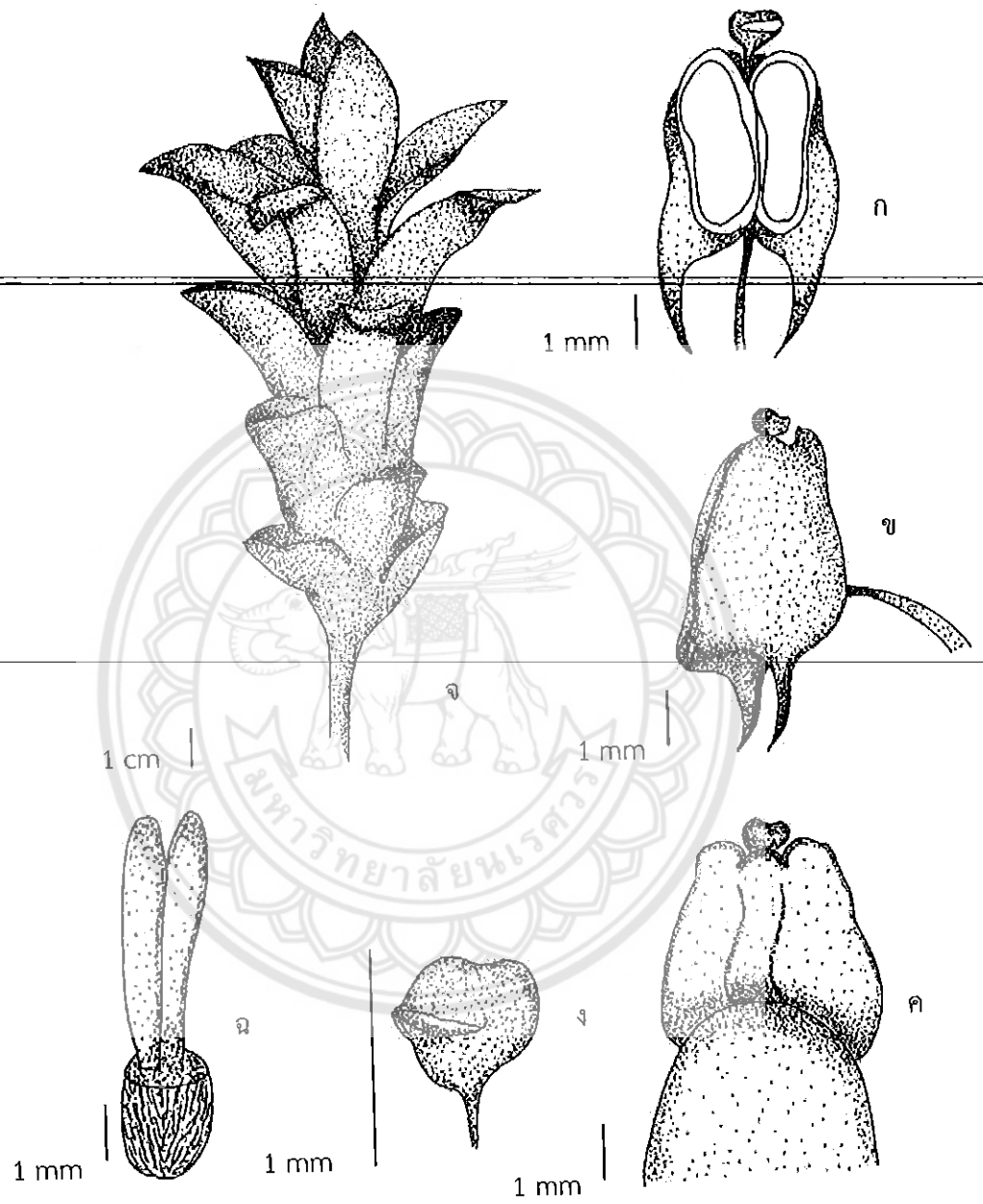
หัว (corm) ยาว 4-8 เซนติเมตร กว้าง 3-8 เซนติเมตร ด้านนอกและด้านในสีเหลืองอ่อน **เหง้า (rhizome)** ยาว 2-4 เซนติเมตร กว้าง 0.5-2 เซนติเมตร **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 50-80 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปหอก ปลายใบเรียวแหลม ฐานใบสอบเรียว ยาว 25-60 เซนติเมตร กว้าง 9-17 เซนติเมตร กาบใบ 15-20 เซนติเมตร ผิวเกลี้ยงทั้ง 2 ด้าน **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดกลางกลุ่มใบ ยาว 10-20 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) 30-50 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ด้านล่างมีขาวปลายแผ่นใบประดับสีเขียว ด้านบนส่วนโคม่า (coma bract) สีขาวปลายแผ่นใบประดับสีชมพู ปลายใบประดับมนกลีบเลี้ยง (calyx) สีขาวโปร่งใส **กลีบดอก (corolla)** สีเหลืองอ่อน **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีเหลืองอ่อน **กลีบปาก (labellum)** สีเหลืองอ่อน มีแถบสีเหลืองเข้มกลางแผ่นกลีบปาก **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูมีเดือยแหลม (anther spur) อับเรณูยาว 7-8 เซนติเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านข้างมีขนครุย กว้าง 1 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ ยาว 4-5 มิลลิเมตร รังไข่มีขนปกคลุม ยาว 2-4 มิลลิเมตร

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบแพร่หลายบริเวณภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในธรรมชาติพบบริเวณป่าผลัดใบ

ประโยชน์ เหง้าสามารถใช้เป็นยาสมุนไพร

หมายเหตุ การศึกษาพืชสกุลขมิ้นชนิดนี้ได้ทำการศึกษาจากตัวอย่างพรรณไม้ที่ได้จากการปลูกบริเวณข้างภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าลักษณะของอับเรณูมีส่วนคล้ายกับ *C. comosa*, *C. rubescens* และ *C. zedoaria* ซึ่งลักษณะของลำต้น บริเวณการเกิดของช่อดอก และสีของใบประดับจะแตกต่างกันออกไป

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา Nungruthai Suphrom 2 (PNU)



ภาพที่ 4.10 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma amada* Roxb. (Nungruthai Suphrom 2 (PNU))
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านข้างของอับเรณู ค. ด้านหลังของอับเรณู ง. ยอดเกสรเพศเมีย
จ. ช่อดอกและใบประดับ ฉ. รังไข่และต่อนน้ำหวาน

4. *Curcuma angustifolia* Roxb. อาวแดง

เหง้า (rhizome) สั้น **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 46-60 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปหอก ปลายใบแหลม ฐานใบสอบเรียว ยาว 15-50 เซนติเมตร กว้าง 3-10 เซนติเมตร กาบใบ 7-15 เซนติเมตร**ช่อดอก (inflorescence)** เกิดจากเหง้า ยาว 10-15 เซนติเมตร ก้านช่อดอก 12-15 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** สีเขียวปนม่วงน้ำตาลเล็กน้อยด้านบนสีขาวปลายแผ่นใบประดับสีชมพู ปลายมน

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบได้ทั่วทุกภาคในประเทศไทย มักขึ้นบริเวณที่โล่งป่านผลัดใบ ทุ่งหญ้าและป่าสน

ประโยชน์ นิยมนำดอกอ่อนมาต้มรับประทานกับน้ำพริก

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา S. Watthana 1971 (CMUB)

ภาพที่ 4.11 รูปวาดการเจริญของช่อดอกแบบเจริญจากเหง้าของ *Curcuma angustifolia* Roxb. (S. Watthana 1971 (CMUB))

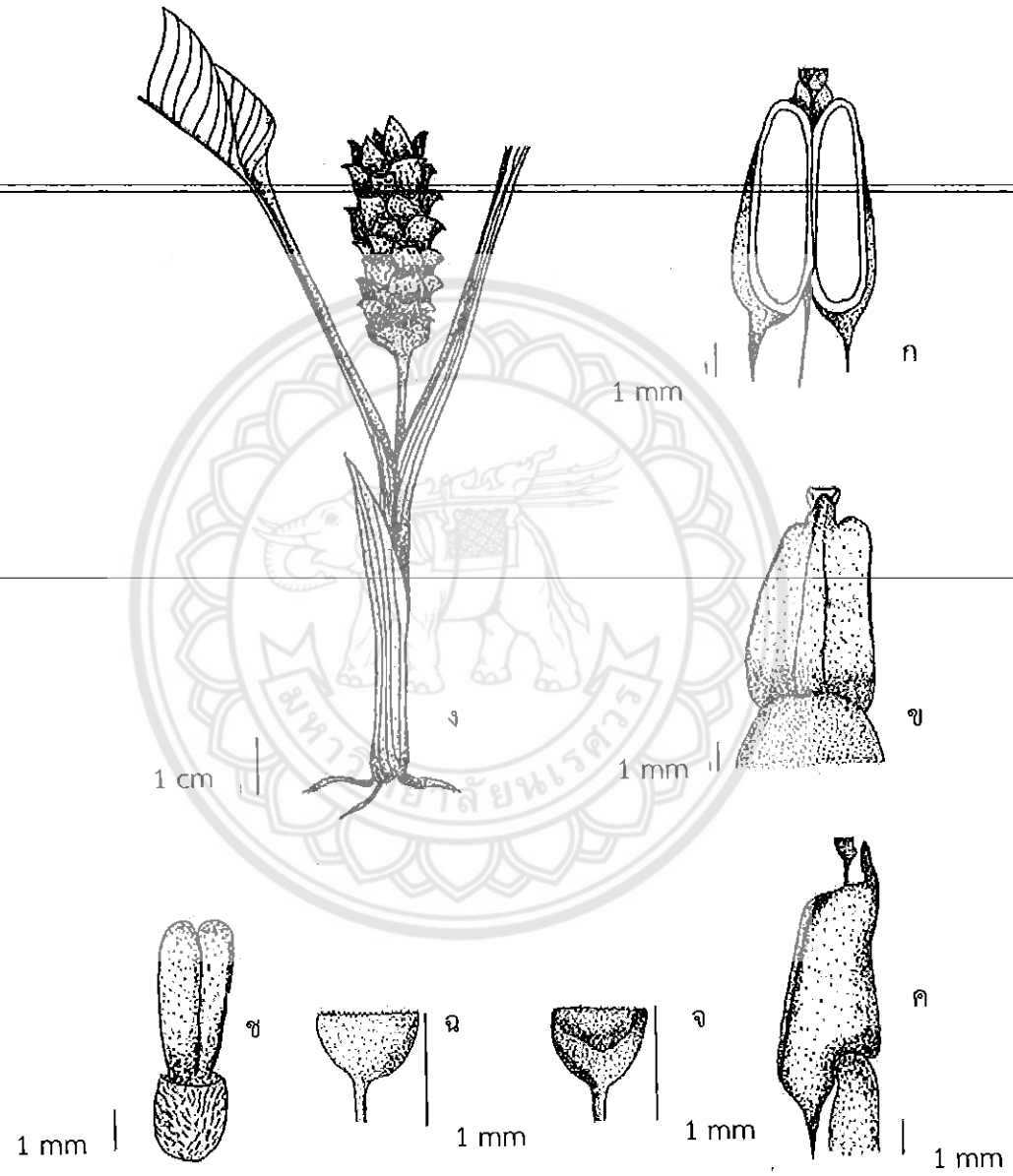
5. *Curcuma aurantiaca* Zijp ว่านปด

หัว (corm) รูปไข่ ด้านนอกสีน้ำตาล ด้านในสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นเล็กน้อย **เหง้า (rhizome)** สั้น **ลำต้นเหนือดิน (Leafy shoot)** สูง 30-40 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปหอก ปลายใบแหลม ฐานใบรูปลิ่ม ยาว 15-40 เซนติเมตร กว้าง 7-15 เซนติเมตร กาบใบ ยาว 16 เซนติเมตร ผิวเกลี้ยงทั้ง 2 ด้าน **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดกลางกลุ่มใบ ยาว 10-16 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) 10-15 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ด้านล่างสีเขียวอมส้ม มักมีปลายแผ่นใบประดับสีส้มหรือแดง ส่วนที่เป็นโคม่า (coma bract) สีชมพู ปลายใบประดับมน **กลีบเลี้ยง (calyx)** สีขาว **กลีบดอก (corolla)** สีขาว **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีขาว **กลีบปาก (labellum)** สีเหลืองเข้ม **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูมีจงอย (anther crest) และเดือยแหลม (anther spur) ความยาวของอับเรณู 7-8 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านบนด้านหลังเว้า กว้าง 1 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ 4 ยาว 4-7 มิลลิเมตร **รังไข่** มีขนปกคลุม ยาว 2-3 มิลลิเมตร

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบบริเวณพื้นที่เปิดโล่ง ป่าดิบชื้น มักกระจายพันธุ์แพร่หลายบริเวณภาค ใต้ของประเทศไทย เช่นจังหวัดตรัง

ประโยชน์ -

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา J.F. Maxwell 07-528 (CMUB)



ภาพที่ 4.12 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma aurantiaca* Zijp (J.F. Maxwell 07-528 (CMUB))
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านหลังของอับเรณู ค. ด้านข้างของอับเรณู
ง.ช่อดอกและการเกิดของช่อดอก จ. ด้านหลังของยอดเกสรเพศเมีย
ฉ. ด้านหน้าของยอดเกสรเพศเมีย ช. รังไข่และต่อมน้ำหวาน

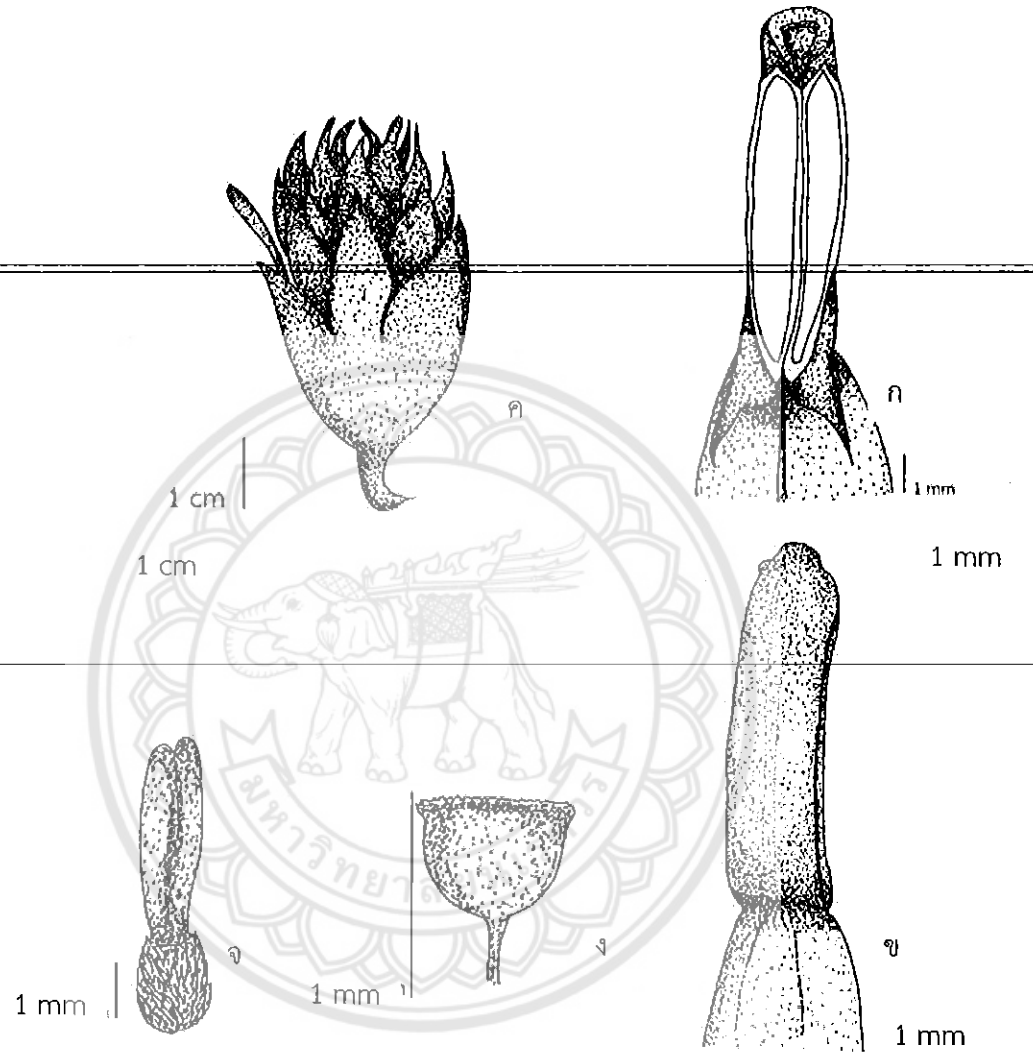
6. *Curcuma bicolor* Mood & K. Larsen กระเจียวเหลืองแดง

หัว (corm) ด้านนอกสีเหลืองเข้ม หรือน้ำตาล ด้านในสีเขียวอ่อน ไม่มีกลิ่น **เหง้า** (rhizome) **สั้นลำต้นเหนือดิน** (leafy shoot) สูง 20-50 เซนติเมตร มีขน **ใบ** (leaves) แผ่นใบรูปหอก ปลายใบแหลม ฐานใบป้านมน ยาว 12-30 เซนติเมตร กว้าง 8-12 เซนติเมตร กาบใบ ยาว 5-15 เซนติเมตร **ช่อดอก** (inflorescence) เกิดกลางกลุ่มใบ ยาว 7-20 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) ยาว 4-10 เซนติเมตร **ใบประดับ** (bracts) สีเขียวอ่อนถึงส้มแดงปนริ้วสีแดงเข้ม ปลายแผ่นใบประดับปลายแหลม **กลีบเลี้ยง** (calyx) สีแดงสด **กลีบดอก** (corolla) หลอดกลีบดอกสีแดง พูกลีบดอกด้านนอกสีแดง ด้านในสีแดงอ่อน **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน** (staminodes) ด้านล่างสีแดง ด้านบนสีส้ม กลีบปาก (labellum) ด้านล่างสีแดง ด้านบนของแผ่นกลีบปากสีเหลือง **เกสรเพศผู้** (stamen) อับเรณูมีเดือยแหลม (anther spur)ความยาวของอับเรณู 8-14 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย** (pistil) ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านบน กว้าง 1 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน 1 คู่ ยาว 4-6 เซนติเมตร รังไข่มีขนปกคลุมยาว 2-3 มิลลิเมตร

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ เป็นพืชถิ่นเดียว (endemic) ของประเทศไทย พบทางภาคเหนือที่จังหวัดเชียงใหม่ และแม่ฮ่องสอน

ประโยชน์ -

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา M. Van de Bult 1074 (CMUB); M. Van de Bult 1182 (CMUB); P. Palee 223 (CMUB)



ภาพที่ 4.13 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma bicolor* Mood & K. Larsen (P. Palee 223 (CMUB))
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านหลังของอับเรณู ค. ช่อดอกและใบประดับ ง. ยอดเกสรเพศเมีย
จ. รังไข่และต่อมน้ำหวาน

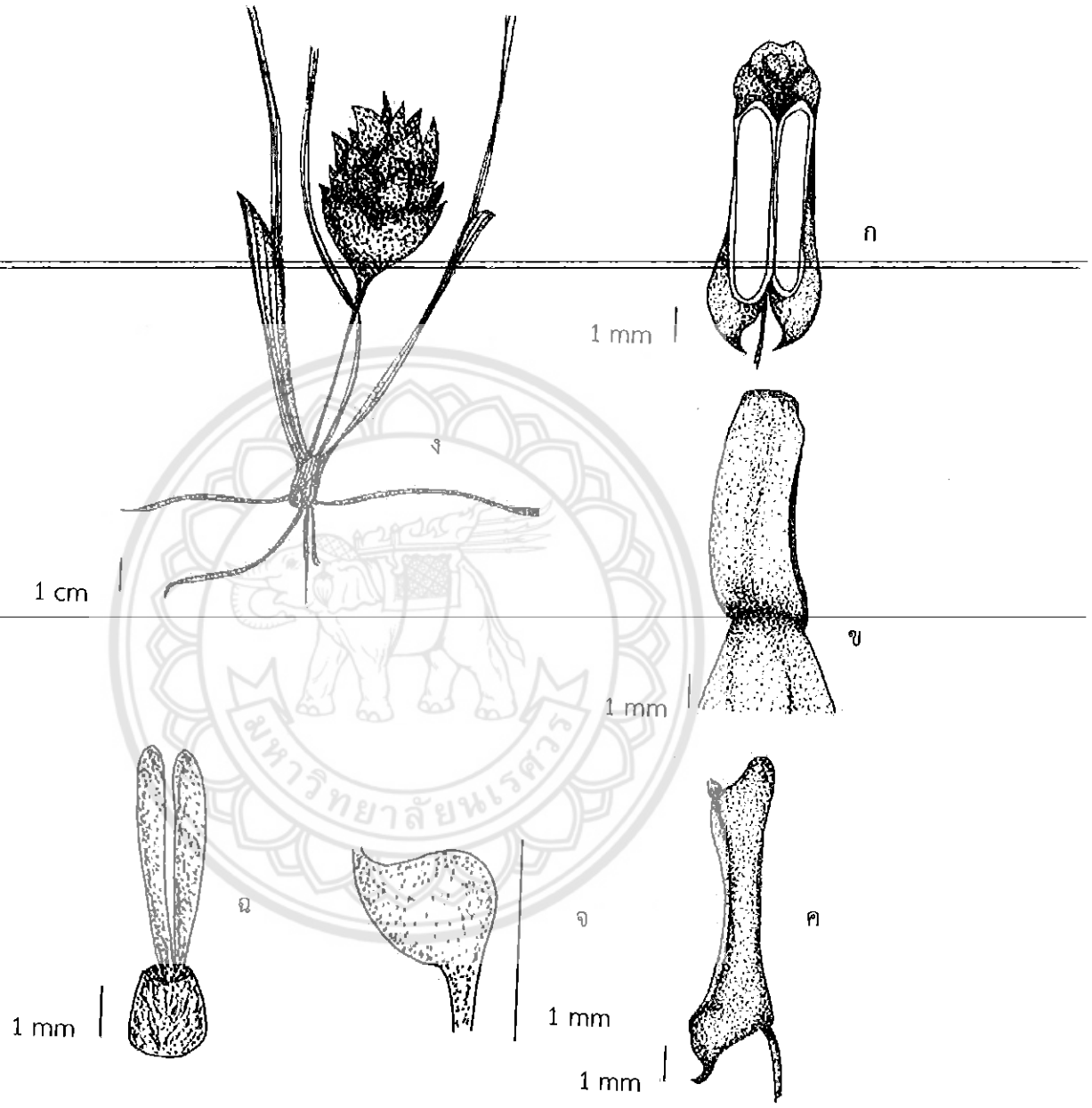
7. *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep. มหาอุดมขาว

หัว (corm) รูปไข่ ด้านนอกสีน้ำตาล ด้านในสีครีม มีกลิ่นเล็กน้อย **เหง้า** (rhizome) สั้น **ลำต้นเหนือดิน** (leafy shoot) สูง 15-50 เซนติเมตร **ใบ** (leaves) แผ่นใบรูปหอก ปลายใบแหลม ฐานใบสอบเรียว ยาว 12-40 เซนติเมตร กว้าง 6-25 เซนติเมตร กาบใบยาว 3-25 เซนติเมตร **ช่อดอก** (inflorescence) เกิดกลางกลุ่มใบ ยาว 4-11 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) 3-12 เซนติเมตร **ใบประดับ** (bracts) สีขาวปนแดงเป็นเส้นตามแนวเส้นของแผ่นใบประดับ ปลายมนถึงปลายแหลม ซึ่งลักษณะเหล่านี้สามารถแปรผันได้ **กลีบเลี้ยง** (calyx) สีขาว **กลีบดอก** (corolla) สีขาว **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน** (staminodes) สีเหลืองอ่อนถึงขาว **กลีบปาก** (labellum) แผ่นกลีบปากสีขาว มีแถบสีเหลืองตามแนวเส้นกลางแผ่นกลีบปาก **เกสรเพศผู้** (stamen) อับเรณูมีเดือย (anther spur) ความยาวของอับเรณู 6-10 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย** (pistil) ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านบน กว้าง 1 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ ยาว 4-8 มิลลิเมตร **รังไข่**มีขนปกคลุม ยาว 2-3 มิลลิเมตร

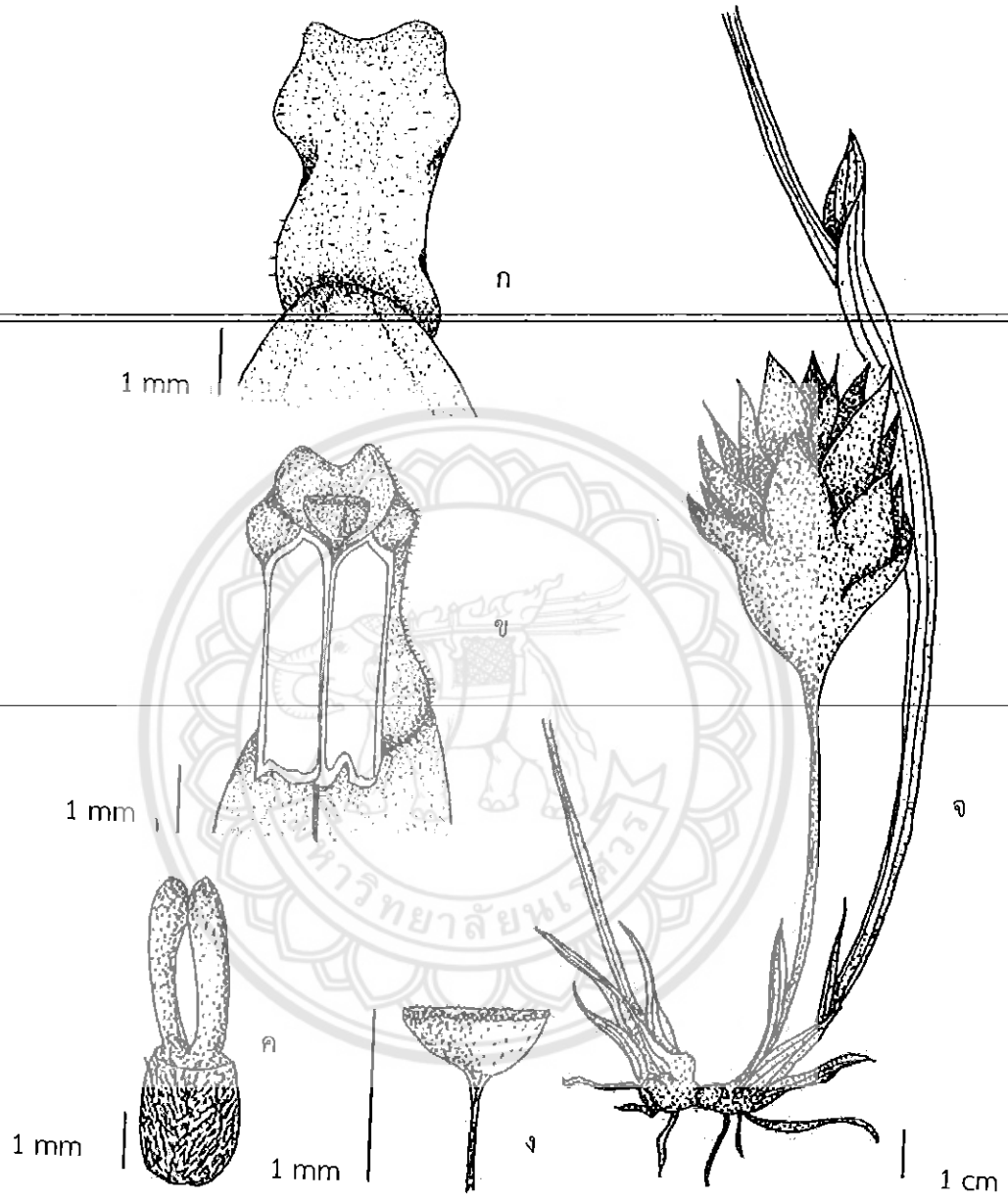
นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบบริเวณป่าผสม ป่าดิบชื้น ภาคเหนือของประเทศพบบริเวณจังหวัด กำแพงเพชร ตาก ภาคตะวันตก จังหวัด กาญจนบุรี ราชบุรี ปราจีนบุรี เป็นต้น

ประโยชน์ -

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา J.F. Maxwell 90-612 (CMUB); J.F. Maxwell 91-498 (CMUB); J.F. Maxwell 92-469 (CMUB); J.F. Maxwell 93-689 (CMUB); J.F. Maxwell 96-1213 (CMUB); S. Chongko 529 (CMUB)



ภาพที่ 4.14 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep. (S. Chongko 529 (CMUB))
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านหลังของอับเรณู ค. ด้านข้างของอับเรณู
ง. ช่อดอกและการเกิดของช่อดอก จ. ยอดเกสรเพศเมีย ฉ. รังไข่และต่อมน้ำหวาน



ภาพที่ 4.15 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep. (J.F. Maxwell 93-689 (CMUB)) ก. ด้านหลังของอับเรณู ข. ด้านหน้าของอับเรณู ค. รังไข่และต่อมน้ำหวาน ง. ยอดเกสรเพศเมีย จ. ช่อดอกและการเกิดของดอก

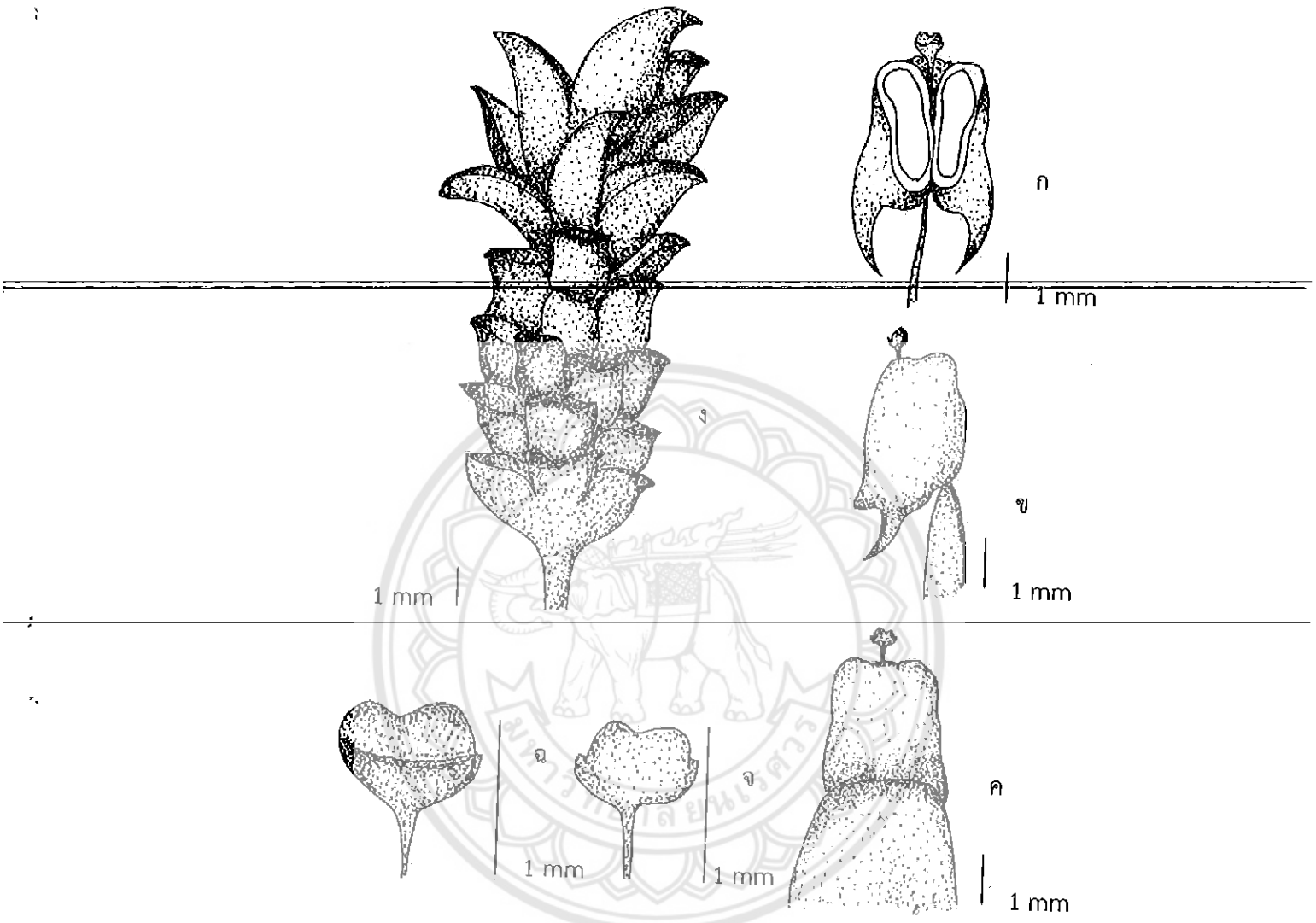
8. *Curcuma comosa* Roxb. **ชื่อพื้นเมือง** ว่านชักมดลูก

หัว (corm) รูปไข่ ยาว 6-8 เซนติเมตร กว้าง 5-10 เซติเมตร **เหง้า (rhizome)** ยาว 6-10 เซนติเมตร ภายในสีน้ำตาลอ่อนถึงขาว **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 60-100 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูรี ปลายใบเรียวแหลม ฐานใบสอบเรียว ยาว 30-60 เซนติเมตร กว้าง 20-25 เซนติเมตร กาบใบยาว 15-30 เซนติเมตร ผิวใบเกลี้ยงทั้งสองด้าน **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดจากเหง้า ยาว 15-25 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) ยาว 10-15 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ด้านล่างสีขาวมีแต้มสีชมพูหรือสีเขียวส่วนปลาย ด้านบนส่วนโคม่า (coma bract) สีขาวมักมีสีชมพูส่วนปลายหรือขาวปนชมพู แผ่นใบประดับปลายมน **กลีบเลี้ยง (calyx)** สีครีม **กลีบดอก (corolla)** สีขาว **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีขาว **กลีบปาก (labellum)** สีขาว มีแถบสีเหลืองบริเวณเส้นกลางแผ่นกลีบปาก **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูมีเดือยอับเรณูแหลม (anther spur) อับเรณูยาว 6-10 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านข้าง กว้าง 0.5-1 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ ยาว 4-7 มิลลิเมตร รังไข่มีขนปกคลุม ยาว 2-3 มิลลิเมตร

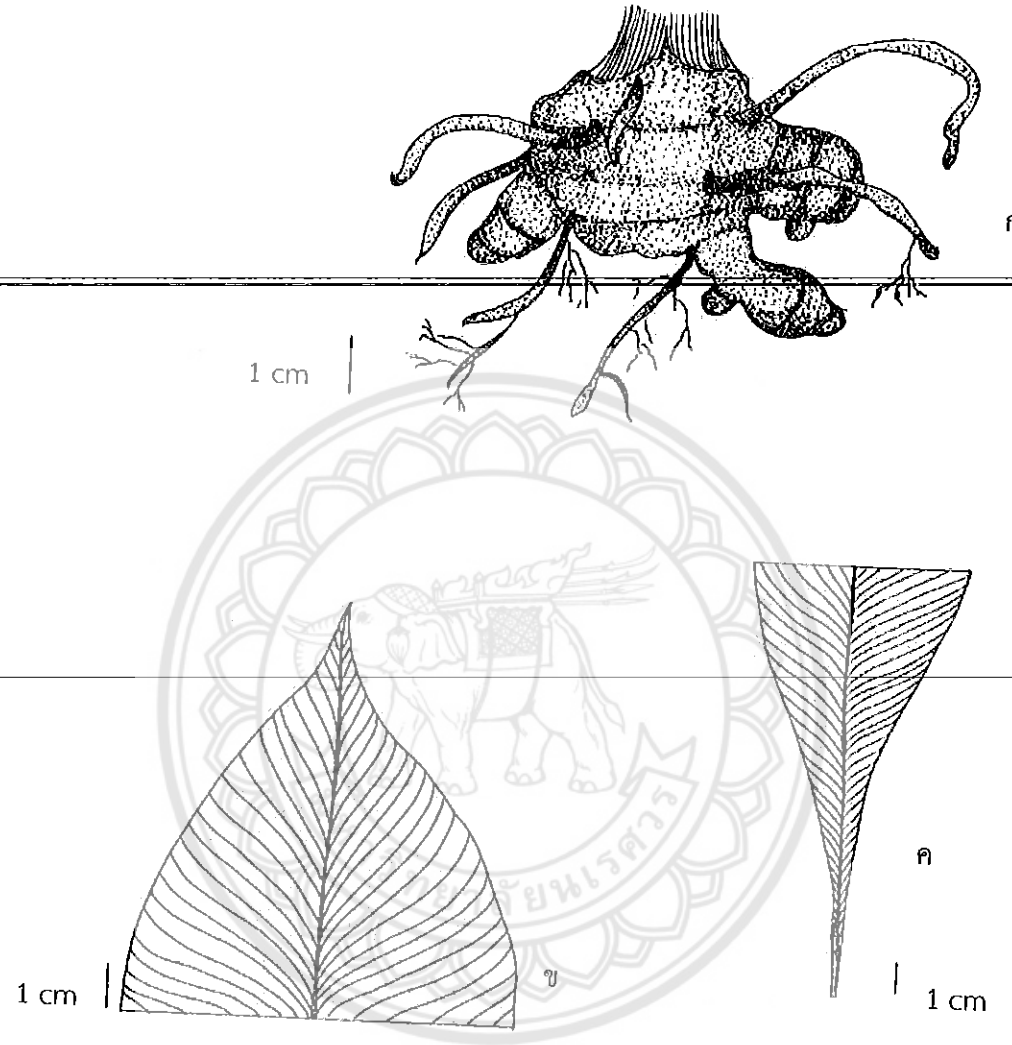
นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบบริเวณป่าผลัดใบ ป่าไผ่ พบมากในจังหวัดพิษณุโลก **นิยมปลูกเพื่อใช้เป็นสมุนไพร**

ประโยชน์ ใช้เหง้าแก้อาการประจำเดือนมาไม่ปกติ บรรเทาอาการปวดท้องประจำเดือนอย่างรุนแรงให้ดีขึ้น รวมถึงช่วยแก้อาการตกขาวได้

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา Nungruthai Suphrom 4 (PNU)



ภาพที่ 4.16 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma comosa* Roxb. (Nungruthai Suphrom 4 (PNU))
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านข้างของอับเรณู ค. ด้านหลังของอับเรณู
ง. ช่อดอกและใบประดับ จ.ด้านหลังของเกสรเพศเมีย ฉ. ด้านหน้าของอับเรณู



ภาพที่ 4.17 ลักษณะใบและไรโซม *Curcuma comosa* Roxb. (Nungruthai Suphrom 4 (PNU)) ก. เหง้า (primary rhizome) ข. ปลายใบเรียวแหลม (acuminate) ค. ฐานใบสอบเรียว (attenuate)

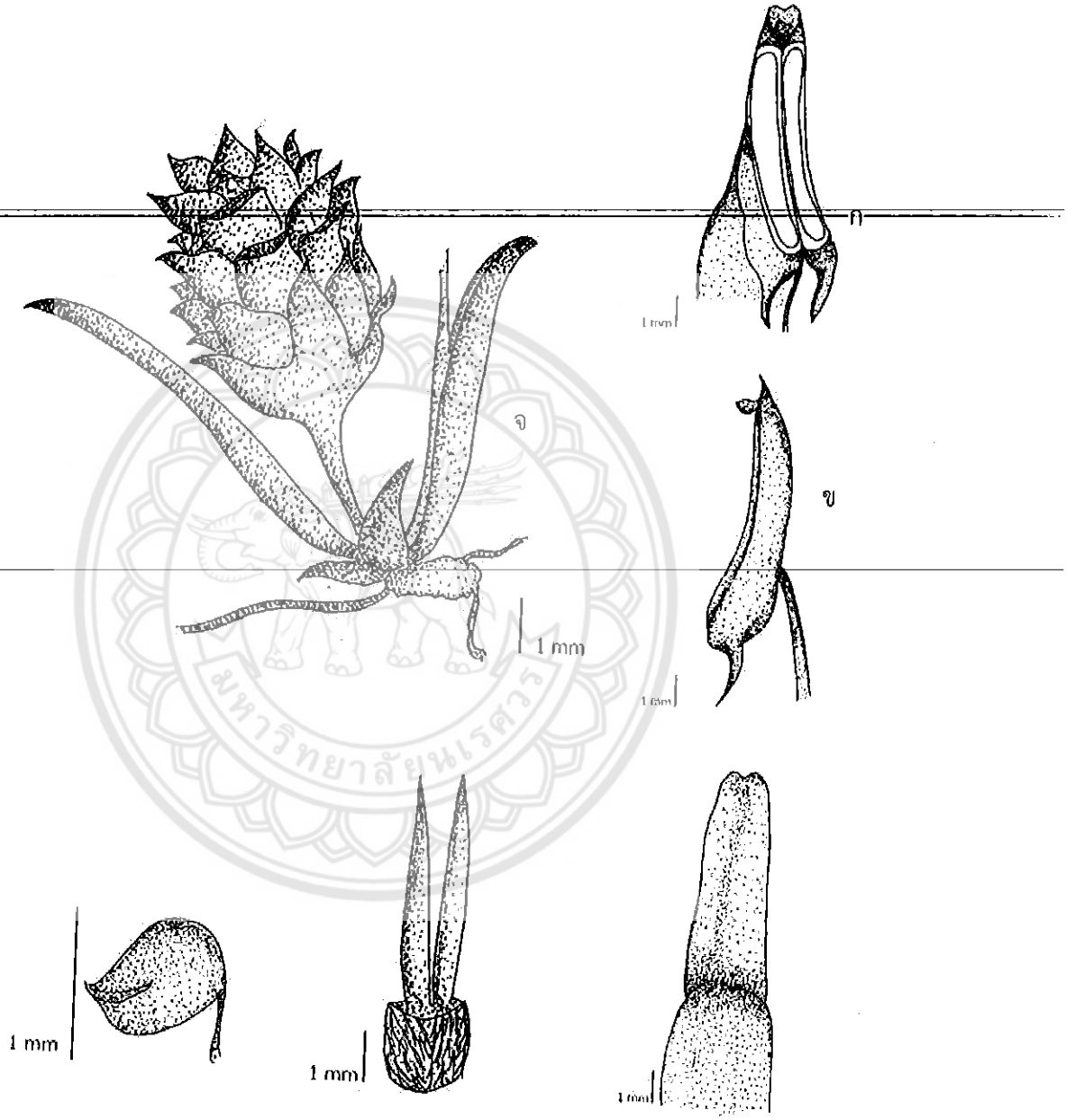
9. *Curcuma ecomata* Craib กระเจียวสุเทพ

หัว (corm) รูปไข่ ด้านนอกสีน้ำตาล ด้านในมีกลิ่น ยาว 3-5 เซนติเมตร กว้าง 3-7 เซนติเมตร **เหง้า (rhizome)** สั้น ภายในสีน้ำตาลอ่อน **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 10-30 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปขอบขนาน ปลายใบแหลม ฐานใบรูปลิ่ม ยาว 15-40 เซนติเมตร กว้าง 5-10 เซนติเมตร กาบใบยาว 6-30 เซนติเมตร **ช่อดอก (inflorescence)** ช่อดอกเกิดจากเหง้า ยาว 6-10 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) 3-9 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ด้านล่างสีเขียวอ่อน เกือบขาว ด้านบนเขียวปนม่วงอ่อน ไม่มีส่วนโคม่า (coma bract) ปลายแหลม **กลีบเลี้ยง (calyx)** สีขาวโปร่งใส **กลีบดอก (corolla)** ด้านล่างของกลีบดอกสีขาว ด้านบนสีม่วงอ่อนถึงม่วงเข้ม **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีขาวถึงม่วงอมแดง **กลีบปาก (labellum)** ด้านในของแผ่นกลีบขาว แผ่นกลีบปากสีม่วง มีแถบสีเหลืองตามแนวเส้นกลางแผ่นกลีบปาก **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูมีเดือยแหลม (anther spur) อับเรณูยาว 10-12 เซนติเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านบน กว้าง 1 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ ยาว 5-8 มิลลิเมตร รังไข่มีขนหรือมีขนปกคลุม ยาว 2-4 เซนติเมตร

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบบริเวณป่าผลัดใบ และป่าดิบแล้ง ส่วนมากพบทางภาคเหนือของประเทศไทย บริเวณจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน

ประโยชน์ -

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา J.F. Maxwell 95-495 (CMUB); J.F. Maxwell 95-462 (CMUB); J.F. Maxwell 97-539 (CMUB); J.F. Maxwell 93-538 (CMUB); J.F. Maxwell 05-350 (CMUB); J.F. Maxwell 98-565 (CMUB); A. Phuakam 28 (CMUB); W. Sankamethawee 220 (CMUB)



ภาพที่ 4.18 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma ecomata* Craib (J.F. Maxwell 97-539 (CMUB))
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านข้างของอับเรณู ค. ด้านหลังของอับเรณู
ง. รังไข่และต่อมน้ำหวาน จ. ช่อดอกและการเกิดของช่อดอก ฉ. ยอดเกสรเพศเมีย

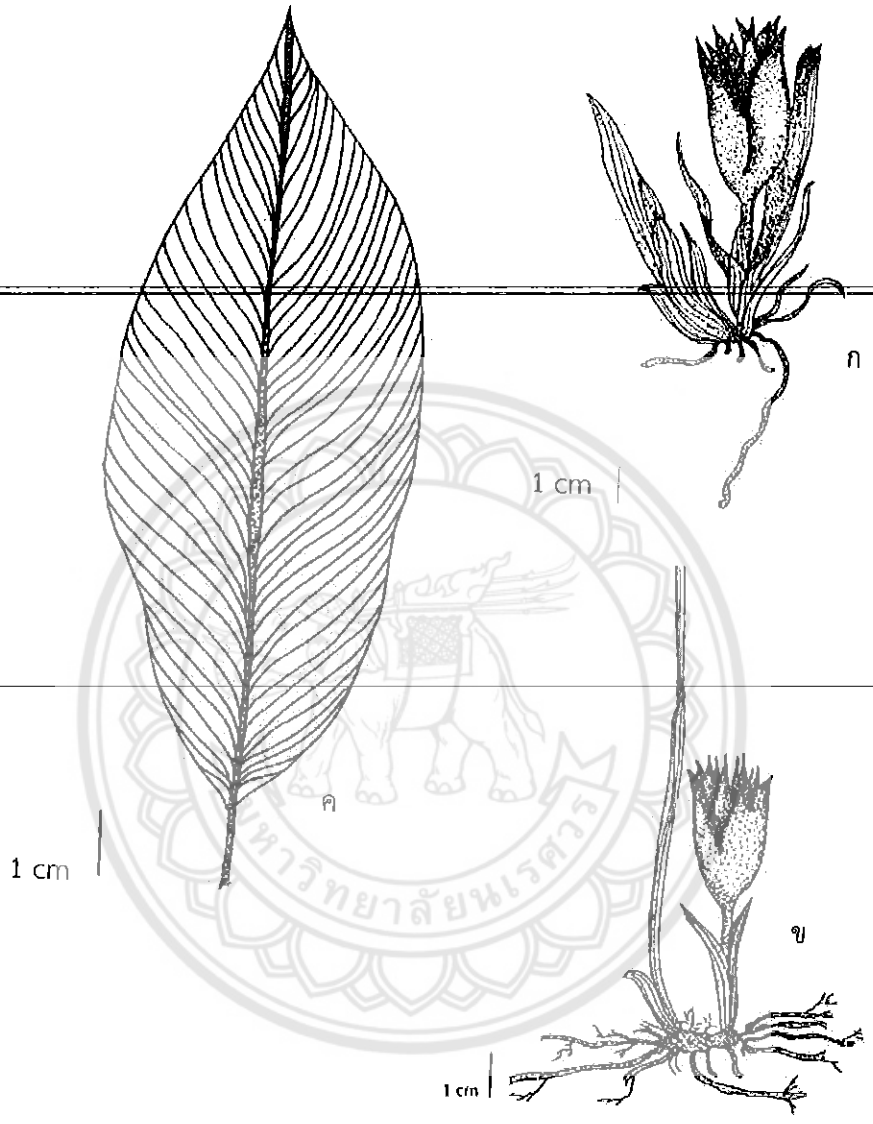
10. *Curcuma flaviflora* S.Q. Tong กระเจียวเหลือง

หัว (corm) ด้านนอกสีน้ำตาล ด้านในสีขาวครีม มีกลิ่นเล็กน้อย **เหง้า** (rhizome) สั้น **ลำต้นเหนือดิน** (leafy shoot) สูง 20-30 เซนติเมตร **ใบ** (leaves) แผ่นใบรูปหอก ปลายแหลม ฐานใบรูปลิ่ม ยาว 20-25 เซนติเมตร กว้าง 7-9 เซนติเมตร **ก้านใบ**ยาว 5-15 เซนติเมตร ด้านหน้าของแผ่นใบเกลี้ยง ด้านหลังมีผลปกคลุม **ช่อดอก** (inflorescence) เกิดจากเหง้า ยาว 4-7 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) 5-10 เซนติเมตร **ใบประดับ** (bracts) สีแดงปนเขียว ไม่มีส่วนโคม่า (coma bract) ปลายแหลม **กลีบเลี้ยง** (calyx) สีขาว **กลีบดอก** (corolla) สีขาว **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน** (staminodes) สีเหลืองอ่อน **กลีบปาก** (labellum) สีเหลืองอ่อน มีแถบสีเหลืองส้มตามแนวเส้นกลางแผ่นกลีบปาก บางครั้งมีริ้วสีแดงด้านในของกลีบปาก

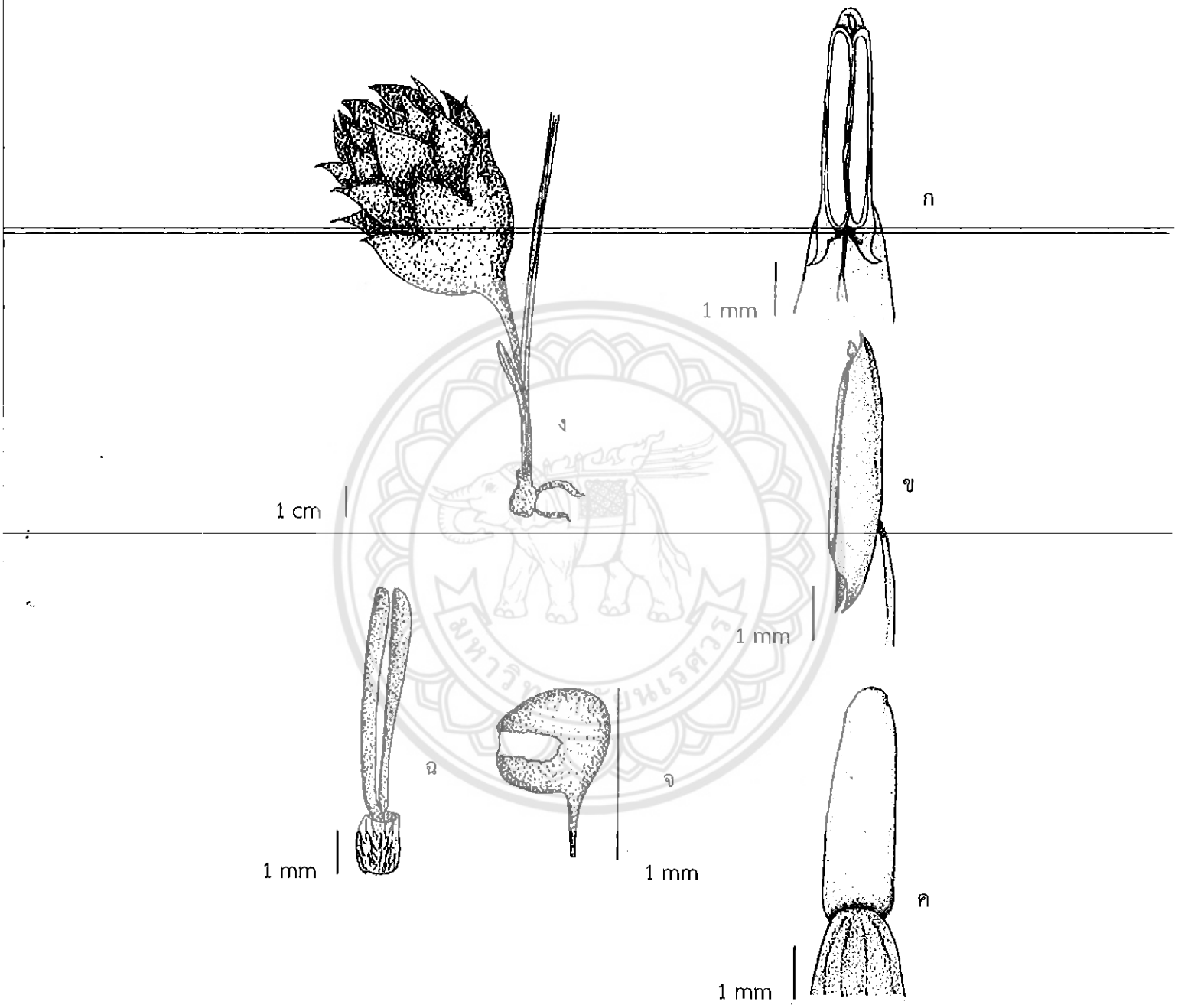
นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบบริเวณพื้นที่โล่ง และป่าสน กระจายพันธุ์อย่างแพร่หลายทางภาคเหนือของประเทศไทย

ประโยชน์ -

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา P. Srisanga 2979 (CMUB); J.F. Maxwell 06-363 (CMUB)



ภาพที่ 4.19 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma flaviflora* S.Q.Tong
ก. ช่อดอกและใบประดับ (P. Srisanga 297 1 cm)
ข. ช่อดอกและใบประดับ (J.F. Maxwell 06-363 (CMUB))
ค. ลักษณะใบ (J.F. Maxwell 06-363 (CMUB))



ภาพที่ 4.20 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma glans* K. Larsen & Mood (J.F. Maxwell 96-514 (CMUB)) ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านข้างของอับเรณู ค. ด้านหลังของอับเรณู ง. ช่อดอกและการเกิดของช่อดอก จ. ยอดเกสรเพศเมีย ฉ. รังไข่และต่อมน้ำหวาน

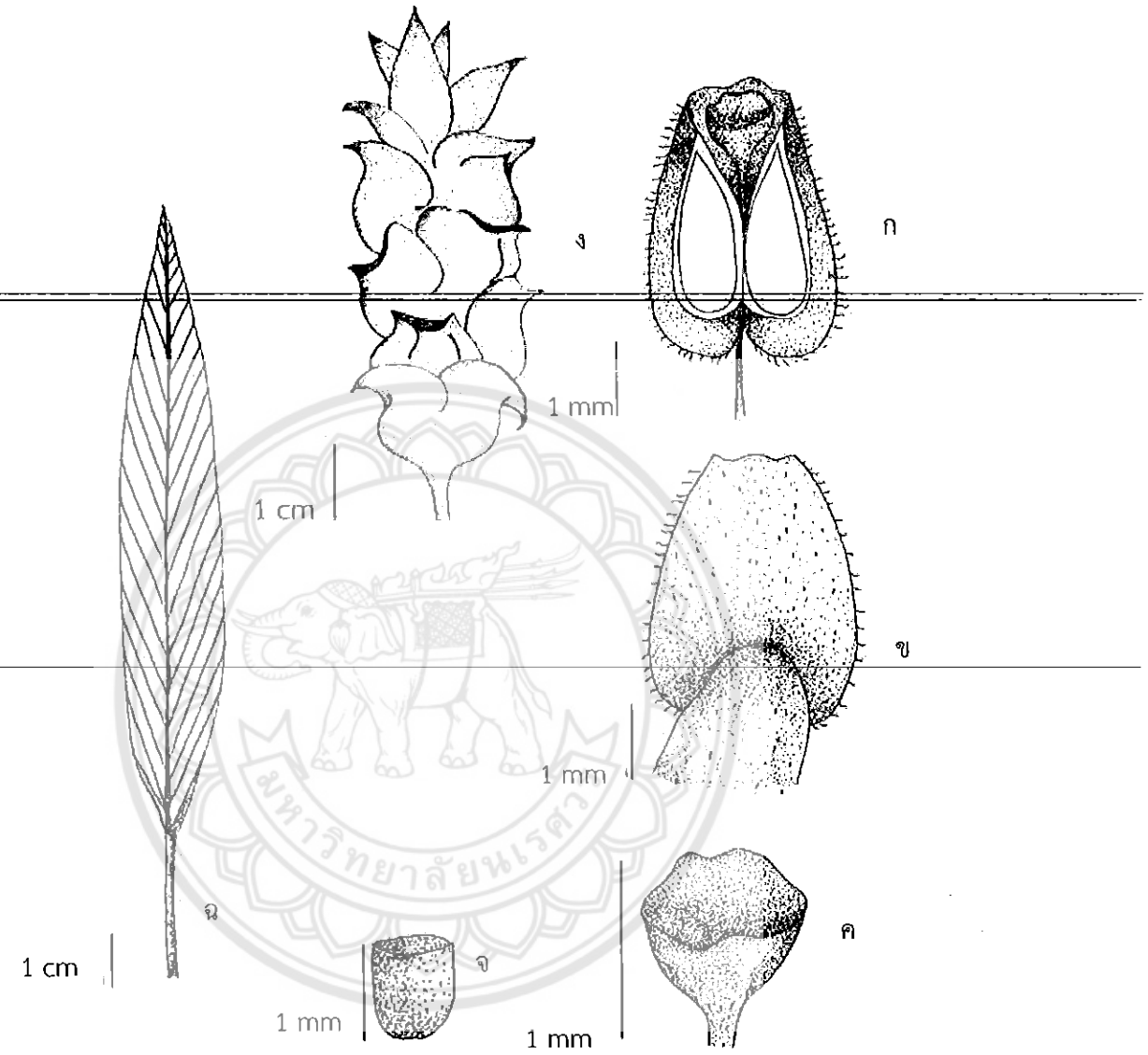
12. *Curcuma gracillima* Gagnep. **ชื่อพื้นเมือง** กระเจียว

หัว (corm) รูปไข่ขนาดเล็ก ยาว 0.5-3 เซนติเมตร กว้าง 1-3 เซนติเมตร **เหง้า (rhizome)** สั้น ภายในสีน้ำตาลอ่อน **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 10-30 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปแถบ ปลายใบแหลม ฐานใบรูปลิ่ม ยาว 6-20 เซนติเมตร กว้าง 0.5-3 เซนติเมตร กาบใบยาว 2-7 เซนติเมตร ผิวใบเกลี้ยงทั้ง 2 ด้าน **ช่อดอก (inflorescence)** ช่อดอกเกิดกลางกลุ่มใบ ขนาดเล็ก ยาว 1-5 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) ยาว 7-25 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ด้านล่างสีเขียว ด้านบนส่วนโคม่า (coma bract) สีขาว ปลายแหลมหรือมนกลม **กลีบเลี้ยง (calyx)** สีขาว **กลีบดอก (corolla)** หลอดกลีบดอกสีขาว พูกลีบดอกสีเขียวอ่อน **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีน้ำตาลอ่อน **กลีบปาก (labellum)** แผ่นกลีบปากสีส้มถึงน้ำตาลอ่อน ขอบหยักเป็นคลื่นสีม่วงเข้ม ปลายแยกเป็นแฉกลึกเกือบถึงฐาน **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูไม่มีเดือย (anther spur) ขนสั้นปกคลุมยาว 2-3 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย(stigma) เปิดด้านบน ขนาด 0.5-1 x 0.5 มิลิเมตร ไม่มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) **รังไข่**ผิวเกลี้ยงยาว 2 มิลลิเมตร

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบบริเวณป่าผลัดใบ มักกระจายพันธุ์บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคกลาง ของประเทศไทย

ประโยชน์ -

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา J.F. Maxwell 07-520 (CMUB); J.F. Maxwell 98-896 (CMUB)



ภาพที่ 4.21 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma gracillima* Gagnep. (J.F. Maxwell 98-896 (CMUB))
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านหลังของอับเรณู ค. ยอดเกสรเพศเมีย ง. ช่อดอกและใบประดับ
จ. รังไข่ ฉ. ลักษณะใบ

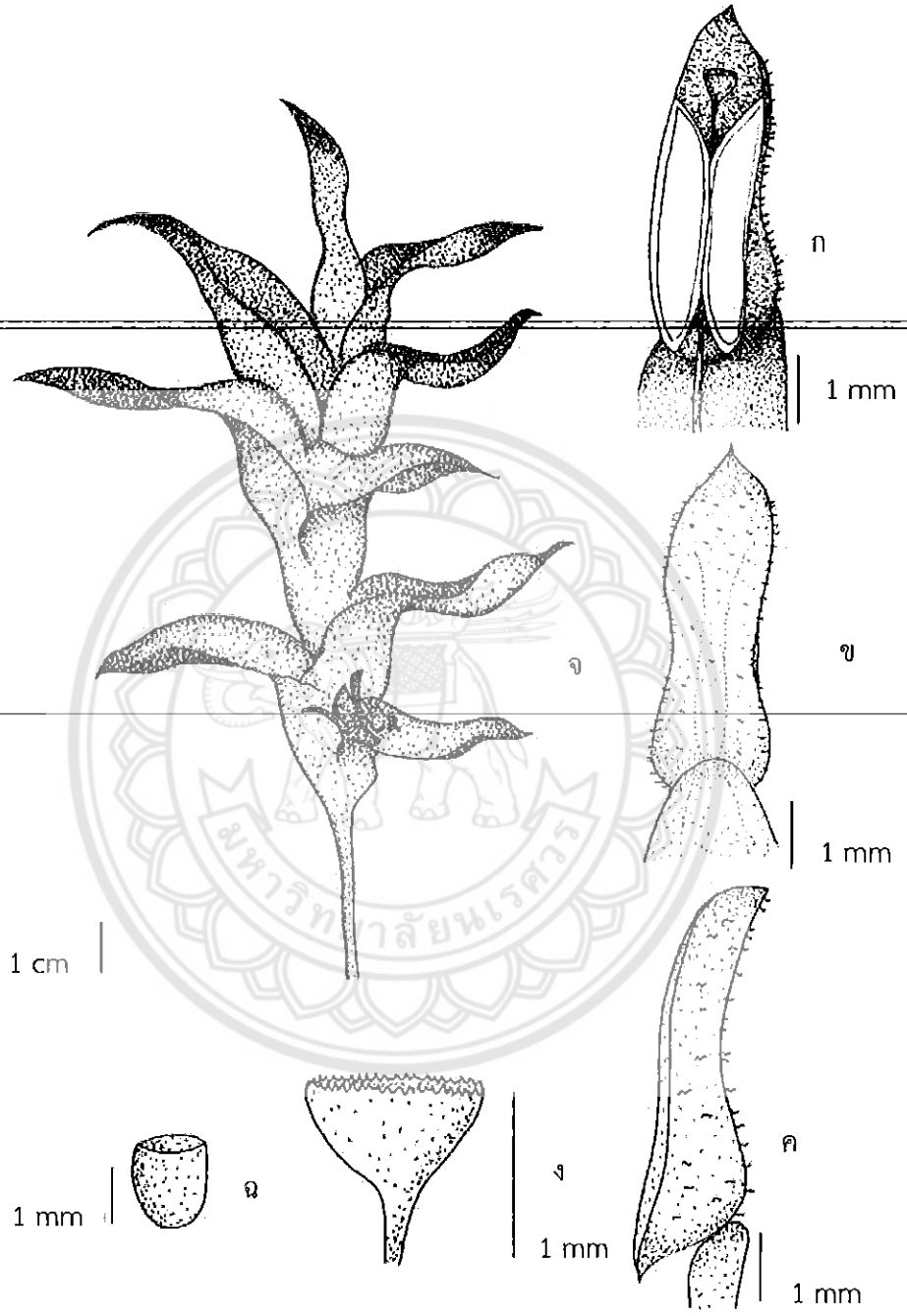
13. *Curcuma harmandii* Gagnep. ช่อมรกต

หัว (corm) รูปไข่ ยาว 2-5 เซนติเมตร กว้าง 2-3 เซนติเมตร ด้านนอกสีน้ำตาล ด้านในสีเขียวอ่อนถึงขาว **เหง้า (rhizome)** สั้น **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 20-40 เซติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปหอก ปลายใบเรียวแหลม ฐานใบรูปลิ่ม ยาว 25-30 เซนติเมตร กว้าง 8-10 เซนติเมตร กาบใบยาว 10-15 เซนติเมตร ผิวเกลี้ยงทั้ง 2 ด้าน **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดกลางกลุ่มใบ ยาว 14-20 เซนติเมตร ก้านช่อดอก(scape) ยาว 20-30 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ลักษณะปลายยาวแหลมเรียงซ้อนกันเป็นชั้นมักตั้งฉากกับแกนช่อดอก สีเขียว ไม่มีส่วนโคม่า (coma bract)-**กลีบเลี้ยง (calyx)**-สีขาวโปร่งใส-**กลีบดอก (corolla)**-หลอดกลีบดอกสีขาว-พูกลีบดอกสีเขียวอ่อน **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีเขียงอ่อนถึงขาว **กลีบปาก (labellum)** แผ่นกลีบปากสีขาว มีแถบสีเหลืองตามแนวเส้นกลางกลีบปาก **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูไม่มีเดือย (anther spur) ยาว 5 มิลลิเมตร มีขนปกคลุม **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านบน ไม่มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) รังไข่ผิวเกลี้ยง ยาว 1-2 มิลลิเมตร

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบบริเวณป่าผลัดใบ ป่าดิบแล้ง มักกระจายพันธุ์ ทางภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงใต้ และภาคกลาง ของประเทศไทย

ประโยชน์ -

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา J.F. Maxwell 05-413 (CMUB)



ภาพที่ 4.22 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma harmandii* Gagnep. (J.F. Maxwell 05-413 (CMUB)) ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านหลังของอับเรณู ค. ด้านข้างของอับเรณู ง. ยอดเกสรเพศเมีย จ. ช่อดอกและใบประดับ ฉ. รังไข่

14. *Curcuma longa* L. ขมิ้นชัน

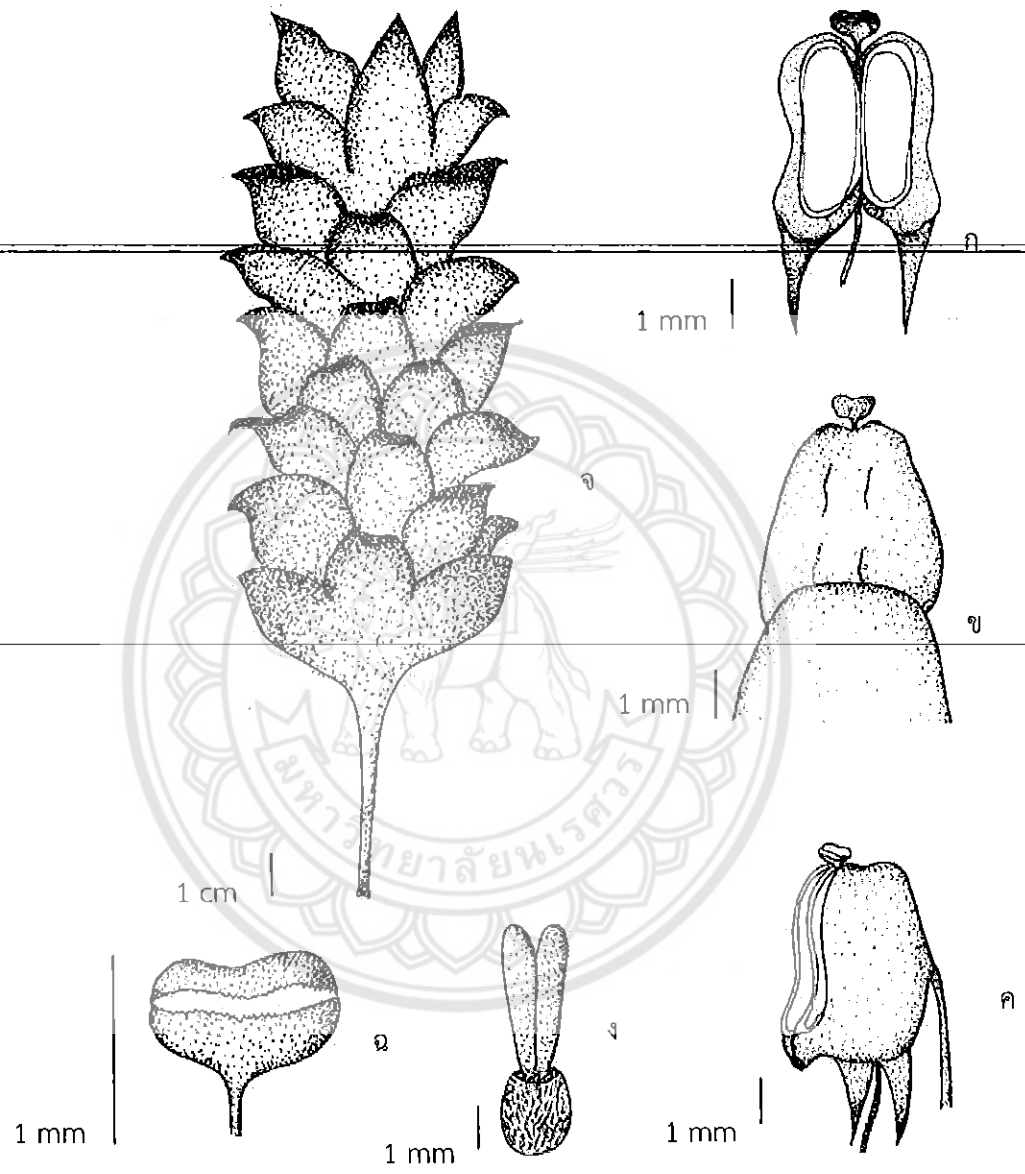
หัว (corm) รูปไข่ ยาว 6-9 เซนติเมตร กว้าง 3-5 เซนติเมตร ด้านนอกสีน้ำตาล ด้านในสีเหลืองเข้ม มีกลิ่น **เหง้า (rhizome)** แตกแขนงหนาประมาณ 1-2 เซนติเมตร **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 70-150 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปขอบขนานหรือรูปหอก ขนาดใหญ่ ปลายใบเรียวแหลม ฐานใบรูปลิ่ม ยาว 30-80 เซนติเมตร กว้าง 15-25 เซนติเมตร กาบใยยาว 10-50 เซนติเมตร ผิวใบเกลี้ยงทั้ง 2 ด้าน **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดกลางกลุ่มใบขนาดใหญ่ ยาว 14-20 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) ยาว 9-15 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ด้านล่างสีเขียวอ่อน ด้านบนส่วนโคม่า (coma-bract) สีขาว ทุกส่วนของใบประดับชุ่มน้ำและมีกลิ่นหอม ปลายมน **กลีบเลี้ยง (calyx)** สีขาว **กลีบดอก (corolla)** หลอดกลับดอกสีเหลืองอ่อนถึงขาว **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีเหลืองอ่อนส่วนปลายมีสีส้ม **กลีบปาก** (labellum) แผ่นกลีบปากสีเหลืองอ่อน มีแถบสีเหลืองเข้มบริเวณตามแนวกลางแผ่นกลีบปาก **เกสรเพศผู้** (stamen) อับเรณูมีเดือยแหลม (anther spur) ยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านข้าง กว้าง 1-1.5 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ ยาว 4-7 มิลลิเมตร **รังไข่**มีขนปกคลุม ยาว 2-3 มิลลิเมตร

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย

ประโยชน์ ใช้เป็นเครื่องเทศประกอบอาหาร และนิยมใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้าน

หมายเหตุ -

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา J.F. Maxwell 88-979 (CMUB); J.F. Maxwell 93-753 (CMUB); Momyrak & Meng 288 (CMUB)



ภาพที่ 4.23 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma longa* L. (Maxwell 93-753 (CMUB))
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านหลังของอับเรณู ค. ด้านข้างของอับเรณู ง. รังไข่และต่อมน้ำหวาน
จ. ช่อดอกและใบประดับ ฉ. ยอดเกสรเพศเมีย

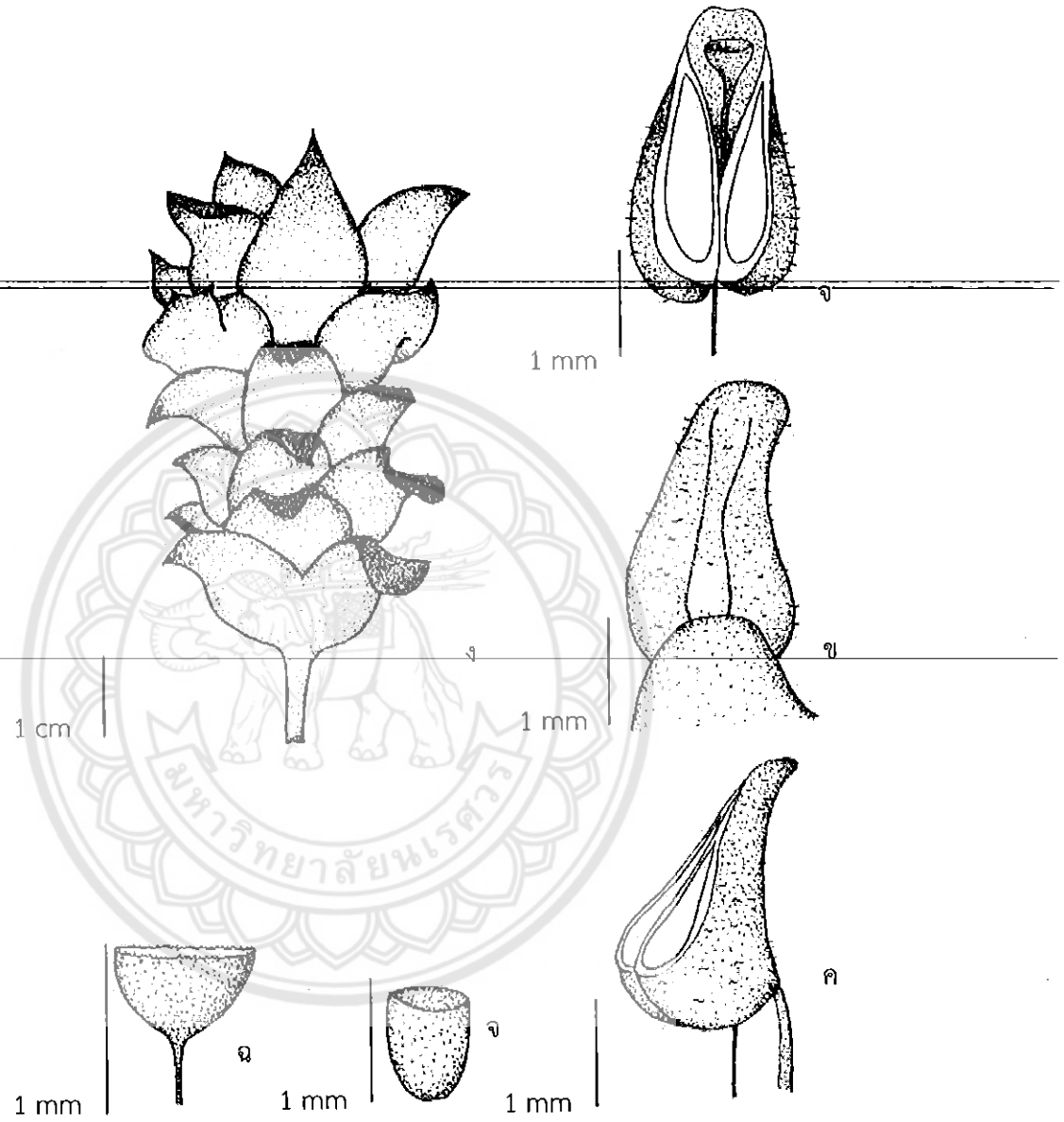
15. *Curcuma parviflora* Wall. กระเจียวขาวหิ่งห้อย

หัว (corm) รูปไข่ ยาว 1-4 เซนติเมตร กว้าง 1-3 เซนติเมตร ด้านนอกสีน้ำตาล ด้านในสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นเล็กน้อย **เหง้า (rhizome)** สั้น **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 15-40 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปหอก ปลายใบเรียวแหลม ฐานใบรูปลิ่ม ยาว 10-30 เซนติเมตร กว้าง 4-8 เซนติเมตร กาบใบยาว 10-20 เซนติเมตร ผิวใบเกลี้ยงทั้ง 2 ด้าน **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดกลางกลุ่มใบ ยาว 3-10 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) ยาว 10-20 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ด้านล่างของช่อดอกสีเขียว ด้านบนส่วนโคม่า (coma bract) สีขาว **กลีบเลี้ยง (calyx)** สีขาว ปลายมน **กลีบดอก (corolla)** สีขาว **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีขาว กลีบปาก (labellum) สีขาว ส่วนปลายของแผ่นกลีบปากสีม่วงปนขาวหยักเป็นคลื่น ปลายแยกเป็น 2 แฉก **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูไม่มีเดือย (anther spur) ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร มีขนปกคลุม **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านบน ไม่มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) รังไข่ผิวเกลี้ยง ขนาดยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ มักพบได้บริเวณแห้งแล้ง ในป่าผลัดใบ และป่าดิบแล้ง มีการกระจายพันธุ์ทั่วทุกภาคของประเทศไทย

ประโยชน์ นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ ดอกอ่อนใช้รับประทานเป็นผัก

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา J.F. Maxwell 95-569 (CMUB); M. Panatkool 52 (CMUB); P. Palee 397 (CMUB); DJ & al. Middleton 1242 (CMUB); W. Sankamethawee 259 (CMUB); M. Van de Bult 13 (CMUB); P. Palee 221 (CMUB); J.F. Maxwell 95-569 (CMUB); A. Phuakam 35 (CMUB); P. Palee 55 (CMUB); S. Chongko 521 (CMUB); Y. Keawta & S. Sirinanta 1 (CMUB); J. Panwijit, N. Monteinchai and A. Sonjam 7 (CMUB)



ภาพที่ 4.24 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma parviflora* Wall. (P. Palee 55 (CMUB))
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านหลังของอับเรณู ค.ด้านข้างของอับเรณู ง. ช่อดอกและใบประดับ จ.รังไข่ ฉ. ยอดเกสรเพศเมีย

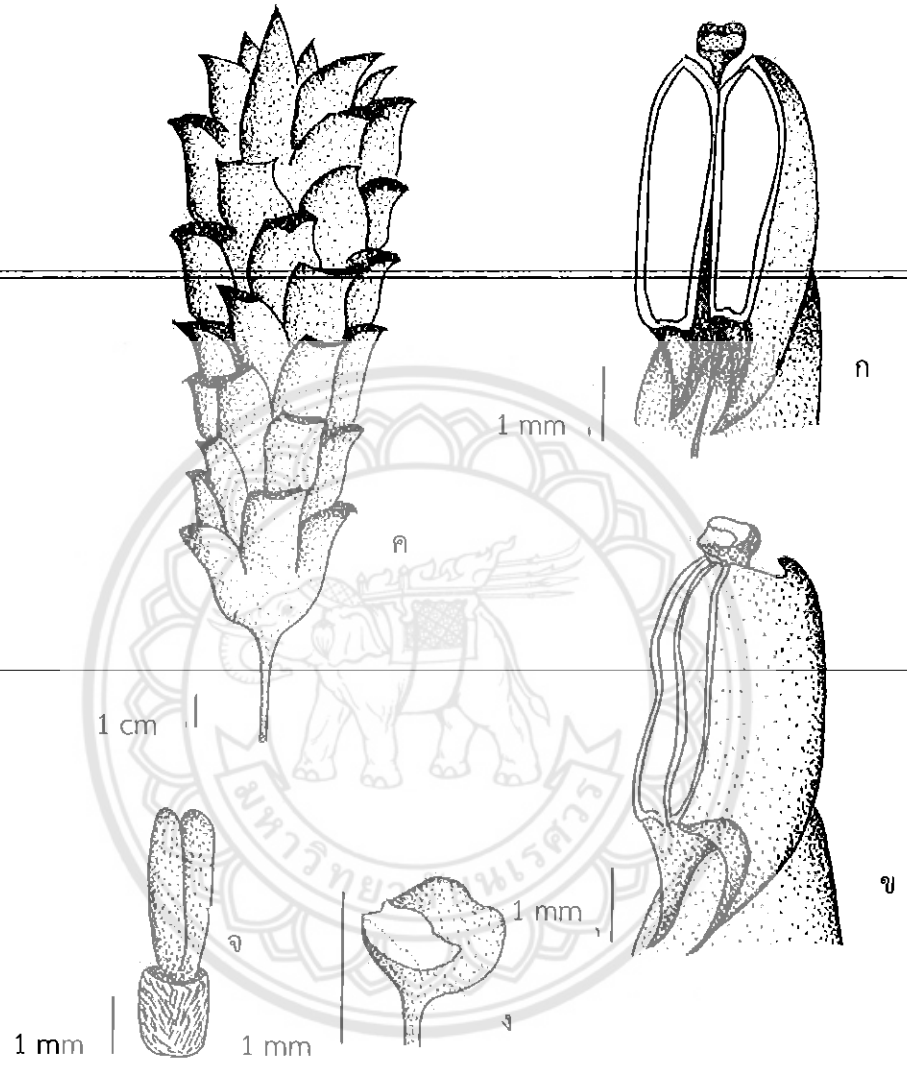
16. *Curcuma petiolata* Roxb. บัวชั้น

หัว (corm) รูปไข่ ยาว 4-6 เซนติเมตร กว้าง 2-5 เซนติเมตร ภายในมีสีเหลือง **เหง้า (rhizome) สั้น ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 30-60 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปขอบขนาน ปลายใบเรียวแหลม ฐานใบมน ยาว 25-50 เซนติเมตร กว้าง 10-20 เซนติเมตร กาบใบยาว 10-30 เซนติเมตร แผ่นใบเกลี้ยงทั้ง 2 ด้าน **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดกลางกลุ่มใบ ทรงสูง ยาว 11-17 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) ยาว 8-18 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ด้านล่างสีเขียวอ่อน ด้านบนส่วนโคม่า (coma bract) สีขาว ส่วนปลายสีม่วงแดง ปลายใบประดับมนถึงกลม **กลีบเลี้ยง (calyx)** สีเหลืองอ่อน **กลีบดอก (corolla)** สีเหลืองอ่อนถึงขาว **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีเหลืองอ่อน **กลีบปาก (labellum)** สีเหลืองอ่อน มีแถบสีเหลืองสดตามแนวเส้นกลางแผ่นกลีบปาก **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูมีเดือยอับเรณู (anther spur) อับเรณูยาว 6-9 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านข้าง กว้าง 1 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ ยาว 5-7 มิลลิเมตร รังไข่มีขนปกคลุม ยาว 2-3 มิลลิเมตร

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบบริเวณพื้นที่แห้งในป่าผลัดใบ และป่าดิบแล้ง มีการกระจายพันธุ์ในภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงใต้ ภาคกลาง และภาคใต้ ของประเทศไทย

ประโยชน์ -

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา S. Pumicong 404 (CUMB); J.F. Maxwell 95-572 (CUMB); J.F. Mawell 93-608 (CMUB); S. Chongko 566 (CMUB); J.F. Maxwell 98-878 (CMUB)



ภาพที่ 4.25 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma petiolata* Roxb. (J.F. Mawell 93-608 (CMUB))
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านข้างของอับเรณู ค. ช่อดอกและใบประดับ ง. ยอดเกสรเพศเมีย
จ. รังไข่และต่อมน้ำหวาน

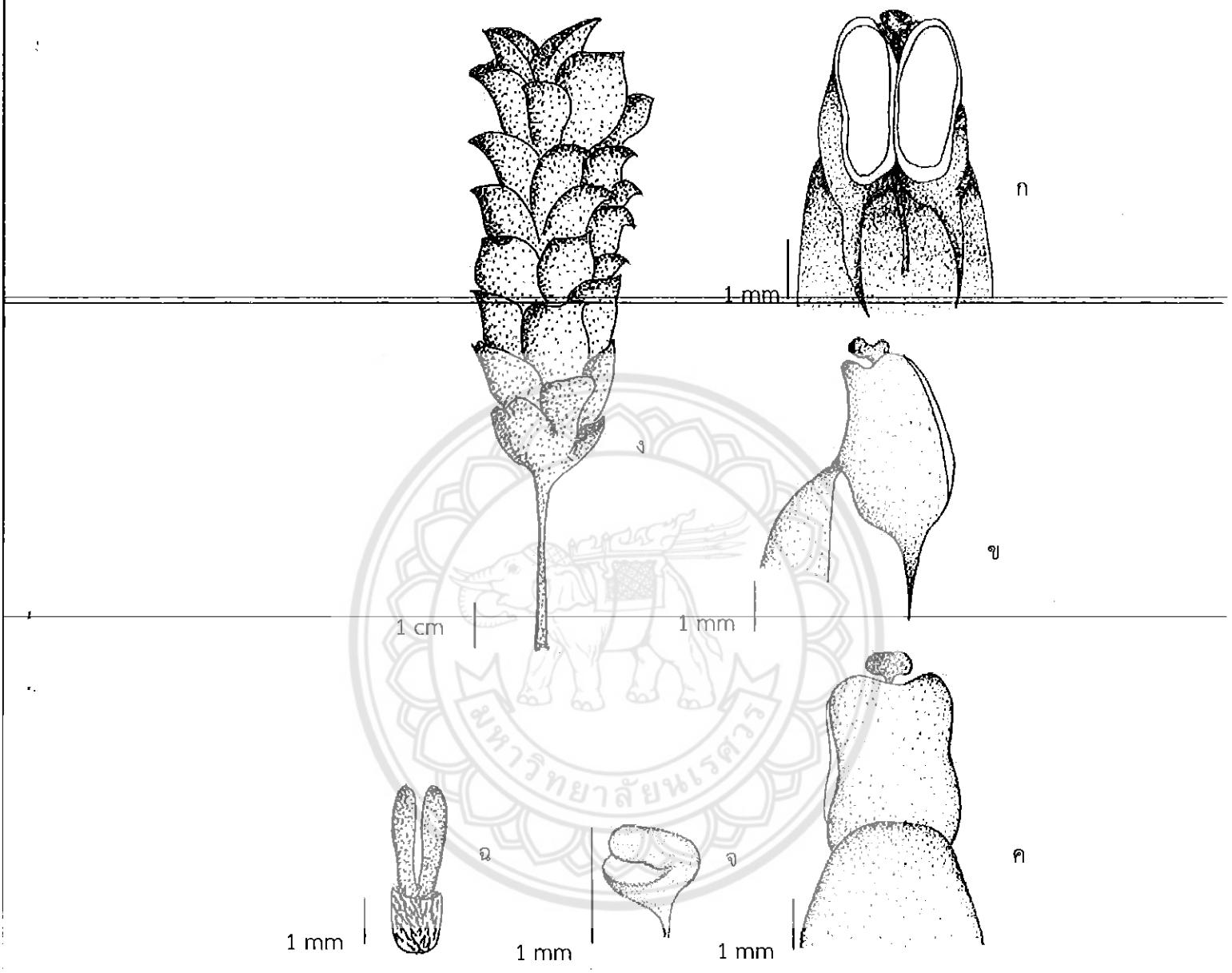
17. *Curcuma plicata* Wall. อาวแดงเหนือ

หัว (corm) รูปไข่ ยาว 3-5 เซนติเมตร กว้าง 2-4 เซนติเมตร ด้านนอกสีน้ำตาลเข้า ด้านในสีครีมถึงเหลือง **เหง้า (rhizome)** สั้น **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สีเขียนปนสีน้ำตาลเลือดนก สูง 20-40 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปหอก ปลายใบแหลม ฐานใบสอบเรียว ยาว 15-50 เซนติเมตร กว้าง 3-10 เซนติเมตร กาบใบยาว 3-20 เซนติเมตร ผิวเกลี้ยงทั้ง 2 ด้าน **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดจากเหง้า ยาว 9-17 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) ยาว 5-10 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ด้านล่างของช่อดอกสีเขียว ด้านบนส่วนโคม่า (coma bract) สีแดงเลือดนก ปลายมน **กลีบเลี้ยง (calyx)** สีขาว บางครั้งพบสีขาวปลายสีแดงเลือดนก **กลีบดอก (corolla)** สีขาวหรือชมพูอ่อน **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีครีม **กลีบปาก (labellum)** สีเหลือง มีแถบสีเหลืองสดบริเวณตามเส้นกลางกลีบปาก **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูมีเดือย (anther spur) อับเรณู ยาว 6-8 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านข้าง กว้าง 0.5-1 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ ยาว 4-6 มิลลิเมตร รังไข่มีขนปกคลุม ยาว 2-3 มิลลิเมตร

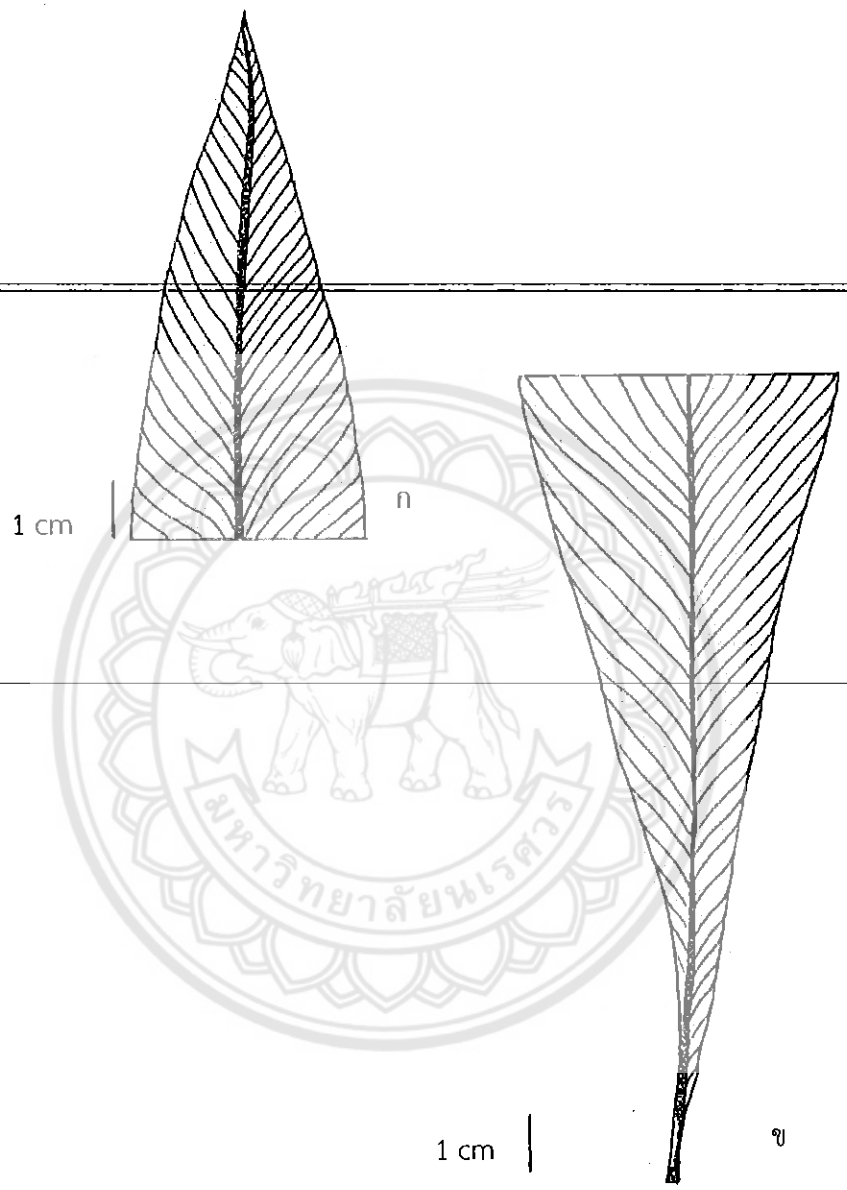
นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย

ประโยชน์ -

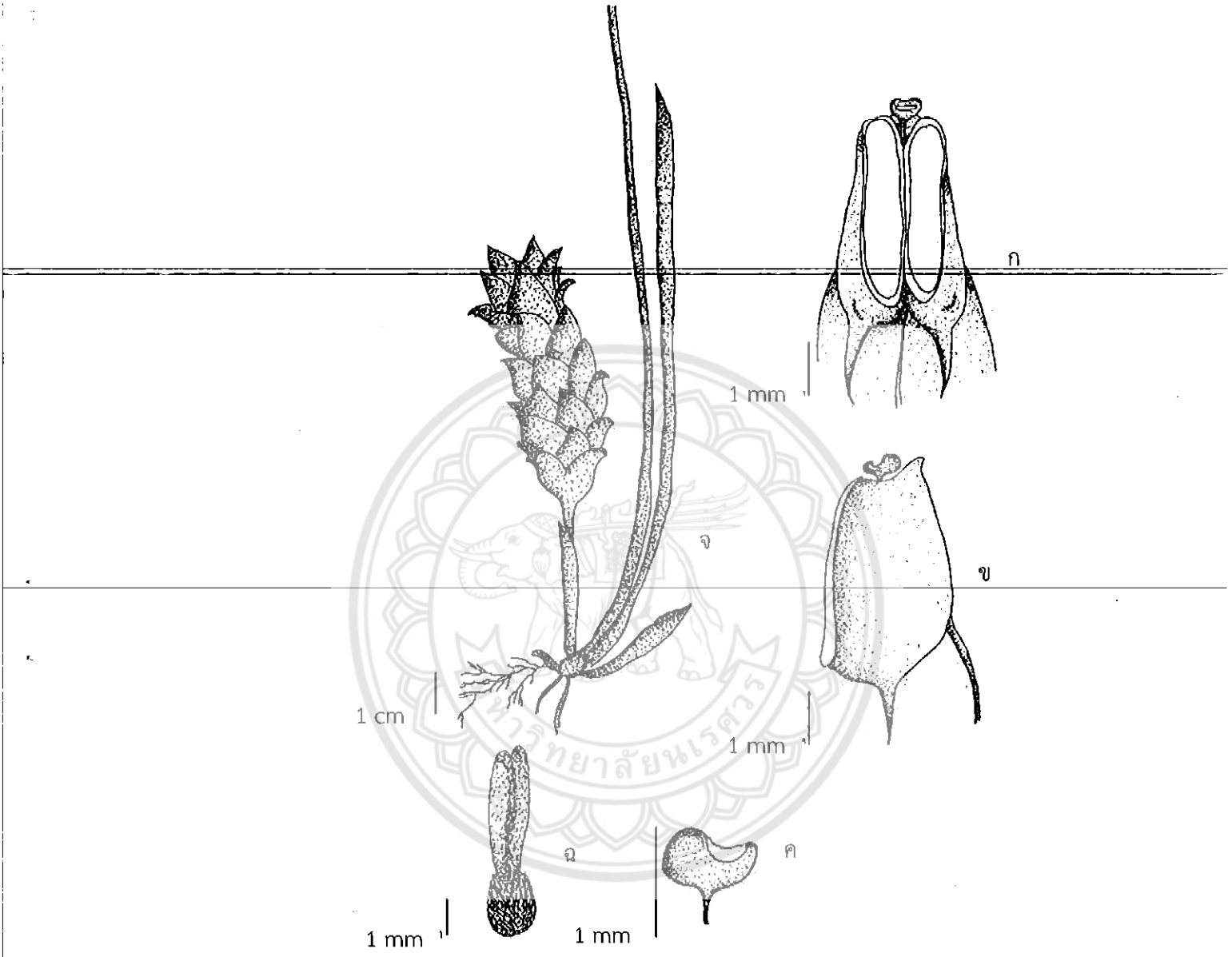
ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา J.F. Maxwell 88-531 (CMUB); J.F. Maxwell 88-776 (CMUB); J.F. Maxwell 87-628 (CMUB); J. Panwijit 5 (CMUB); Y. Keawta & S. Sirinanta 14 (CMUB); J.F. Maxwell 92-318 (CMUB); Y. Keawta & S. Sirinanta 2 (CMUB)



ภาพที่ 4.26 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma plicata* Wall. (J.F. Maxwell 92-318 (CMUB))
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านข้างของอับเรณู ค. ด้านหลังของอับเรณู ง. ช่อดอกและใบประดับ
จ. ยอดเกสรเพศ-เมีย ฉ. รังไข่และต่อมน้ำหวาน



ภาพที่ 4.27 ลักษณะใบ *Curcuma plicata* Wall. (J.F. Maxwell 92-318 (CMUB))
ก. ปลายใบแหลม (acute) ข. ฐานใบสอบเรียว (attenuate)



ภาพที่ 4.28 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma plicata* Wall. (Y. Keawta & S. Sirinanta 2 (CMUB)) ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านข้างของอับเรณู ค. ยอดเกสรเพศเมีย จ. ช่อดอกและการเกิดของช่อดอก ฉ. รังไข่และต่อมน้ำหวาน

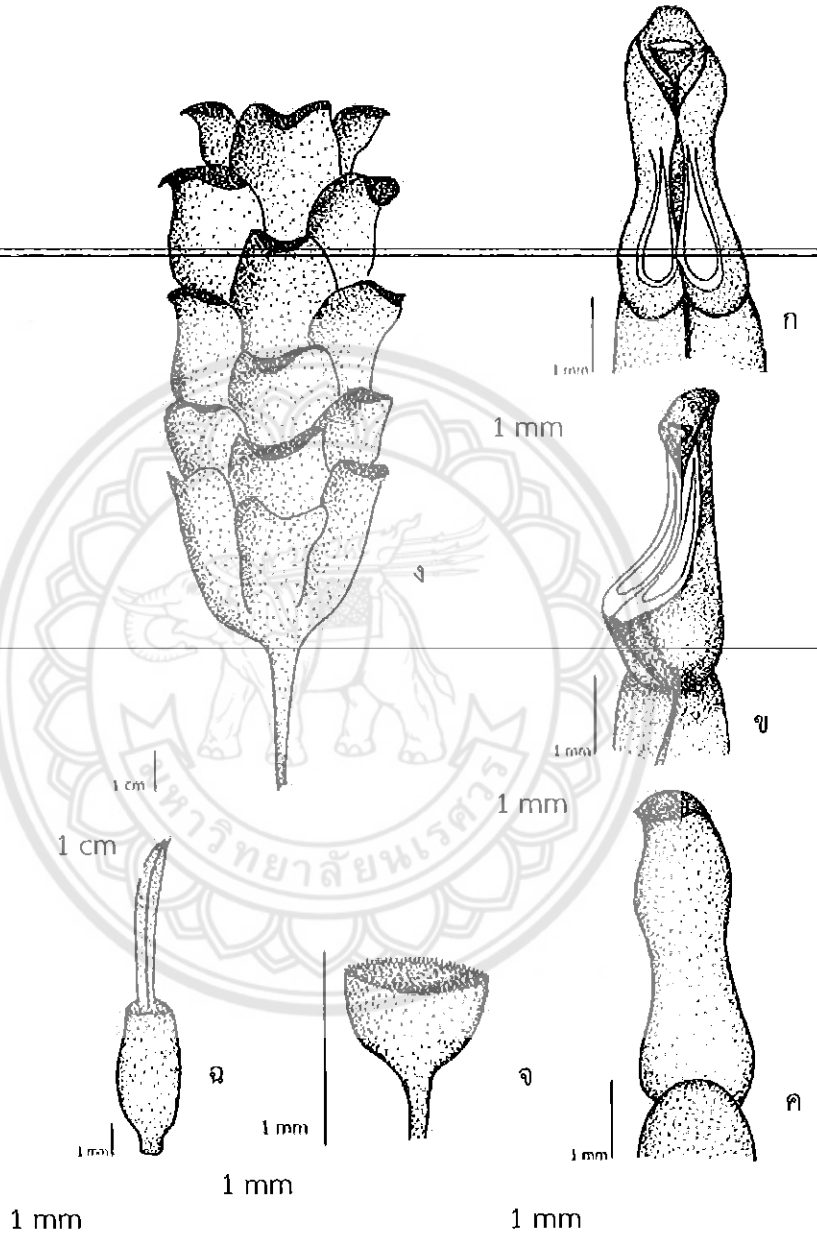
18. *Curcuma roscoeana* Wall. กระเจียวส้ม

หัว (corm) รูปไข่ ยาว 2-3 เซนติเมตร กว้าง 1-2 เซนติเมตร ด้านในสีเหลืองอ่อน **เหง้า (rhizome)** สั้น **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 30-40 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปรี ปลายใบเรียวแหลม ฐานใบรูปลิ่ม ยาว 16-35 เซนติเมตร กว้าง 7-10 เซนติเมตร กาบใบยาว 9-20 เซนติเมตร **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดกลางกลุ่มใบ ยาว 10-12 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) 20-25 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** สีส้ม ไม่มีส่วนโคม่า (coma bract) ปลายมน **กลีบเลี้ยง (calyx)** สีครีม **กลีบดอก (corolla)** สีครีม **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีขาวครีม **กลีบปาก (labellum)** สีเหลืองอ่อนถึงขาวครีม มีแถบสีเหลืองตามแนวกลางแผ่นกลีบปาก **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูไม่มีเดือย (anther spur) ยาว 5-7 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านบน กว้าง 0.5-1 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ ยาว 5-6 มิลลิเมตร รังไข่ผิวเกลี้ยงไม่มีขนปกคลุม ยาว 3-4 มิลลิเมตร

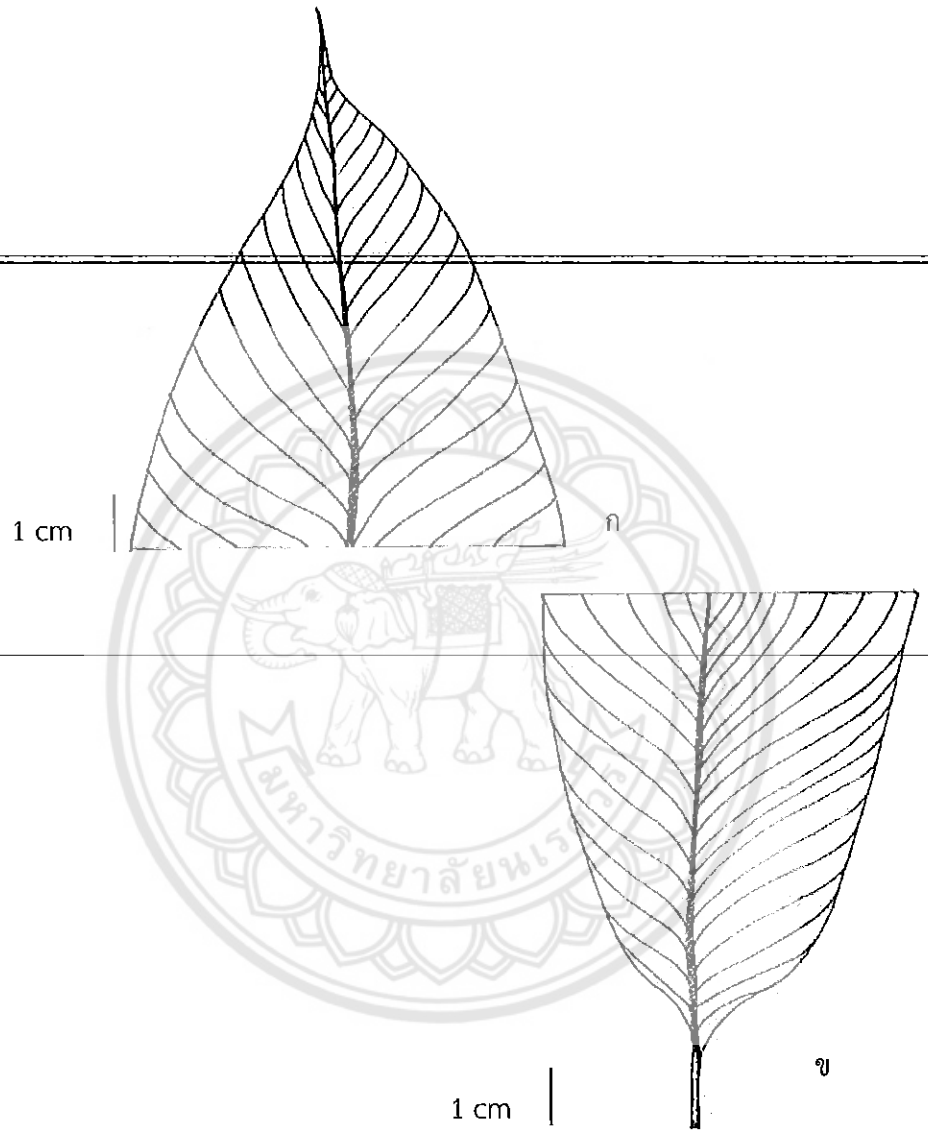
นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ มักพบบริเวณป่าผลัดใบ และป่าหินปูน กระจายพันธุ์ ทางภาคเหนือ และภาคตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศไทย

ประโยชน์ นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ นำดอกมาประดับแจกันดอกไม้

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา J. Panwijit, N. Monteinchai and A. Sonjam 9 (PNU)



ภาพที่ 4.29 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma roscoeana* Wall. (J. Panwijit, N. Monteinchai and A. Sonjam 9 (PNU)) ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านข้าง ของอับเรณู ค. ด้านหลังของอับเรณู ง. ช่อดอกและใบประดับ จ. ยอดเกสรเพศเมีย ฉ. รังไข่และต่อมหวาน



ภาพที่ 4.30 ลักษณะใบ *Curcuma roscoeana* Wall. (J. Panwijit, N. Monteinchai and A. Sonjam 9; PNU) ก. ปลายใบเรียวแหลม (acuminate) ข. ฐานใบรูปลิ่ม (cuneate)

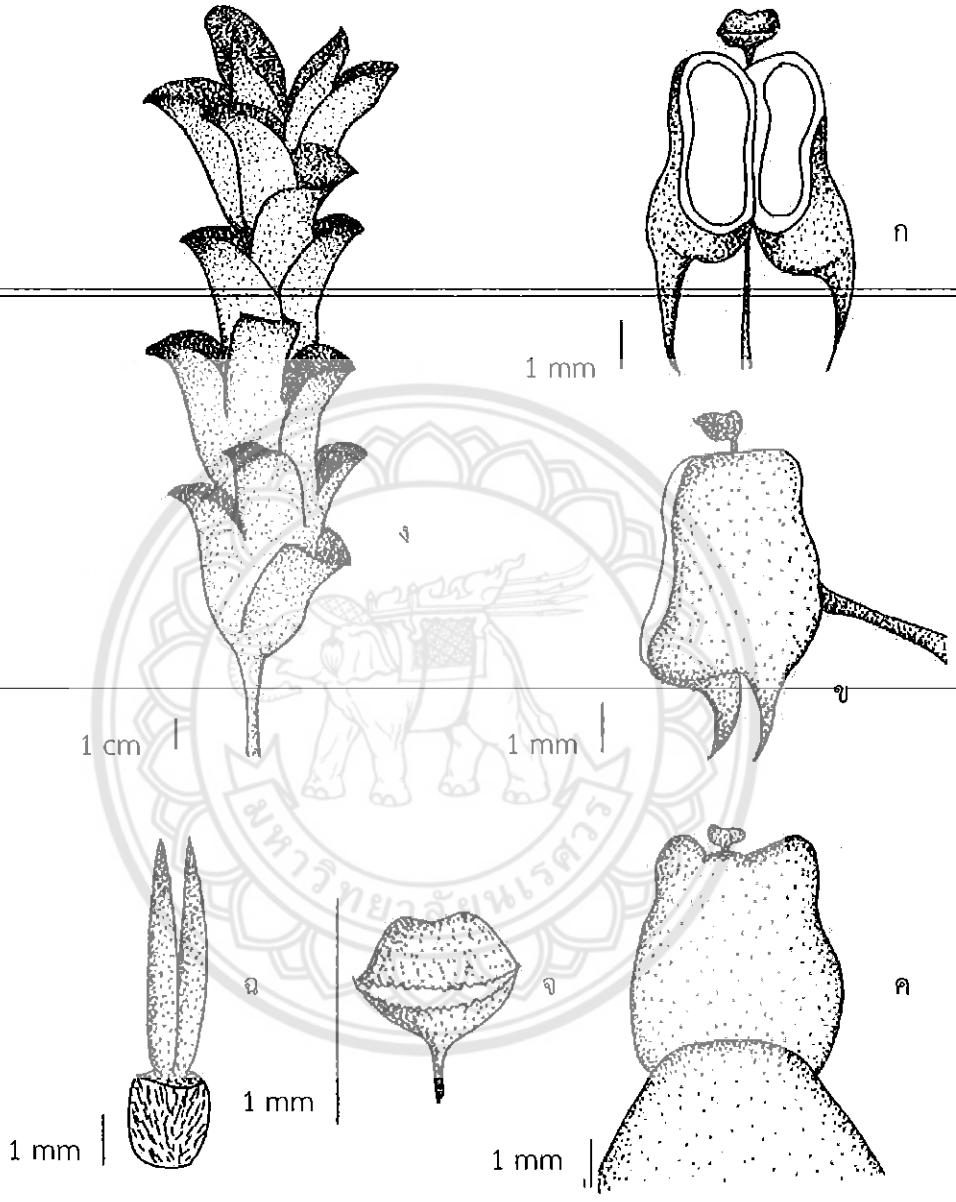
19. *Curcuma rubescens* Roxb. กระเจียวกาบแดง

หัว (corm) รูปไข่ ด้านนอกสีน้ำตาล ด้านในสีครีม ยาว 5-8 เซนติเมตร กว้าง 3-5 เซนติเมตร **เหง้า (rhizome)** แตกแขนง **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สีแดงเข้ม สูง 60-100 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปหอกแกมรูปแถบ ปลายใยเรียวแหลม ฐานใบสอบเรียว ยาว 30-60 เซนติเมตร กว้าง 9-12 เซนติเมตร กาบใบยาว 15-20 เซนติเมตร **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดจากเหง้า ยาว 15-20 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) ยาว 12-20 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ด้านล่างของช่อดอกสีขาว ด้านบนมีสีชมพูเข้มที่ปลายแผ่นใบประดับ ปลายมน **กลีบเลี้ยง (calyx)** สีเหลืองอ่อน **กลีบดอก (corolla)** สีเหลืองอ่อน **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีเหลืองอ่อน **กลีบปาก (labellum)** แผ่นกลีบปากสีเหลืองอ่อน มีแถบสีเหลืองเข้มตามแนวเส้นกลางแผ่นกลีบปาก **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูมีเดือยแหลม (anther spur) ยาว 7-8 เซนติเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านข้าง กว้าง 1 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ ยาว 5-7 มิลลิเมตร รังไข่มีขนปกคลุม ยาว 3-4 มิลลิเมตร

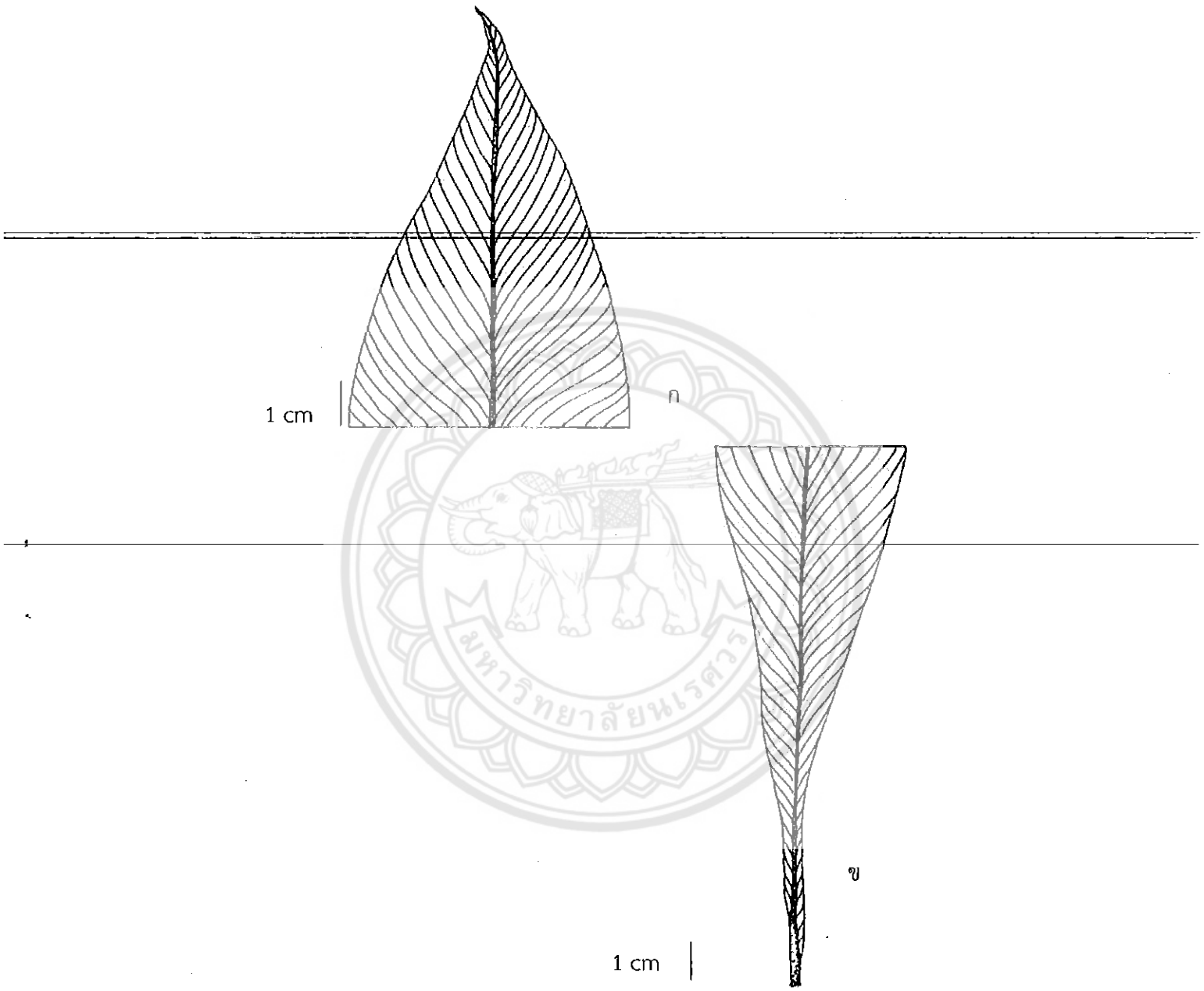
นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ นิยมปลูกทั่วไปเพื่อใช้เป็นสมุนไพร

ประโยชน์ -

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา Nungruthai Suphrom 3 (PNU)



ภาพที่ 4.31 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma rubescens* Roxb. (Nungruthai Suphrom 3; PNU) ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านข้างของอับเรณู ค. ด้านหลังของอับเรณู ง. ช่อดอกและใบประดับ จ. ยอดเกสรเพศเมีย ฉ. รังไข่และต่อมน้ำหวาน



ภาพที่ 4.32 ลักษณะใบ *Curcuma rubescens* Roxb. (Nungruthai Suphrom 3; PNU)
ก. ปลายใบสอบเรียว (acuminate) ข. ฐานใบสอบเรียว (attenuate)

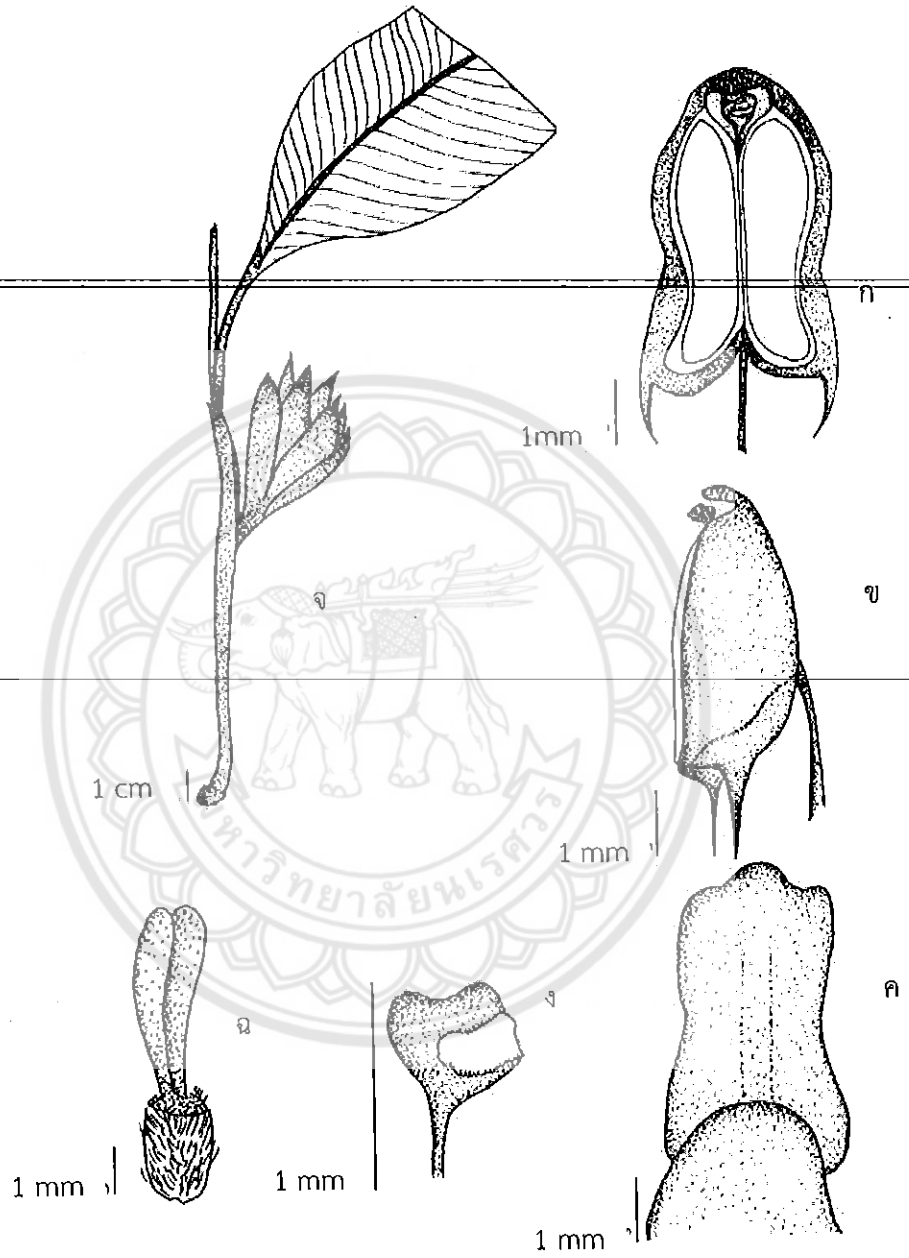
20. *Curcuma rubrobracteata* Škorničk., M. Sabu & Prasanthk. ว่านงูเห่า

หัว (corm) รูปไข่ ด้านนอกสีน้ำตาล ด้านในสีเหลือง **เหง้า (rhizome)** แตกแขนง **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 20-50 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบรูปรี ปลายใยเรียวแหลม ฐานใบรูปลิ่ม ยาว 18-40 เซนติเมตร กว้าง 10-20 เซนติเมตร กาบใบ ยาว 12-20 เซนติเมตร ผิวเกลี้ยงทั้ง 2 ด้าน **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดกลางกลุ่มใบ ยาว 6-9 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) ยาว 6-8 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** สีแดงสด ไม่มีส่วนโคม่า (coma bract) ปลายมน **กลีบเลี้ยง (calyx)** สีแดง **กลีบดอก (corolla)** สีแดง **เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes)** สีเหลืองสด กลีบปาก (labellum) สีเหลืองสด มีแถบสีเหลืองอ่อนตามแนวกลางแผ่นกลีบปาก **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูมีเดือยแหลม (anther spur) มีจงอย (anther crest) ด้านบนของอับเรณูยาวขึ้นมาปกคลุมยอดเกสรเพศเมีย อับเรณูยาว 6-7 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านข้าง กว้าง 1 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ ยาว 6-7 มิลลิเมตร รังไข่มีขนปกคลุม ยาว 2-3 มิลลิเมตร

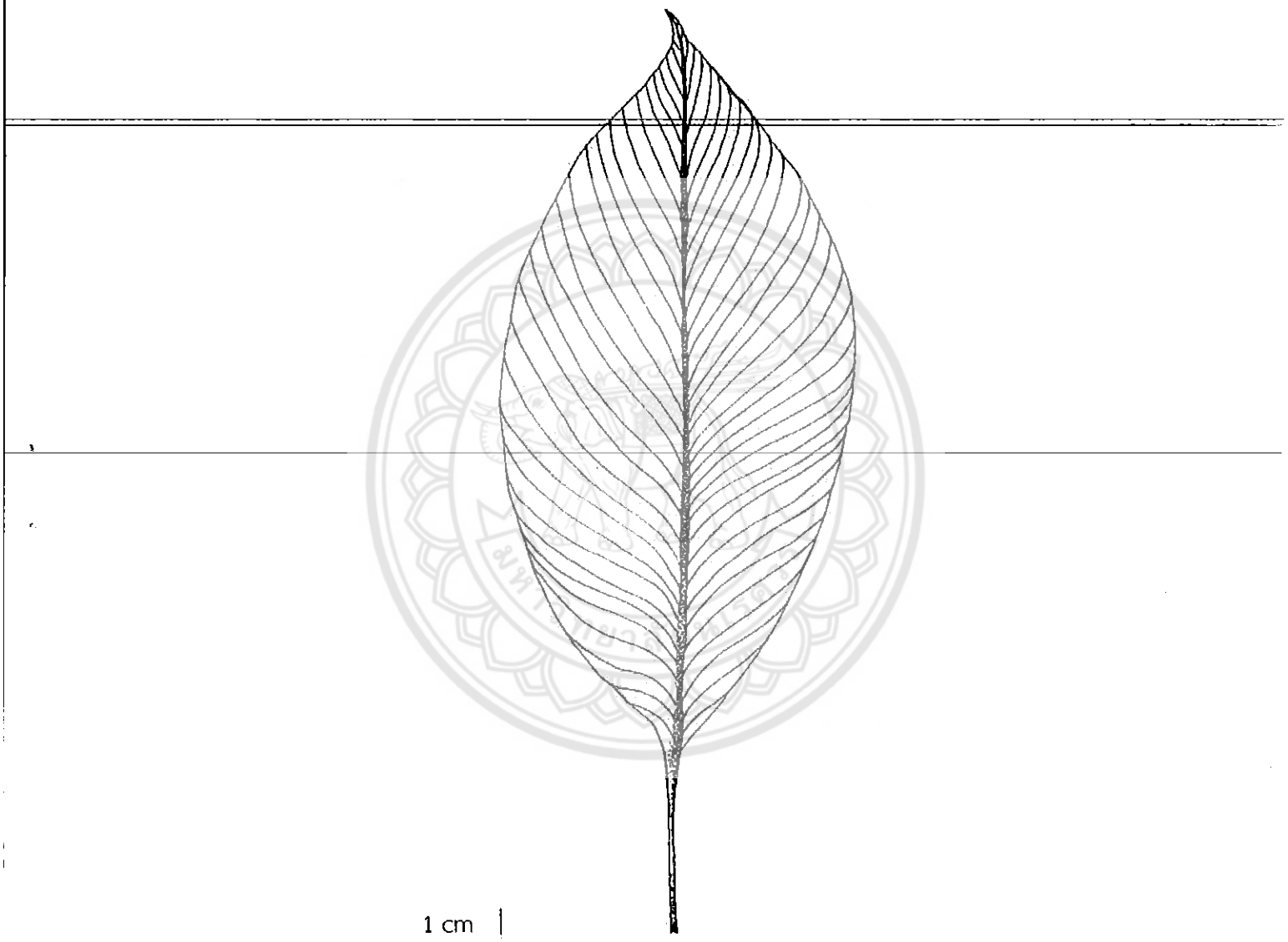
นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบบริเวณป่าผลัดใบ และป่าดิบแล้ง ภาคเหนือของประเทศไทย พบบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง แม่ฮ่องสอน พิษณุโลก ตาก และภาคตะวันตกเฉียงใต้ จังหวัดกาญจนบุรี

ประโยชน์ นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา J. Panwijit, N. Monteinchai and A. Sonjam 12 (PNU)



ภาพที่ 4.33 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma rubrobracteata* Škornič., M.Sabu & Prasanthk. (J. Panwijit, N. Monteinchai and A. Sonjam 12; PNU)
ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านข้างของอับเรณู ค. ด้านหลังของอับเรณู ง. ยอดเกสรเพศเมีย จ. ช่อดอกและการเกิดของช่อดอก ฉ. รังไข่และต่อมน้ำหวาน



ภาพที่ 4.34 ลักษณะใบ *Curcuma rubrobracteata* Škorničk., M.Sabu & Prasanthk. (J. Panwijit, N. Monteinchai and A. Sonjam 12 (PNU))

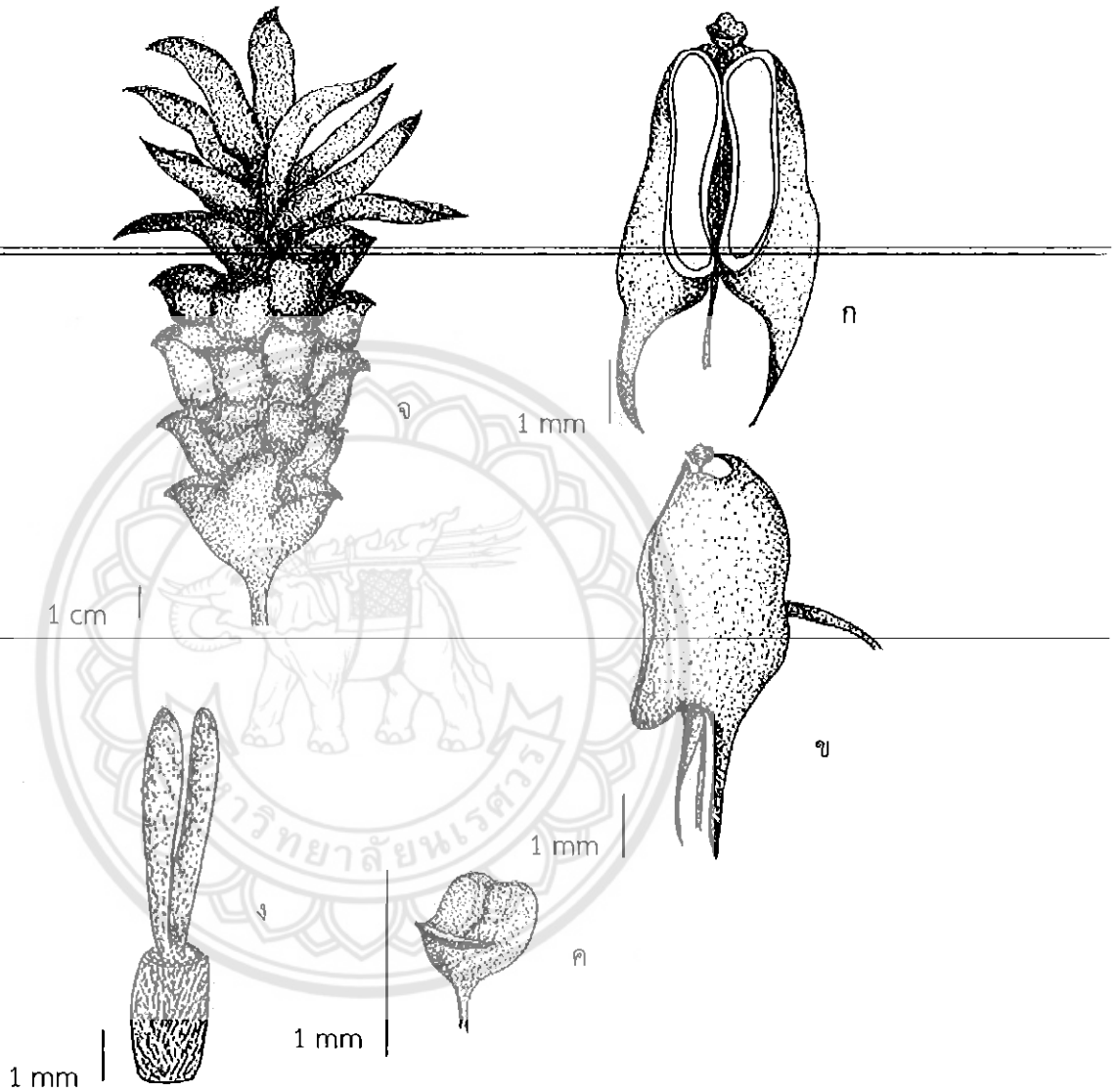
21. *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe ขมิ้นอ้อย

หัว (corm) รูปไข่ ยาว 1.5-7 เซนติเมตร กว้าง 3-4 เซนติเมตร ภายในมีสีน้ำตาลอ่อน **เหง้า (rhizome)** แตกแขนง หนา 1-3 เซนติเมตร **ลำต้นเหนือดิน (leafy shoot)** สูง 50-100 เซนติเมตร **ใบ (leaves)** แผ่นใบมีเส้นกลางใบสีแดง รูปขอบขนานปลายใบเรียวแหลม ฐานใบสอบเรียวหรือรูปลิ่ม ยาว 30-50 เซนติเมตร กว้าง 7-10 เซนติเมตร กาบใบยาว 20-30 เซนติเมตร **ช่อดอก (inflorescence)** เกิดจากเหง้า ยาว 10-15 เซนติเมตร ก้านช่อดอก (scape) ยาว 15-20 เซนติเมตร **ใบประดับ (bracts)** ด้านล่างของช่อดอกสีเขียว ปลายสีชมพู ด้านบนส่วนโคม่า (coma bract) ของช่อดอกสีชมพูปนสีขาวเล็กน้อย ปลายมนหรือแหลม **กลีบเลี้ยง (calyx)** สีเหลือง **กลีบดอก (corolla)** สีเหลือง เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes) สีชมพูอ่อนเกือบเหลือง **กลีบปาก (labellum)** สีเหลือง มีแถบตามแนวแผ่นกลีบปากสีเหลืองสด **เกสรเพศผู้ (stamen)** อับเรณูมีเดือยอับเรณู (anther spur) อับเรณูยาว 7-8 เซนติเมตร **เกสรเพศเมีย (pistil)** ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) เปิดด้านข้าง กว้าง 1 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำหวาน (epigynous gland) 1 คู่ ยาว 5-6 เซนติเมตร รังไข่มีขนปกคลุม ยาว 3-5 มิลลิเมตร

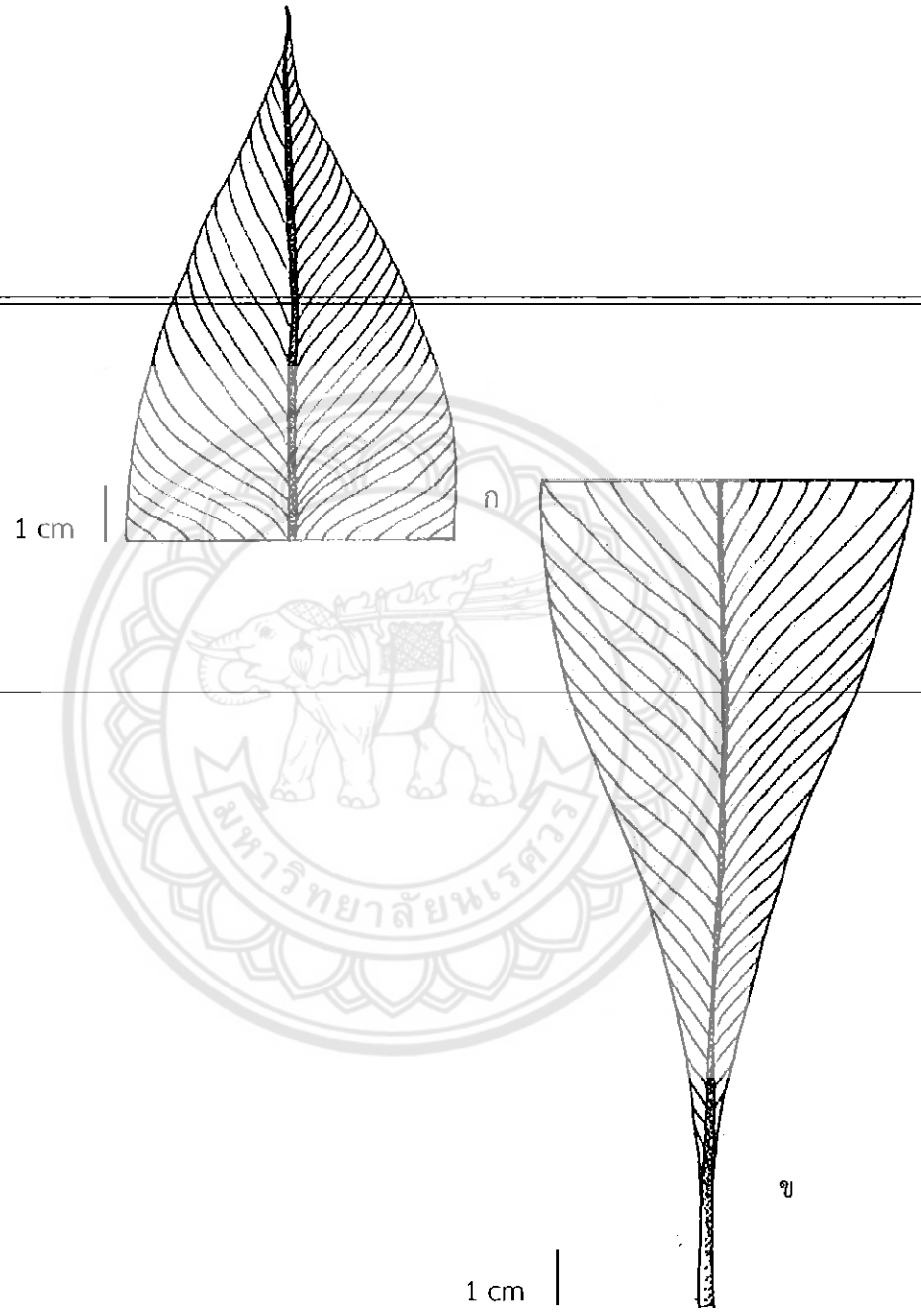
นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ พบบริเวณป่าปลูก ทั่วประเทศไทย นิยมปลูกเพื่อใช้เป็นยาสมุนไพร

ประโยชน์ นิยมใช้เป็นยาพื้นบ้าน รากใช้แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ เหง้าตำพอก แก้ฟกช้ำ บวม อักเสบ เคล็ดขัดยอก รักษาบาดแผลเรื้อรัง

ตัวอย่างพรรณไม้ที่ศึกษา Nungruthai Suphrom 5 (PNU)



ภาพที่ 4.35 รูปวาดลายเส้นของ *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe (Nungruthai Suphrom 5 (PNU)) ก. ด้านหน้าของอับเรณู ข. ด้านข้างของอับเรณู ค. ยอดเกสรเพศเมีย ง. รังไข่และต่อมน้ำหวาน จ. ช่อดอกและใบประดับ



ภาพที่ 4.36 ลักษณะใบ *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe (Nungruthai Suphrom 5 (PNU)) ก. ปลายใบเรียวแหลม (acuminate) ข. ฐานใบรูปลิ่ม (cuneate)

ผลการสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส

การศึกษาในครั้งนี้ได้นำใบอ่อนของพืชกุลขมิ้นทั้งหมด 35 ตัวอย่าง มาทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี CTAB Method ที่ดัดแปลงมาจากของ Agrawal *et al.*, (1992) พบว่าสารละลายดีเอ็นเอส่วนใหญ่ที่ได้จากการสกัดมีลักษณะใสไม่มีสี แต่บางตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นสีเหลืองน้ำตาลอ่อน ซึ่งอาจจะเกิดจากการปนเปื้อนของสารจำพวกฟีนอล และเมื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิลบนอะกาโรสเจล 0.8 % พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส หรือ 10,000 คู่เบส (ภาพที่ 4.37) และจากการสังเกตแถบดีเอ็นเอจะมีลักษณะเป็นรอย smear ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการแตกหักของดีเอ็นเอ อาจมีสาเหตุมาจากพืชมีสารพวก polyphenolic และ polysaccharide มากเกินไป (Deshmukh *et al.*, 2007) จึงส่งผลต่อคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้

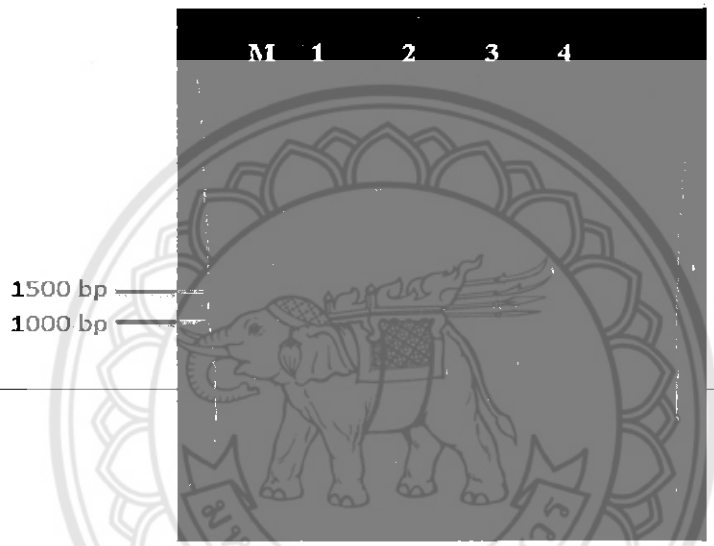
ภาพที่ 4.37 ขนาดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชสกุลขมิ้น โดยหมายเลขที่ 1-11 คือ 1. *Curcuma* sp. (ทรหด) 2. *C.* aromatic 3. *Curcuma* sp. (ม้าย้อเล็ก) 4. *C. mangga* Valeton & Zijp (1) 5. *Curcuma* sp. (ขมิ้นร้อยเอ็ด) 6. *Curcuma* sp. (2187) 7. *Curcuma* sp. (2174) 8. *Curcuma* sp. (2226) 9. *C. longa* 10. *Curcuma* sp. (2199) 11. *Curcuma* sp. (2179) และ M คือ DNA Marker ขนาด 1 Kb

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

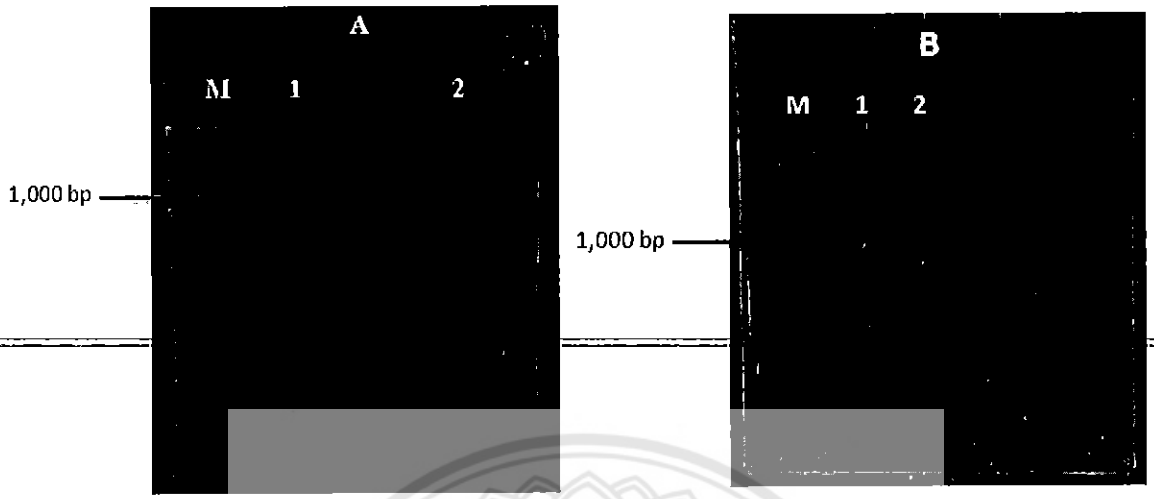
เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งได้ทำการเจือจางดีเอ็นเอก่อนที่จะนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อเป็นการลดสิ่งปนเปื้อนในสารละลายดีเอ็นเอ และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่อยู่ระหว่างยีนในคลอโรพลาสต์ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 14 ไพรเมอร์ (ตาราง 3.2) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นได้ปริมาณค่อนข้างมาก และบางตัวอย่างมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการจับของไพรเมอร์แบบไม่จำเพาะเจาะจง (non- specific product) ซึ่งอาจเกิดจากอุณหภูมิที่ใช้ไม่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา และการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกมา 2 ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 14 ไพรเมอร์ คือไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) และไพรเมอร์ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) โดยจากการวิเคราะห์ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) พบว่า 2 ไพรเมอร์นี้ สามารถแยกความแตกต่างของพืชได้ดีกว่าไพรเมอร์อื่น

จากการผลตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอของ PCR Product ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิลบนอะกาโรสเจล 1 % ของไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) พบว่าจาก 35 ตัวอย่าง ที่ทำการศึกษาสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 29 ตัวอย่าง ที่มีลักษณะแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวและจากการเทียบกับ DNA Marker พบว่ามีขนาดประมาณ 1,000-1,100 คู่เบส (ภาพที่ 4.38) ส่วนอีก 6 ตัวอย่าง คือ *Curcuma* sp. (2206) *Curcuma* sp. (2222) *Curcuma* sp. (2194) *Curcuma* sp. (2187) *Curcuma* sp. (2178) และ *Curcuma* sp. (Unknown) พบว่ามีลักษณะแถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ อาจเนื่องมาจากดีเอ็นเอเกิดการจับของไพรเมอร์แบบไม่จำเพาะเจาะจง (non- specific product) (ภาพที่ 4.39A) เมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิในขั้น annealing ให้สูงขึ้นและได้ทำการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ลง พบว่ายังไม่สามารถแก้ไขลักษณะแถบดีเอ็นเอที่มีมากกว่า 1 แถบได้ ดังนั้นจึงตัดเจลเฉพาะแถบที่ต้องการแล้วทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสำเร็จรูปของ HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience) และตรวจสอบผลขนาดของดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจล พบว่ามีขนาดประมาณ 1,000-1,100 คู่เบส (ภาพที่ 4.39B)

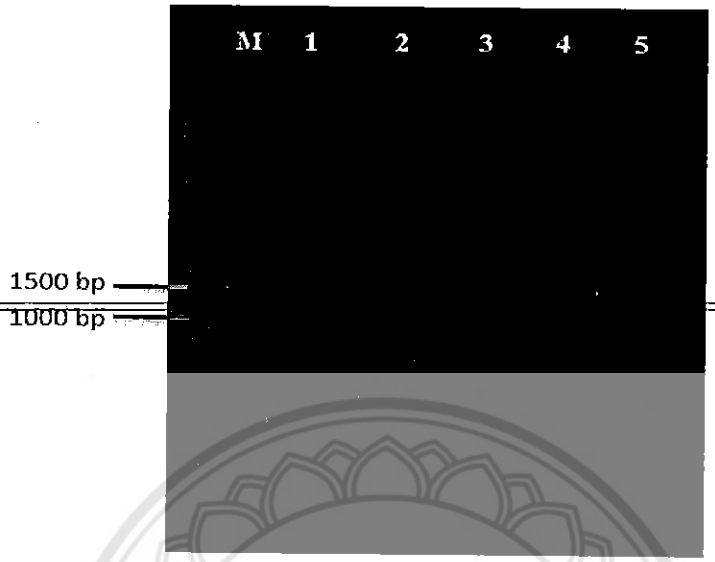
ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*L (UAA)- *trn*F (GAA) จาก 35 ตัวอย่าง ที่ทำการศึกษาสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 30 ตัวอย่าง ที่มีลักษณะแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว โดยมีขนาดของดีเอ็นเอประมาณ 1,000 คู่เบส (ภาพที่ 4.40) และอีก 5 ตัวอย่าง คือ *Curcuma* sp. (ขมิ้นทอง) *Curcuma* sp. (2193) *Curcuma* sp. (2204) *Curcuma* sp. (ทรหด) และ *Curcuma* sp. (2204) พบว่ามีลักษณะแถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ ซึ่งได้ทำการแก้ไขโดยการเพิ่มอุณหภูมิในขั้น annealing ให้สูงขึ้น และได้ทำการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ลง พบว่ายังไม่สามารถแก้ไขลักษณะแถบดีเอ็นเอที่มีมากกว่า 1 แถบได้ ซึ่งจะต้องทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตัดเจลเพื่อให้ได้ขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการ และจากการสังเกตของทั้ง 2 ไพรเมอร์ จะเห็นได้ว่ามีแถบความสว่างของดีเอ็นเอในแต่ละช่องแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณ PCR Product ที่ได้แตกต่างกัน



ภาพที่ 4.38 ขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) โดยหมายเลข 1-4 คือ 1. *C. ecomata* Craib 2. *Curcuma* sp. (2207) 3. *C. mangga* Valeton & Zijp (2) 4. *Curcuma* sp. (ขมิ้นร้อยเอ็ด) ตามลำดับ และ M คือ DNA Marker ขนาด 1 Kb



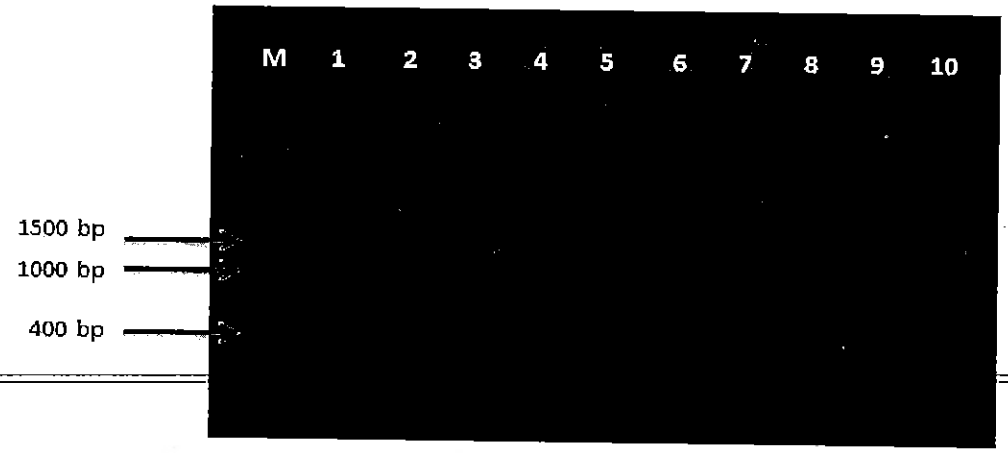
ภาพที่ 4.39 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่เกิดการจับกันของไพรเมอร์แบบไม่เฉพาะเจาะจง (A) และแถบดีเอ็นเอที่ได้หลังการตัดเจล (B) จากใช้ไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) โดยหมายเลขที่ 1-2 คือ 1. *Curcuma* sp. (ทรหด) และ 2. *Curcuma* sp. (Unknown) ตามลำดับ ส่วน M คือ DNA Marker ขนาด 1 Kb



ภาพที่ 4.40 ขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ *trn*L (UAA)- *trn*F (GAA) โดยหมายเลข 1-4 คือ 1. *C. comosa* Roxb. 2. *Curcuma* sp. (2193) 3. *Curcuma* sp. (ห้าร้อยนาง) 4. *C. longa Curcuma* sp. (2184) ตามลำดับ และ M คือ DNA Marker ขนาด 1 Kb

4.3 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA purification)

หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการแล้ว นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้ชุดสำเร็จรูปของ HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience) เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนน้อยที่สุด ซึ่งผลการตรวจสอบโดยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิลบนอะกาโรสเจล 1 % หลังจากทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ พบว่าไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) กับ ไพรเมอร์ *trn*L (UAA)- *trn*F (GAA) จะมีขนาดของดีเอ็นเอประมาณ 1,000-1,100 คู่เบส และ 1,000 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 4.41 และ 4.42)



ภาพที่ 4.41 ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ของไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) โดยหมายเลขที่ 1-11 คือ 1. *C. ecomata* Craib (1) 2. *Curcuma* sp. (2182) 3. *Curcuma* sp. (2184) 4. *Curcuma comosa* Roxb. (2195) 5. *Curcuma* sp. (2191) 6. *Curcuma* sp. (ห้าร้อยนาง) 7. *Curcuma* sp. (รางจืด) 8. *Curcuma* sp. (2178) 9. *Curcuma* sp. (2204) 10. *C. mangga* Valeton & Zijp (2) 11. *Curcuma* sp. (2219) โดยที่ M คือ Marker ขนาด 1 Kb

ภาพที่ 4.42 ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ของไพรเมอร์ *trn*L (UAA)- *trn*F (GAA) โดยหมายเลขที่ 1-11 คือ 1. *Curcuma* sp. (2193) 2. *Curcuma* sp. (2207) 3. *Curcuma* sp. (2201) 4. *C. ecomata* Craib (1) 5. *Curcuma* sp. (2178) 6. *Curcuma* sp. (2204) 7. *Curcuma* sp. (2219) 8. *Curcuma* sp. (2226) 9. *Curcuma* sp. (2174) 10. *Curcuma* sp. (ขมิ้นสีคิ้ว) และ 11. *Curcuma* sp. (2182) ตามลำดับ โดยที่ M คือ Marker ขนาด 1 Kb

4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

นำข้อมูลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลีใต้ มาประกอบเข้ากันเพื่อทำการแก้ไขเบสที่ผิดด้วยโปรแกรม Gene studio และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์และถูกต้องแล้วไปเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) เพื่อตรวจหาตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกัน จากนั้นตัดแต่งลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม Genedoc version 2.7.000 (Nicholas *et al.*, 1997) โดยตัดส่วนต้นและส่วนปลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ออก เนื่องจากเป็นบริเวณที่อาจเกิดความผิดพลาดในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้ส่วนที่อยู่ระหว่างยีนในคลอโรพลาสต์ 2 บริเวณคือ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) และ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) จากพืชสกุลขมิ้น พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณได้มีความยาว 1,008-1,123 คู่เบส และ 914-1,017 คู่เบส ตามลำดับ หลังจากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อจัดจำแนกพืชสกุล *Curcuma* โดยทำการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 โดยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum parsimony และ Maximum Likelihood ซึ่งในแต่ละวิธีจะทำการตรวจสอบค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

4.4.1 วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากการใช้ไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) โดยมีตัวอย่างในการวิเคราะห์ 29 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 35 ตัวอย่าง เพราะอีก 6 ตัวอย่าง ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้ทำการตัดเจลแล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไม่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จากการนำข้อมูลที่ได้มาเข้าโปรแกรม Gene studio จะเห็นได้ว่าสาย Forward primer กับ Reverse primer ของแต่ละตัวอย่างทั้ง 6 ตัวอย่าง ไม่สามารถรวมเข้ากันได้ และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชสกุลขมิ้นทั้งหมด 29 ตัวอย่าง พบว่ามีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการ alignment เท่ากับ 1,225 คู่เบส และพบว่าเกิดการแทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน (transition) คือการแทนที่เบสพิวรีนด้วยเบสพิวรีน และการแทนที่เบสไพริมิดีนด้วยไพริมิดีน นอกจากนี้ยังพบการแทนที่ระหว่างเบสต่างกลุ่ม (transversion) มี 2 แบบ เช่นกัน คือ การแทนที่เบสพิวรีนด้วยไพริมิดีน และการแทนที่เบสไพริมิดีนด้วยกลุ่มเบสพิวรีน พืชสกุลขมิ้นทั้งหมด 29 ตัวอย่าง มีค่า transition (Ts) เท่ากับ 1.196 และมีค่า transversion (Tv) เท่ากับ 1.565 และมีค่า Ts/Tv ratio เท่ากับ 0.764 (ตาราง 4.1) จะเห็นได้ว่ามีการแทนที่ของเบสต่างกลุ่มมากกว่าการแทนที่เบสกลุ่มเดียวกัน โดยจากการสังเกต พบว่ามีค่าอัตราส่วนของ transversion (Tv) สูงกว่าค่า transition (Ts) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคงที่ (conserved sites) พบว่ามี 893 คู่เบส (72.90%) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรทั้งสิ้น 277 คู่เบส (22.61%) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือ Phylogenetically informative site เท่ากับ 123 คู่เบส (10.04%) ลำดับนิวคลีโอไทด์พบเฉพาะเพียงตัวอย่างเดียว

(singleton) เท่ากับ 136 คู่เบส (11.10%) และมีค่าเปอร์เซ็นต์ของเบสแต่ละตัวในแต่ละตัวอย่าง (ตาราง 4.2) ซึ่งจากข้อมูลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างต้นส่วนใหญ่ให้ข้อมูล AT rich โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 67.7% จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 โดยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum parsimony (MP) (ภาพที่ 4.43) และการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) (ภาพที่ 4.44) ซึ่งในแต่ละวิธีนี้จะทำการตรวจสอบค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยจากการวิเคราะห์พบว่าวิธี ML สามารถใช้ในการจำแนกพืชสกุลขมิ้นได้ดีกว่าวิธี MP เนื่องจากมีค่าความเชื่อมั่นทางสถิติสูงกว่า และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า สามารถแบ่งตัวอย่างพืชออกเป็นกลุ่มได้ ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีค่าความเชื่อมั่นทางสถิติสูง ตั้งแต่ 80-100% และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเพราะส่วนใหญ่มาจากแหล่งพื้นที่ใกล้เคียงกัน คือ *Curcuma comosa* Roxb. (2195) กับ *Curcuma* sp. (2194) มีความเชื่อมั่นทางสถิติสูง 100% *Curcuma* sp. (2226) กับ *Curcuma* sp. (ขมิ้นร้อยเอ็ด) มีความเชื่อมั่นทางสถิติ 98% *Curcuma* sp. (2189) กับ *Curcuma aromatic* (นางคำ) มีความเชื่อมั่นทางสถิติ 97% และ *Curcuma ecomata* Craib กับ *Curcuma* sp. (2182) มีความเชื่อมั่นทางสถิติ 80%

ตาราง 4.1 แสดงอัตราการเกิด transition (Ts) และ transversion (Tv) **จากการใช้ไพรเมอร์** *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU)

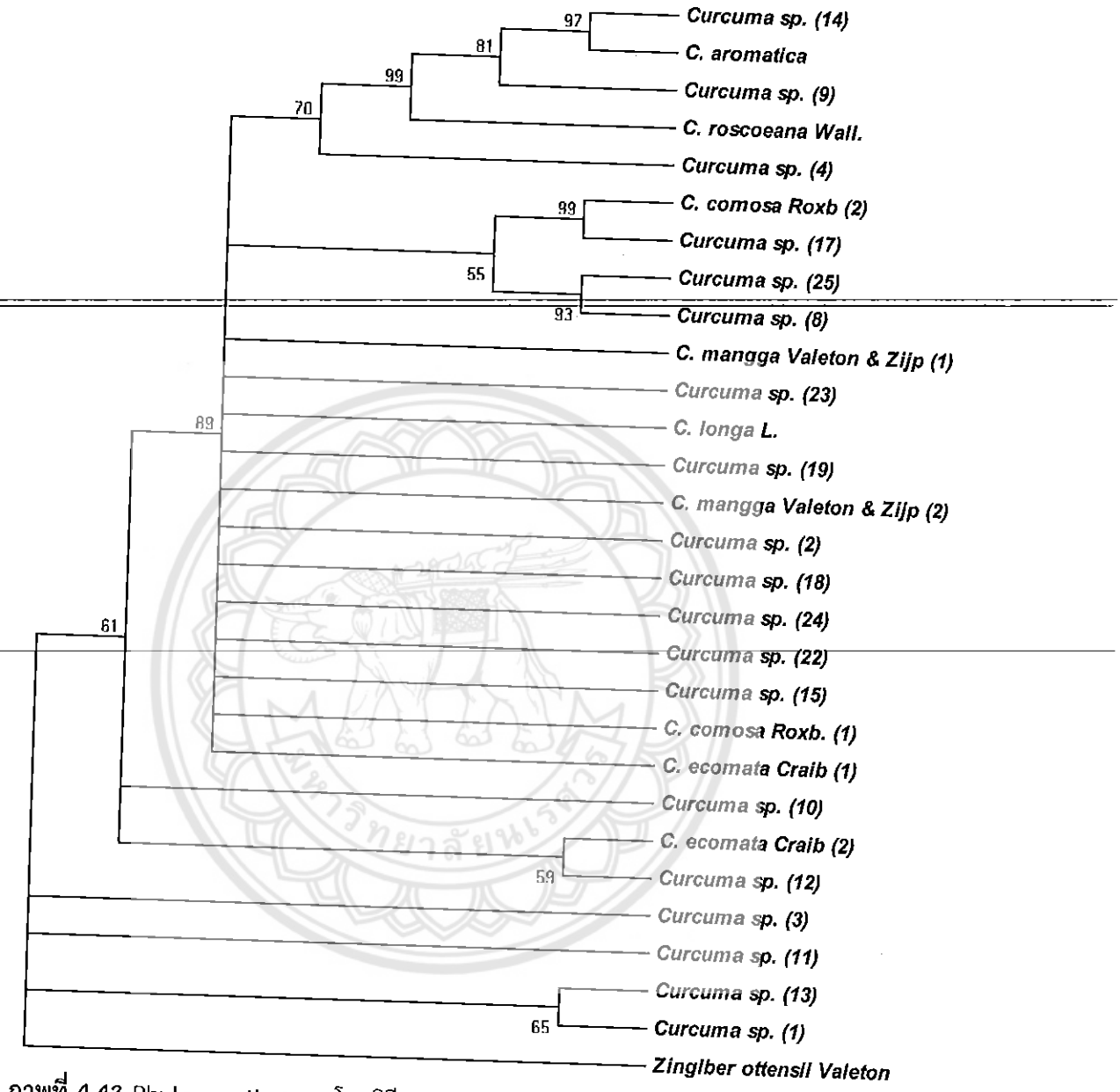
Alignment	Base				Ts	Tv	Ts/Tv
	A	T	C	G			
1,225	31.9%	35.8%	16.8%	15.5%	1.196	1.565	0.764

ตาราง 4.2 แสดงองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU)

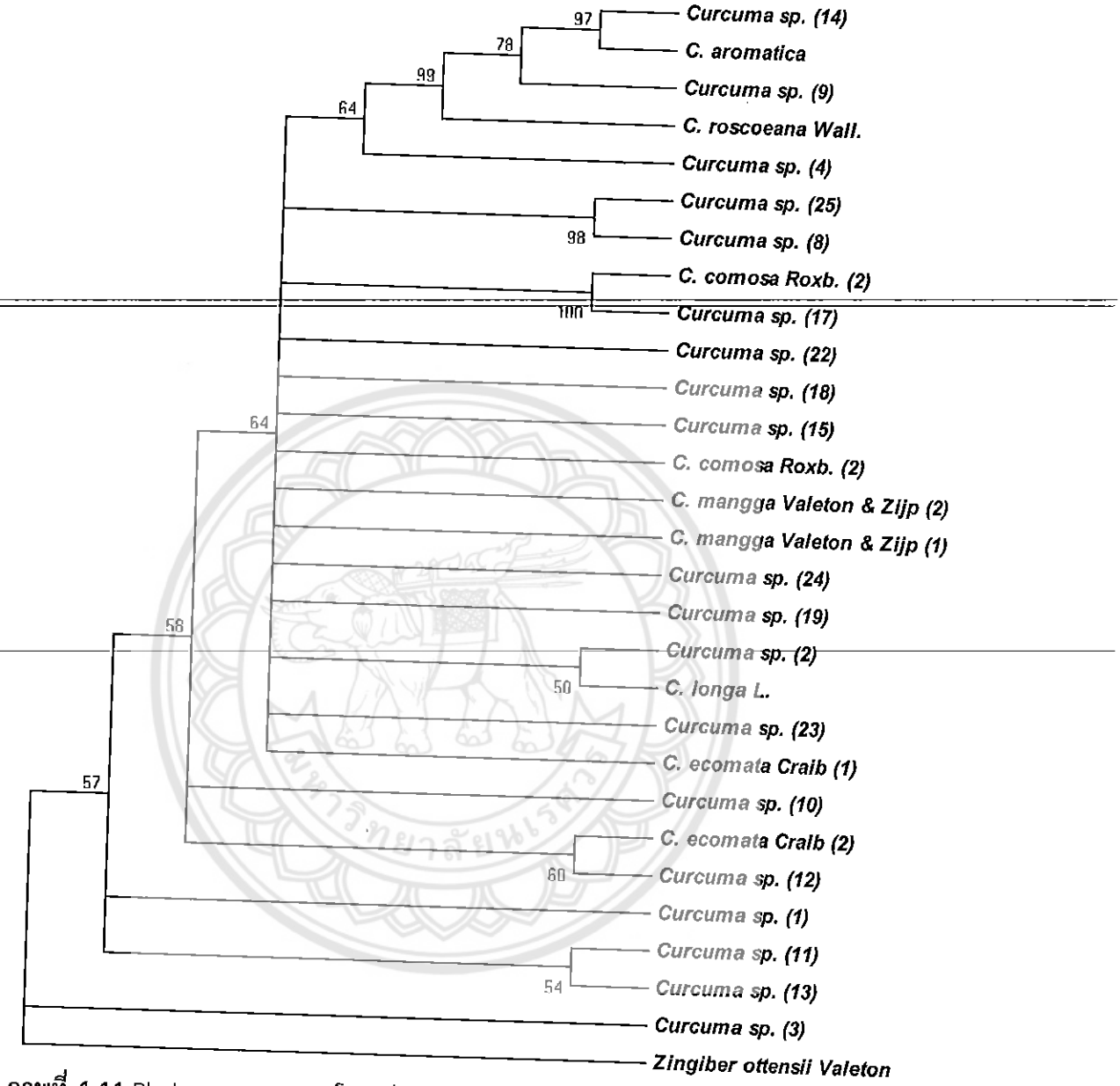
Sample	(Thymine) %	(Cytosine) %	(Adenine) %	(Guanine) %	% AT	% GC
C. comosa Roxb. (2195)	35.8	16.7	31.7	15.8	67.6	32.4
Curcuma sp. (2194)	36.3	16.6	31.5	15.6	67.7	32.3
Curcuma sp. (2221)	35.5	16.3	32.2	16.0	67.7	32.3
Curcuma sp. (2226)	35.3	16.7	31.8	16.2	67.1	32.9
Curcuma sp. (ขมิ้นร้อยเอ็ด)	35.9	16.7	32.0	15.4	67.9	32.1
Curcuma sp. (2191)	35.7	17.1	31.9	15.3	67.6	32.4
Curcuma sp. (2219)	35.9	16.8	31.8	15.5	67.7	32.3
Curcuma sp. (รางจืด)	35.8	16.7	32.1	15.4	67.9	32.1
Curcuma longa L.	35.6	16.8	32.4	15.3	67.9	32.1
Curcuma sp. (2201)	35.7	16.7	32.2	15.3	67.9	32.1
C. mangga Valeton & Zijp (2)	35.7	16.9	32.1	15.3	67.8	32.2
Curcuma sp. (2199)	36.1	16.4	31.9	15.6	68.0	32.0
Curcuma sp. (2222)	36.0	16.2	32.3	15.5	68.3	31.7
Curcuma sp. (ห้าร้อยนาง)	35.9	16.9	31.8	15.4	67.7	32.3
Zingiber ottensii Valeton	36.4	16.4	32.2	15.0	68.7	31.3
Curcuma sp. (2178)	35.8	16.6	32.0	15.6	67.8	32.2

ตาราง 4.2 (ต่อ)

Sample	(Thymine) %	(Cytosine) %	(Adenine) %	(Guanine) %	% AT	% GC
C. ecomata Craib (2177)	35.9	16.6	31.6	15.9	67.5	32.5
Curcuma sp. (ม้าย้อเล็ก)	35.9	17.3	31.6	15.3	67.4	32.6
Curcuma sp. (2184)	36.2	16.7	31.6	15.5	67.8	32.2
Curcuma sp. (2174)	35.8	16.9	31.9	15.5	67.7	32.3
Curcuma sp. (2182)	35.9	16.7	31.8	15.6	67.7	32.3
C. comosa Roxb. (2187)	36.1	17.0	31.4	15.5	67.5	32.5
Curcuma sp. (พญาว่าน)	36.0	16.8	31.5	15.7	67.5	32.5
C. mangga Valeton & Zijp (1)	35.5	16.8	32.3	15.4	67.8	32.2
Curcuma sp. (2174)	35.8	16.9	31.9	15.5	67.7	32.3
Curcuma sp. (ขมิ้นสีคิ้ว)	35.9	17.3	30.9	16.0	66.8	33.2
Curcuma sp. (2189)	35.4	17.3	32.0	15.2	67.4	32.6
C. aromatic Salisb. (นางคำ)	35.7	17.5	31.6	15.2	67.3	32.7
C. roscoeana Wall. (2223)	35.7	16.9	31.5	15.9	67.2	32.8
Avg.	35.8	16.8	31.9	15.5	67.7	32.3



ภาพที่ 4.43 Phylogenetic tree โดยวิธี Maximum parsimony จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) โดยใช้ *Zingiber ottensii* Valeton (ไพลดำ) เป็น out group



ภาพที่ 4.44 Phylogenetic tree โดยวิธี Maximum Likelihood จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) โดยใช้ *Zingiber ottensii* Valeton (ไพลดำ) เป็น out group

4.4.2 วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากการใช้ไพรเมอร์ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไพรเมอร์ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) โดยมีตัวอย่างในการวิเคราะห์ 30 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 35 ตัวอย่าง เพราะอีก 5 ตัวอย่างนั้นไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้ทำการตัดเจลแล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไม่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จากการนำข้อมูลที่ได้มาเข้าโปรแกรม Gene studio จะเห็นได้ว่าสาย Forward primer กับ Reverse primer ของแต่ละตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง ไม่สามารถรวมเข้ากันได้ และพบว่ามีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการ alignment เท่ากับ 1,048 คู่เบส โดยมีค่า transition (Ts) เท่ากับ 3.347 และมีค่า transversion (Tv) เท่ากับ 1.915 และมีค่า Ts/Tv ratio เท่ากับ 1.747 (ตาราง 4.3) แสดงให้เห็นว่ามีการเกิดการแทนที่เบสภายในกลุ่มเดียวกันมากกว่าการแทนที่เบสต่างกลุ่ม โดยจากการสังเกตพบว่ามีค่าอัตราส่วนของ transition (Ts) สูงกว่าค่า transversion (Tv) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคงที่ (conserved sites) เท่ากับ 845 คู่เบส (80.63%) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรทั้งสิ้น 168 คู่เบส (16.03%) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือ Phylogenetically informative site เท่ากับ 78 คู่เบส (7.44%) และลำดับนิวคลีโอไทด์พบเฉพาะเพียงตัวอย่างเดียว (singleton) เท่ากับ 86 คู่เบส (8.21%) และมีค่าเปอร์เซ็นต์ของเบสแต่ละตัวในแต่ละตัวอย่าง (ตาราง 4.4) ซึ่งจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างต้นส่วนใหญ่ให้ข้อมูล AT rich โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 66.6%

จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 โดยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum parsimony (MP) (ภาพที่ 4.45) และการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) (ภาพที่ 4.46) ซึ่งในแต่ละวิธีนี้จะทำการตรวจสอบค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยจากการวิเคราะห์พบว่าวิธี ML สามารถใช้ในการจำแนกพืชสกุลขมิ้นได้ดีกว่าวิธี MP เนื่องจากมีค่าความเชื่อมั่นทางสถิติสูงกว่า และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างพืชออกเป็นกลุ่มได้ ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีค่าความเชื่อมั่นทางสถิติสูง ตั้งแต่ 80-100% และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเพราะส่วนใหญ่มาจากแหล่งพื้นที่เดียวกันหรือในภูมิภาคใกล้เคียงกัน คือ *Curcuma* sp. (รางจืด) กับ *Curcuma* sp. (2199) มีความเชื่อมั่นทางสถิติสูง 98% *Curcuma* sp. (ม้าฮ้อเล็ก) กับ *Curcuma* sp. (ขมิ้นร้อยเอ็ด) มีความเชื่อมั่นทางสถิติ 86% และ *Curcuma* sp. (2207) กับ *Curcuma sp.* (2174) มีความเชื่อมั่นทางสถิติ 97%

ตาราง 4.3 แสดงอัตราการเกิด transition (Ts) และ transversion (Tv) จากการใช้ไพรเมอร์ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA)

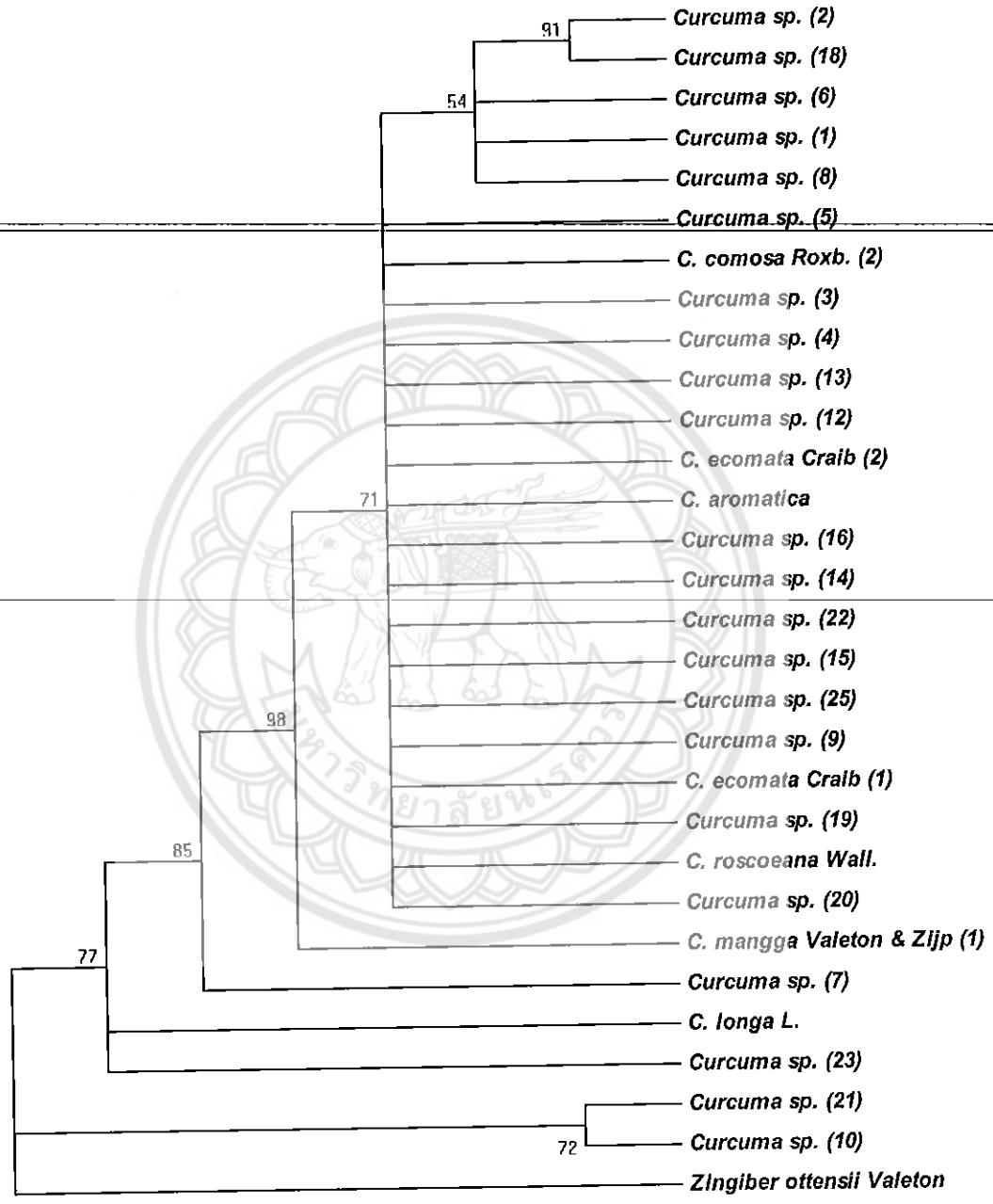
Alignment	Base				Ts	Tv	Ts/Tv
	A	T	C	G			
1,048	31.2%	36.1%	15.3%	19.2%	3.347	1.915	1.747

ตาราง 4.4 แสดงองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trnL* (UAA)-*trnF* (GAA)

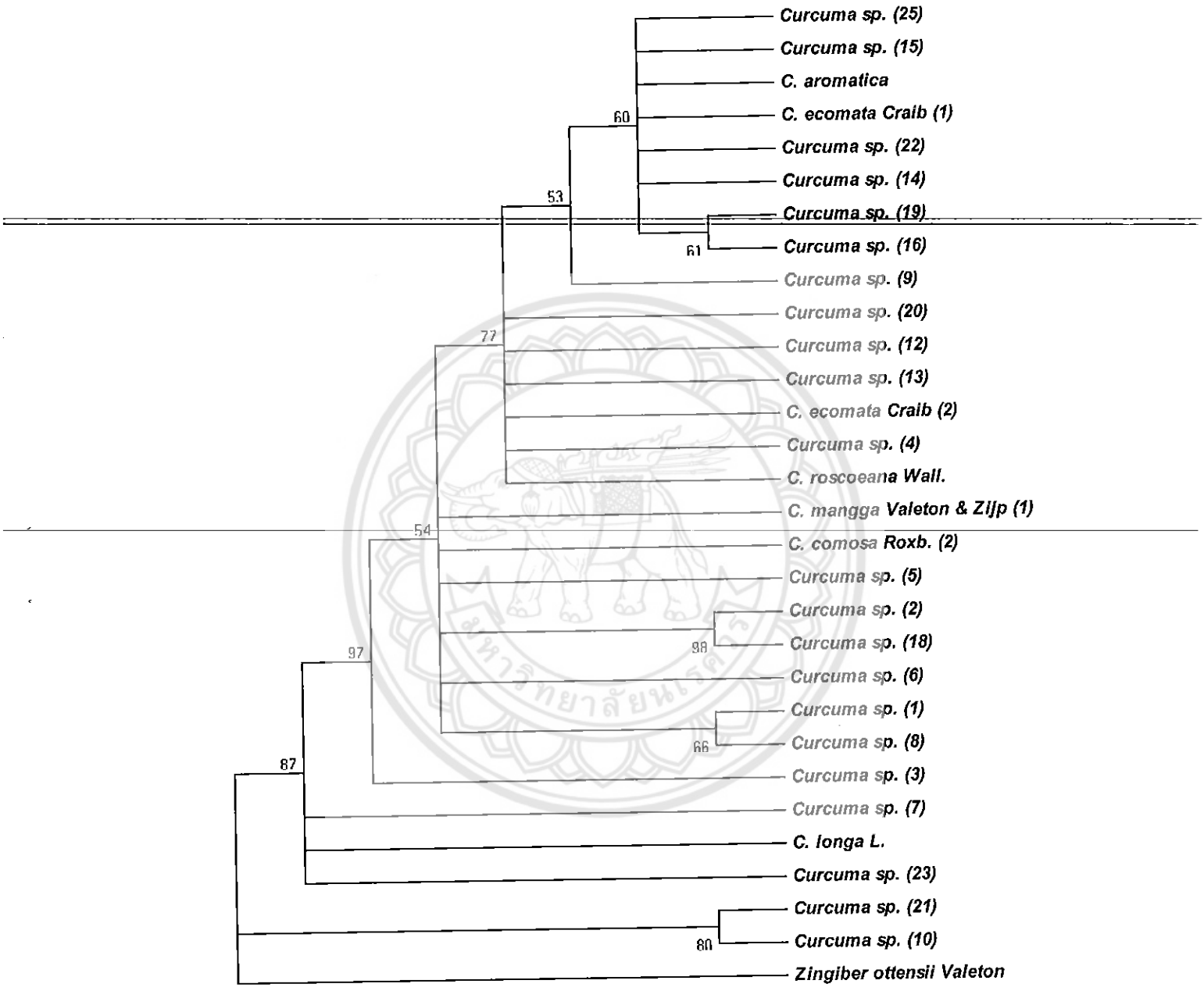
Sample	(Thymine) %	(Cytosine) %	(Adenine) %	(Guanine) %	% AT	% GC
Curcuma longa L.	35.7	15.1	30.9	18.3	66.6	33.4
Curcuma sp. (Unknown)	35.3	14.9	30.8	19.0	66.2	33.8
Curcuma sp. (2221)	36.1	14.6	30.9	18.5	66.9	33.1
Curcuma sp. (2207)	35.9	14.9	31.0	18.2	66.9	33.1
Curcuma sp. (2174)	35.8	14.9	31.0	18.3	66.8	33.2
Zingiber ottensii Valeton	36.1	15.0	30.9	18.1	67.0	33.0
Curcuma sp. (ขมิ้นทอง)	35.5	15.3	30.9	18.3	66.4	33.6
Curcuma sp. (ม้าย้อเล็ก)	35.8	15.2	30.8	18.3	66.6	33.4
Curcuma sp. (รางจืด)	35.8	15.1	30.8	18.2	66.6	33.4
Curcuma sp. (2199)	35.7	15.1	30.7	18.4	66.4	33.6
Curcuma comosa Roxb. (2195)	35.6	15.1	30.9	18.4	66.5	33.5
Curcuma sp. (ห้าร้อยนาง)	35.0	14.7	31.2	19.2	66.2	33.8
Curcuma sp. (ทรหด)	35.5	15.1	31.1	18.3	66.6	33.4
Curcuma sp. (ขมิ้นร้อยเอ็ด)	35.6	15.2	31.0	18.1	66.6	33.4
Curcuma mangga Valeton & Zijp (1)	35.4	15.4	30.6	18.5	66.0	34.0

ตาราง 4.4 (ต่อ)

Sample	(Thymine) %	(Cytosine) %	(Adenine) %	(Guanine) %	% AT	% GC
Curcuma ecomata Craib (1)	35.8	15.2	30.7	18.4	66.5	33.5
Curcuma aromatic Salisb. (นางคำ)	35.8	15.1	30.9	18.2	66.7	33.3
Curcuma sp. (2226)	35.8	15.1	30.8	18.3	66.6	33.4
Curcuma sp. (2201)	35.6	15.2	30.9	18.3	66.5	33.5
Curcuma sp. (ขมิ้นสีคิ้ว)	35.9	15.0	30.7	18.4	66.6	33.4
Curcuma sp. (2191)	35.7	15.2	30.8	18.3	66.5	33.5
Curcuma sp. (2193)	35.8	15.3	30.7	18.3	66.5	33.5
Curcuma sp. (2219)	35.7	15.0	30.9	18.4	66.6	33.4
Curcuma sp. (2189)	35.8	15.1	30.8	18.3	66.6	33.4
Curcuma sp. (พญาว่าน)	35.9	14.9	30.9	18.3	66.8	33.2
Curcuma sp. (2184)	35.8	15.1	30.8	18.3	66.6	33.4
Curcuma sp. (2204)	35.8	15.1	30.8	18.3	66.6	33.4
Curcuma roscoeana Wall.	35.8	15.2	30.7	18.4	66.5	33.5
Curcuma sp. (2182)	35.9	15.0	30.9	18.2	66.8	33.2
Curcuma ecomata Craib (2)	35.8	14.9	31.2	18.1	67.0	33.0
Avg.	**35.7**	**15.1**	**30.9**	**18.4**	**66.6**	**33.4**



ภาพที่ 4.45 Phylogenetic tree โดยวิธี Maximum parsimony จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) โดยใช้ *Zingiber ottensii* Valeton (ไพลดำ) เป็น out group



ภาพที่ 4.46 Phylogenetic tree โดยวิธี Maximum Likelihood จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) โดยใช้ *Zingiber ottensii* Valeton (ไพลดำ) เป็น out group

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ โดยมีการเปลี่ยนแปลงและการแทนที่ของเบส พบว่าไพรเมอร์ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) มีค่า transition (Ts) สูงกว่าค่า transversion (Tv) ส่วนไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) นั้นจะมีค่า transversion (Tv) สูงกว่าค่า transition (Ts) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันมากกว่า และเหมาะสมที่จะใช้ในการจำแนกพืชสกุลขมิ้นได้ดีกว่าไพรเมอร์ *trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) และจากการสร้าง Phylogenetic tree แบบวิธี Maximum parsimony (MP) และ Maximum Likelihood ของทั้ง 2 บริเวณ พบว่า วิธี ML สามารถใช้ในการจำแนกได้ดีกว่าวิธี MP ซึ่งให้ผลที่เหมือนกัน แต่ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของทั้ง 2 บริเวณ พบว่า ให้ผลที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างในการวิเคราะห์ไม่เท่ากัน อย่างไรก็ตามทั้ง 2 บริเวณ ให้ผลสอดคล้องกันคือ *Curcuma* sp. (2189) กับ *C. aromatic* (นางคำ) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และมี *Zingiber ottensii* Valeton (ไพลดำ) เป็น out group เช่นเดียวกัน ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันนั้นเนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ค่อนข้างเหมือนกัน โดยมีตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มขึ้นมาและขาดหายไป (Indels) เท่ากับ 25 ตำแหน่ง และจะเห็นได้ว่าการศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถจำแนกพืชในสกุลขมิ้นออกเป็นกลุ่มได้ชัดเจน รวมทั้งตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาส่วนใหญ่ยังไม่สามารถระบุชนิดของพืชที่แน่นอนได้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปและข้อเสนอแนะผลการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธาน

จากการศึกษาพืชสกุลขมิ้นที่ได้ทำการศึกษาตัวอย่างพรรณไม้ จากหอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่จำนวน 65 ตัวอย่าง และหอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรจำนวน 20 ตัวอย่าง จากการศึกษาและตรวจสอบลักษณะ ให้ได้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลนี้ สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม 21 ชนิด

ตาราง 5.1 การจัดกลุ่มของพืชสกุลขมิ้น

กลุ่ม	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย
Alismatifolia 4 ชนิด	*Curcuma alismatifolia* Gagnep.	ปทุมมา
	Curcuma gracillima Gagnep.	กระเจียว
	Curcuma harmandii Gagnep.	ช่อมรกต
	Curcuma parviflora Wall.	กระเจียวหิ่งห้อย
Cochinchinesis 1 ชนิด	*Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep.	มหาอุดมขาว
Ecomata 4 ชนิด	*Curcuma bicolor* Mood & K. Larsen	กระเจียวสองสี
	Curcuma ecomata Craib	กระเจียวสุเทพ
	Curcuma flaviflora S.Q. Tong	กระเจียวเหลือง
	Curcuma glans K. Larsen & Mood	กระเจียว
Eucurcuma 8 ชนิด	*Curcuma aeruginosa* Roxb.	ว่านมหาเมฆ
	Curcuma amada Roxb.	ขมิ้นขาวป่า
	Curcuma angustifolia Roxb.	อาวแดง
	Curcuma comosa Roxb.	ว่าชักมดลูก
	Curcuma longa L.	ขมิ้นชัน
	Curcuma rubescens Roxb.	กระเจียวกาบแดง
	Curcuma zedoaria (Christm.) Roscoe	ขมิ้นอ้อย

ตาราง 5.1 (ต่อ)

กลุ่ม	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย
	Curcuma plicata Wall.	-
Petiolata 4 ชนิด	*Curcuma aurantiaca* Zijp	ว่านปด
	Curcuma petiolata Roxb.	บัวชั้น
	Curcuma roscoeana Wall.	กระเจียวส้ม
	Curcuma rubrobracteata Škorničk., M. Sabu & Prasanthk.	ว่านงูเห่า

อภิปรายผลการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธาน

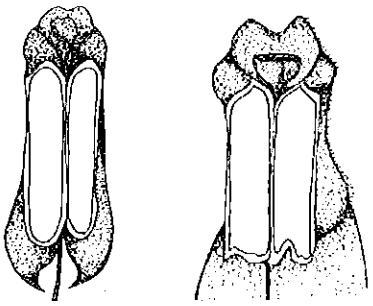
การศึกษาพืชสกุลขมิ้นได้ศึกษาตัวอย่างจากหอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (CMUB) ซึ่งได้ทำการยืมตัวอย่างพรรณไม้ของพืชสกุลขมิ้นทั้งหมด 65 ตัวอย่าง จำแนกได้ 15 ชนิด และไม่ใช่พืชสกุลขมิ้นอีก 1 ชนิด ในส่วนของหอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (PNU) ได้ทำการศึกษาตัวอย่างพรรณไม้ 20 ตัวอย่าง สามารถระบุชนิดได้ 6 ชนิด จากการศึกษาตัวอย่างพรรณไม้ที่ถูกเก็บรักษาไว้ในแต่ละมหาวิทยาลัย พบว่าพืชสกุลขมิ้นไม่มีชนิดเดียวกัน เนื่องจากตัวอย่างพรรณไม้จาก มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่จัดเก็บไว้เป็นตัวอย่างที่ถูกจัดเก็บบริเวณแปลงเพาะปลูกเพื่องานวิจัย และมักมีสรรพคุณเป็นพืชสมุนไพร ส่วนตัวอย่างพรรณไม้จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นตัวอย่างที่ถูกจัดเก็บโดยการสำรวจและออกพื้นที่ ในบริเวณต่างๆทั่วประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน ทำให้พืชสกุลขมิ้นมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง

ตัวอย่างพรรณไม้ของพืชสกุลขมิ้นจากหอพรรณไม้ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่มีจำนวนตัวอย่างมากที่สุด คือ *Curcuma parviflora* Wall. มีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 13 ตัวอย่าง รองลงมาคือ *Curcuma ecomata* Craib ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง *Curcuma plicata* Wall. ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep. ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง *Curcuma glans* K. Larsen & Mood ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep. ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง *Curcuma bicolor* Mood & K. Larsen และ *Curcuma longa* L. ทั้งหมดชนิดละ 3 ตัวอย่าง นอกจากนี้มีชนิดที่มีจำนวนตัวอย่างน้อยกว่า 3 ตัวอย่าง ได้แก่ *Curcuma alismatifolia* Gagnep., *Curcuma aurantiaca* Zijp, *Curcuma flaviflora* S.Q. Tong และ *Curcuma gracillima* Gagnep. ตัวอย่างพรรณไม้ของพืชสกุลขมิ้นจากหอพรรณไม้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยที่ สามารถระบุชนิด ได้ 6 ชนิด คือ *Curcuma amada* Roxb., *Curcuma comosa* Roxb., *Curcuma rubescens* Roxb., *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe, *Curcuma roscoeana* Wall. และ *Curcuma rubrobracteata* Škorničk., M. Sabu & Prasanthk.

ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการจัดกลุ่มของพืชสกุลขมิ้น โดยได้ใช้เกณฑ์การจัดกลุ่มจากวิทยานิพนธ์ของ Maknoi (2006) โดยในการจัดกลุ่มแต่ละกลุ่มได้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และใช้ลักษณะของอับเรณูในการจำแนกกลุ่ม แต่การจำแนกชนิดของพืชสกุลขมิ้นนั้น จำเป็นต้องศึกษาและอาศัยลักษณะอื่นด้วย ได้แก่ สีและขนาดของเหง้า สีและขนาดของลำต้นเหนือดิน ลักษณะใบ ช่อดอก และการเจริญของช่อดอกลักษณะและสีของใบประดับ และส่วนประกอบของดอก

ในการศึกษาพืชสกุลขมิ้นทั้งหมด 21 ชนิด ซึ่งมีรายงานว่าในประเทศไทยพบ 38 ชนิด (Siriruga et al., 2007) โดยตัวอย่างพรรณไม้ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ถูกเก็บจากสถานที่ที่แตกต่างกัน ทำให้พืชสกุลขมิ้นบางชนิด ที่ถูกระบุว่าอยู่ภายในชนิดเดียวกัน มีลักษณะต่างกัน ซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระจายพันธุ์ ที่เป็นสาเหตุให้เกิดความแปรผันทางธรรมชาติ นอกจากนี้การจัดจำแนกพืชสกุลขมิ้นภายในกลุ่มยังมีลักษณะร่วมที่ทำให้สามารถจัดไว้ในกลุ่มเดียวกันได้ ดังนี้

กลุ่มปทุมมา (Alismatifolia) เป็นกลุ่มที่มีลักษณะอับเรณูไม่มีเดือย อีกทั้งรังไข่ผิวเกลี้ยง ไม่มีต่อมน้ำหวาน ได้ทำการศึกษา 4 ชนิดจากตัวอย่างพรรณไม้ทั้งหมด 19 ตัวอย่าง ได้แก่ *Curcuma alismatifolia* Gagnep., *Curcuma gracillima* Gagnep., *Curcuma harmandii* Gagnep. และ *Curcuma parviflora* Wall. จากการศึกษาพบว่า Gagnep., *Curcuma gracillima* Gagnep., *Curcuma harmandii* Gagnep. และ*Curcuma parviflora* Wall. ลักษณะอับเรณูของทั้งสามชนิดนี้มีขนปกคลุมทั่วอับเรณู ซึ่งแตกต่างจาก *Curcuma alismatifolia* Gagnep. ที่ผิวเกลี้ยงไม่มีขนปกคลุม โดยลักษณะอับเรณูของกลุ่มปทุมมา (Alismatifolia) ที่ศึกษามีลักษณะสอดคล้องกับวิทยานิพนธ์ของ Maknoi (2006) ที่ได้ทำการศึกษาพืชสกุลขมิ้นในประเทศไทย ต่อมาได้ทำการศึกษาพืชสกุลขมิ้นในกลุ่มมหาอุดม (Cochinchinesis) จากตัวอย่างพรรณไม้ทั้งหมด 6 ตัวอย่างซึ่งได้ทำการศึกษา *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep. โดยการมี aff. หรือ affinis หมายความว่า พืชสกุลขมิ้น 2 ชนิดนี้มีความใกล้เคียงกับ *Curcuma cochinchinensis* Gagnep. พบว่าลักษณะอับเรณูของชนิดนี้แตกต่างกัน ลักษณะอับเรณู ก มีลักษณะจะงอยเป็นรูปหัวใจ เดือยอับเรณูป้อมสั้นปลายแหลม ผิวอับเรณูเกลี้ยง ไม่มีขน ซึ่งมีลักษณะสอดคล้องกับวิทยานิพนธ์ของ Maknoi (2006) (ภาพที่ 5.1 ก) และลักษณะอับเรณู ข ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างออกไปคือ การมีขนปกคลุมทั่วอับเรณู และอับเรณูไม่มีเดือย การแปรผันเหล่านี้อาจเกิดจากการกระจายพันธุ์ และระบบนิเวศของพืชสกุลขมิ้นที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 5.1 ข)



ก ข

ภาพที่ 5.1 ลักษณะอับเรณูของ *Curcuma* aff. *cochinchinensis* Gagnep.

ก. ตัวอย่างพรรณไม้ S. Chongko 529 (CMUB)

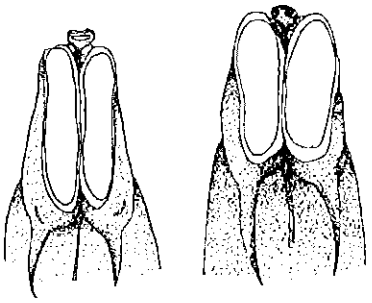
ข. ตัวอย่างพรรณไม้ J.F. Maxwell 93-689 (CMUB)

กลุ่มกระเจียวสุเทพ (Ecomata) การศึกษาพืชสกุลขมิ้นในกลุ่มนี้ได้ทำการศึกษาทั้งหมด 4 ชนิด ศึกษาจากตัวอย่างพรรณไม้ทั้งหมด 18 ตัวอย่างโดยที่ทำการศึกษาโครงสร้างสืบพันธุ์ 3 ชนิด ได้แก่ *Curcuma bicolor* Mood & K.Larsen, *Curcuma ecomata* Craib และ *Curcuma glans* K. Larsen & Mood อีก 1 ชนิด ได้ทำการศึกษาเฉพาะตัวอย่างพรรณไม้แห้งทำให้ไม่สามารถศึกษาลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์ได้ คือ *Curcuma flaviflora* S.Q. Tong โครงสร้างสืบพันธุ์ของกลุ่มนี้มีลักษณะอับเรณู ยาว 10-14 มิลลิเมตร ซึ่งมีลักษณะสอดคล้องกับวิทยานิพนธ์ของ Maknoi (2006) ซึ่งลักษณะเหล่านี้ทำให้แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้กลุ่มกระเจียวสุเทพยังมีลักษณะโครงสร้างที่ไม่ใช่โครงสร้างสืบพันธุ์ ร่วมกันคือ การไม่มีใบประดับส่วนบน (coma bract) และลักษณะของดอกเป็นดอกแบบบาน (open form) เกิดจากเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminodes) ไม่ถูกปกคลุมด้วยกลีบดอกด้านบน

กลุ่มขมิ้นแท้ (Eucurcuma) กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด มักนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพร โดยมีการเพาะปลูกทั่วไป ลักษณะของอับเรณูในกลุ่มนี้มีลักษณะเด่นคือ การมีเดือยอับเรณูยาวแหลมชี้ลง ปลายยอดเกสรเพศเมียเปิดด้านข้าง ได้ทำการศึกษา 8 ชนิด ตัวอย่างพรรณไม้ทั้งหมด 18 ตัวอย่าง ได้แก่ *Curcuma aeruginosa* Roxb., *Curcuma amada* Roxb., *Curcuma angustifolia* Roxb., *Curcuma comosa* Roxb., *Curcuma longa* L., *Curcuma rubescens* Roxb., *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe และ *Curcuma plicata* Wall. ซึ่ง *Curcuma plicata* Wall. ยังไม่ได้มีการรายงานในประเทศไทย และไม่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มใดผู้วิจัยจึงได้จัดกลุ่ม *Curcuma plicata* Wall. ไว้ในกลุ่มขมิ้นแท้ (Eucurcuma) เนื่องจากมีลักษณะของเดือยอับเรณูที่เรียวแหลมชี้ลง

อย่างไรก็ตาม *Curcuma plicata* Wall. ยังถูกจัดเป็น complex species ที่ยังมีลักษณะหลากหลายและซับซ้อนภายในชนิดเดียวกัน (ภาพที่ 5.2) อาจจะเป็นลูกผสม หรือ variety ซึ่งควรมี

การศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน การกระจายพันธุ์ นิเวศวิทยา และด้าน DNA เพิ่มเติม เพื่อให้สามารถจำแนกชนิดที่เป็น complex species ได้อย่างถูกต้องชัดเจน



ก ข

ภาพที่ 5.2 อับเรณูของ *Curcuma plicata* Wall. (complex)
ก. ตัวอย่างพรรณไม้ Y. Keawta & S. Sirinanta 2 (CMUB)
ก. ตัวอย่างพรรณไม้ J.F. Maxwell 92-318 (CMUB)

กลุ่มบัวชั้น (Petiolata) จากการศึกษาพืชสกุลขมิ้นในกลุ่มบัวชั้น พบว่าในกลุ่มนี้มีลักษณะของอับเรณูที่แตกต่างกัน โดยที่ได้ทำการศึกษาทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *Curcuma aurantiaca* Zijp ลักษณะเดือยอับเรณูสั้นเรียวแหลม *Curcuma petiolata* Roxb. ลักษณะเดือยอับเรณูเป็นแท่งยาวแหลม *Curcuma rubrobracteata* Škorničk., M.Sabu & Prasanthk. ลักษณะเดือยอับเรณูสั้นปลายแหลมโค้งเข้า และ *Curcuma roscoeana* Wall. ไม่มีเดือยอับเรณู โดยที่ลักษณะอับเรณูของ *Curcuma aurantiaca* Zijp มีลักษณะต่างจากวิทยานิพนธ์ของ Maknoi (2006) ที่ศึกษาพืชสกุลขมิ้นชนิดนี้ภายในประเทศไทย แต่ *Curcuma aurantiaca* Zijp ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาตัวอย่างพรรณไม้ที่พบภายในประเทศกัมพูชา อาจเป็นเพราะการกระจายพันธุ์ ระบบนิเวศวิทยา และสภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน ทำให้ลักษณะของ *Curcuma aurantiaca* Zijp แตกต่างกันไป

ข้อเสนอแนะการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธาน

1. ตัวอย่างพรรณไม้ หอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (PNU) ควรมีการศึกษา ทบทวน และแก้ไขเพิ่มเติม เนื่องจากตัวอย่างพรรณไม้ที่ถูกจัดเก็บไว้ มีตัวอย่างพรรณไม้ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ และตัวอย่างพรรณไม้ที่ระบุชนิดแล้วแต่ยังไม่ได้รับการตรวจสอบ

2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านของการกระจายพันธุ์ และนิเวศวิทยาของพืชสกุลขมิ้น ที่อาจมีผลต่อการแปรผันทางลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชสกุลนี้

3. การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นวิธีพื้นฐานของการจัดจำแนกพืชสกุลนี้ แต่ยังมีลักษณะบางอย่างที่อาจยังทำให้เกิดความสับสน อาจมีการทำ DNA เพิ่มเติมเพื่อใช้จำแนกในระดับโมเลกุลต่อไป

สรุปผลการศึกษาทางด้านอณูชีวโมเลกุล

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบของพืชสกุลขมิ้นโดยใช้วิธี CTAB Method ที่ดัดแปลงมาจากของ Agrawal *et al.*, (1992) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมากและคุณภาพค่อนข้างดี เมื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะเห็นได้ว่ามีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 10 กิโลเบส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่อยู่ระหว่างยีนในคลอโรพลาสต์ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 14 ไพรเมอร์ พบว่ามี 2 ไพรเมอร์ ที่แยกความแตกต่างของพืชสกุล *Curcuma* ได้ดีที่สุด คือ ไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) และไพรเมอร์ *trn*L (UAA)- *trn*F (GAA) โดยมีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1,000-1,100 คู่เบส และ 1,000 คู่เบส ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าทั้ง 2 บริเวณ มีปริมาณเบสอะดีนีน (adenine) และเบสไธมีน (Thymine) รวมกันมากสุด โดยมีค่าเฉลี่ยของ AT rich เท่ากับ 67.7% และ 66.6% ตามลำดับ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากการใช้ไพรเมอร์ *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) และไพรเมอร์ *trn*L (UAA)- *trn*F (GAA) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU) ให้ผลการจำแนกพืชสกุลนี้ดีกว่า และมีค่า Informative sites ที่สูงกว่าบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn*L (UAA)- *trn*F (GAA) ส่วนการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของทั้ง 2 บริเวณ พบว่าการจำแนกพืชสกุลนี้ค่อนข้างต่างกัน และไม่สามารถจำแนกพืชในสกุลนี้ออกเป็นกลุ่มได้ชัดเจน รวมทั้งตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาส่วนใหญ่ยังไม่สามารถระบุชนิดของพืชที่แน่นอนได้ แต่อย่างไรก็ตามทั้ง 2 บริเวณ ให้ผลที่สอดคล้องกันคือ *Curcuma* sp. (2189) กับ *Curcuma aromatic* Salisb. (นางคำ) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และมี *Zingiber ottensii* Valeton (ไพลดำ) เป็น out group เช่นเดียวกัน โดยการศึกษาครั้งนี้จะสมบูรณ์มากขึ้นถ้าได้ศึกษาร่วมกับข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา และข้อมูลทางด้านกายวิภาคของพืช

ข้อเสนอแนะการศึกษาด้านอณูชีวโมเลกุล

1. ควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างยีนในคลอโรพลาสต์ในการศึกษาให้มากกว่านี้ เพื่อให้ข้อมูลที่ได้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

2. ในการจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืช ควรทำการศึกษาร่วมกันกับข้อมูลทางด้านอื่นๆ เช่น ข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา และข้อมูลทางด้านกายวิภาควิทยาของพืช เพื่อให้การจำแนกพืชมีความน่าเชื่อถือและถูกต้องมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

จรัญ มากน้อย และพวงเพ็ญ ศิริรักษ์. (2555). **พืชสกุลขมิ้นในประเทศไทย.** (พิมพ์ครั้งที่ 1). เชียงใหม่: องค์การสวนพฤกษศาสตร์

พวงเพ็ญ ศิริรักษ์. (2008). การศึกษาพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ในประเทศไทย. **NU Science Jornal,** 5(2), 119-128

สุธรรม อารีกุล. (2552).**องค์ความรู้เรื่องพืชป่าทางภาคเหนือของประเทศไทย** เล่ม 1-3. เชียงใหม่ : มูลนิธิโครงการหลวง

Chaveerach, A., Sudmoon, R. and Tanee, T. (2008). Two new species of *Curcuma* (Zingberaceae) used as cobra-bite antidotes. **Journal of Systematic and Evolution.** 46(1). 80-88

Chen, J., Lindstrom, A.J., and Xia, N. (2015). *Curcuma woodii* (Zingiberaceae), a new species from Thailand. **Plantotaxa.** 227(1). 075-082

Chen, J. and Xia, N. H. (2011). Pollen morphology of Chinese Curcuma L. and Boesenbergia Kuntz (Zingiberaceae): Taxonomic implications, Flora 206: 458-467

Chen, J. Zhao, J., Erickson, D. L. Xia, N. and Kress, W. J. (2015). Testin DNA barcodes in closely related species of *Curcuma* (Zingiberaceae) from Myanmar and China, Mol. Ecol. Resour. 15: 337-348

Hayakawa, H., Kabayashi, T., Minaniya, Y., Ito, K., Miyazaki, A. and Fukuda, T. (2011). Development of a molecular marker to indentified a candidate line of Turmeric (*Curcuma longa* L.) with a high curcumin content, Am. J. Bot. 2: 15-26

Khumkratok, S., Boongtiang, K., Chutichudet, P. and Pramaul, P. (2012). Geographic Distribution and Ecology of Ornamental *Curcuma* (Zingiberaceae) in Northeastern Thailand. **Pakistan Journal of Biological Sciences.** 15(19). 929-935

Larsen, K. and Larsen, S.S. (2006). **Gingers of Thailand.** Chaing Mai: Queen Sirikit Botanic Garden

Larsen, K. and Smith, R.M. (1978). A New Species of *Curcuma* from Thailand. **The Royal Botanic Garden Edinburgh.** 36(2). 269-271

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

Maknoi, C., Sirirugsa, P. and Larsen, K. (2005). New record of *Curcuma* L. (Zigiberaceae) in Thailand. **Thai Forest Bulletin.** 33. 71-74

Maknoi, C. and Jenjittikul, T. (2006). A New Species of *Curcuma* L. (Zingiberaceae) from Southest Asia. **Gardens' Bulletin Singapore.** 58. 41-46

Maknoi, C., Sirirugsa, P. and Larsen, K. (2011). *Curcuma bella* (Zingiberaceae), a new species from Thailand. **Thai Journal of Botany.** 3(2). 121-124

Ngamriabsakul, C. (2005). Morphological study of the versatile anther group in the Tribe Zingibereae (Zingiberaceae). **Walailak Journal of Science and Technology**. 2(1): 11-21

Paliwal, P., Pancholi, S.S. and Patel, K.R. (2011). Pharmacognostic parameter for evauation of the rhizomes of *Curcuma caesie* Roxb. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**. 2(1), 56-61

Shaw. J., Lickey, E. and Schilling, E. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenitic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III, Am. J. Bot. 94: 275-288

Sirirugsa P., Lasen K. and Maknoi C. (2007). The Genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae): Distribution and Classification with Reference to Species Diversity in Thailand. **Gardens' Bulletin Singapore**. 59(1&2), 203-220

Singh, S. (2007). From exotic species to modern drug, Cell 130: 765-768

Skornickova, j. Sida, O., Jarolimova, V., Sabu, M., Fer, T., Trvnicek, P. and Suda, J., (2007). Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae), Ann. Bot. 100:505-526

Velayudhan K.C., Dikshit N. and Abdul Nizar M. (2012). Ethnobotany of turmeric (*Curcuma longa* L.). **India Journal of Traditional Knowledge**. 11(4), 607-614

Záveská, 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: 744-763

ภาคผนวก ก

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการและผลที่ได้รับ

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการและผลที่ได้รับ

การศึกษาทางอนุกรมวิธานและสัณฐานวิทยา

8.1.1 พืชที่ใช้ในการทำงานวิจัย

-ตรวจตัวอย่างจากหอพรรณไม้ เพื่อให้ทราบข้อมูลการพบพืชแต่ละชนิดว่าพบได้ที่ไหนบ้าง ตรวจดูชีพลักษณ์ เพื่อเก็บตัวอย่างที่สมบูรณ์ ขณะที่ออกดอก และผล อย่างน้อย 10 ชนิด

-ซื้อตัวอย่างจากตลาด เช่น ร้านขายสมุนไพร วัดมหาธาตุวรมหาวิหาร (วัดใหญ่) เพื่อปลูก เก็บใบทำดีเอ็นเอและดูการออกดอก เพื่อนำมาศึกษาทางสัณฐานวิทยา และทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งเป็นตัวอย่างหลักฐาน

-ถ้าเป็นตัวอย่างธรรมชาติ เก็บตัวอย่าง เก็บชนิดละ 2 ตัวอย่าง (sample) เป็น 3 ส่วนคือ 1) ทำตัวอย่างพรรณ

ไม้แห้ง เพื่อเป็นตัวอย่างหลักฐานและเก็บดอกและผลดองแอลกอฮอล์ 70% เพื่อใช้ศึกษาทางสัณฐานวิทยา 2) เก็บใบอ่อนใส่สิริกาเจล เพื่อใช้ศึกษาทางชีวโมเลกุล 3) เก็บตัวอย่างปลูก เพื่อเตรียมความพร้อมของตัวอย่างที่จะใช้ในการศึกษาสารเคมีของสกุลขมิ้น และเป็นการรวบรวมพันธุกรรมของขมิ้น

8.1.2 การออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสอนุรักษ์ (conserved region) ของ ยีน และบริเวณ non-coding region ในคลอโรพลาสต์

8.1.2.1 สืบค้นและรวบรวมข้อมูลลำดับเบสของยีน และบริเวณ non-coding region ในคลอโร

พลาสต์ จากพืชสกุล *Curcuma* ในฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

8.1.2.2 ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ จาก ยีน และ non-coding region 5 บริเวณ ในคลอโร

พลาสต์ จากพืชสกุล *Curcuma* ที่ได้จากการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูล

8.1.3 การหาลำดับดีเอ็นเอของ ยีน และ non-coding region 5 บริเวณในคลอโรพลาสต์

8.1.3.1 สกัดดีเอ็นเอจากส่วนใบของพืชสกุล *Curcuma* โดยดัดแปลงวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชของ Doyle and Doyle, 1990

8.1.3.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณยีน และ non-coding region ของ chloroplast จากไพรเมอร์ ที่ออกแบบไว้ในข้อ 8.1.2.2

8.1.3.3 Purified DNA จาก PCR โดยใช้ชุดสารละลาย QIA PCR purification kit (QIAGEN)

8.1.3.4 หาลำดับดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (Macrogen, Korea)

8.1.4 วิเคราะห์ข้อมูล

8.1.4.1 นำลำดับดีเอ็นเอที่ได้มารวมกัน (sequence assembly) โดยโปรแกรม DNA baser หลังจากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้แต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบกัน (Alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) และ Gendoc (Nicholas *et al.*, 1997)

8.1.4.2 วิเคราะห์ข้อมูลการด้วยโปรแกรม PAUP (Swofford, 2002) และ MEGA 6 (Tamura et al., 2007) โดยวิธีที่ใช้สร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี maximum likelihood และ maximum parsimony โดยแต่ละวิธีทำการตรวจสอบค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 ซ้ำ

8.2 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

-ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

-สวนพรรณไม้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

-หอพรรณไม้ BKF, BCU, CMU, KKU, PSU และ QBG

กิจกรรมที่วางแผน	กิจกรรมที่ได้ดำเนินการ
1. การออกแบบไพรเมอร์จาก ลำดับเบสอนุรักษ์ (conserved region) ของ ยีน และ non-coding region ดีเอ็นเอใน chloroplast/-ตรวจตัวอย่าง	ได้ไพรเมอร์ที่ใช้ ได้ศึกษาตัวอย่างจากหอพรรณไม้ และออกภาคสนามเพื่อเก็บตัวอย่างมาสกัดดีเอนเอ
1.1 สืบค้นและรวบรวมข้อมูลจากฐานข้อมูล/ตรวจตัวอย่างพรรณไม้แห้งจากหอพรรณไม้ต่างๆ	ได้ศึกษาแล้วและอยู่ใส่วนของทบทวนเอกสารและบทนำในผลงานตีพิมพ์
1.2 ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์	ได้ดำเนินการแล้ว
2. การหาลำดับดีเอ็นเอของ ยีน และ non-coding region ใน chloroplast/เก็บตัวอย่างพืช	ได้ทำการส่งดีเอนเอไป sequence เก็บตัวอย่าง/ออกภาคสนาม เก็บตัวอย่างหลักฐาน
2.1 เก็บตัวอย่างสกัดดีเอ็นเอของพืชสกุล *Curcuma*	ได้ดำเนินการแล้ว
2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณยีน และ non-coding region ใน chloroplast	ได้ดำเนินการแล้ว
2.4 หาลำดับดีเอ็นเอของ ยีน และ non-coding region ของ chloroplast	ได้ดำเนินการแล้ว
3. การวิเคราะห์ข้อมูล	ได้ดำเนินการแล้ว และเสนอตีพิมพ์ที่ วารสาร มสด. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
3.1 เปรียบเทียบ (alignment) ลำดับดีเอ็นเอจากบริเวณ ยีน และ non-coding region ใน chloroplast	ได้ดำเนินการแล้ว
3.2 วิเคราะห์ข้อมูลทางชีวโมเลกุลและสัณฐานวิทยาระบุชนิด	ได้ดำเนินการแล้ว
3.3 สรุปข้อมูลผลการทดลองเขียนรายงานการทดลอง	ได้ดำเนินการแล้ว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (ระบุ ผู้ใช้ประโยชน์ หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์)

ทำให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา การวิจัย และปรับปรุงพันธุ์ของพืชในสกุล *Curcuma* ทั้งของภาครัฐและเอกชน สามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการศึกษาวิจัยต่อยอดได้ ผลการวิจัยที่ได้ครั้งนี้ได้นำตีพิมพ์เผยแพร่ลงใน "วารสารวิจัย มสด สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (SDU Research Journal: Sciences and technology)"

ภาคผนวก ข

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

Research Article

Received: February 21, 2018; Accepted: March 19, 2018

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 มหาวิทยาลัยนเรศวร 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 ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีนในคลอโรพลาสต์บริเวณ *trn*S(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 wildly 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

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** pattamons@nu.ac.th

techniques provide valuable tools for identification and accurate detection. Therefore, in this study, sequences data from non-coding region of chloroplast DNA, *trn*S (UGA)-*trn*fM (CAU), were used to elucidate phylogenetic relationships and identification within 19 samples of 10 species and 1 unknown sample of *Curcuma*. The *trn*S (UGA)-*trn*fM (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] มีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มักพบบริเวณป่าเต็งรัง ป่าเบญจพรรณ ป่าดิบแล้ง และป่าสน เป็นต้น การจัดกลุ่มพืชในสกุลขมิ้นที่พบในประเทศไทย แบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มปทุมมา (Alismatifolia) กลุ่มมหาอุดม (Cochinchinensis) กลุ่มกระเจียวสุเทพ (Ecomata) กลุ่มขมิ้นแท้ (Eucurcuma) และกลุ่มบัวชั้น (Petiolata) [3] พืชสกุลขมิ้นเป็นพืชสมุนไพร มีประโยชน์ในการรักษาโรคหลายชนิด เช่น บรรเทาอาการอาหารไม่ย่อย รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ลดการบีบตัวของลำไส้ และมีสารออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย มีสาร curcuminoid อยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก เป็นสารที่สำคัญในการรักษาโรค และยังใช้เป็นเครื่องเทศ แต่งกลิ่นและสีของอาหาร เครื่องสำอาง บางชนิดมีใบหรือดอกสวยงามสามารถปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับ และจัดเป็นพืชเศรษฐกิจ [4,5]

การจำแนกพืชสกุลขมิ้นโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะเหง้า สีของเหง้า ตำแหน่งช่อดอก สีและรูปร่างของดอก ยังมีความสับสนอยู่มากและไม่ชัดเจน เนื่องจากเกิดความผันแปรของลักษณะต่าง ๆ ตามสภาพแวดล้อม ทำให้พืชสกุลขมิ้นต่างชนิดกันแต่อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกันมีลักษณะบางประการเหมือนกัน ดังนั้นจึงต้องอาศัยวิธีการอื่นมาช่วยในการจัดจำแนก ซึ่งปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล เช่น การใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาช่วยในการจำแนกพืช และสามารถบอกถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชแต่ละชนิดได้ ซึ่งการใช้นิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์มาจัดจำแนกพืชเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่นิยมนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีข้อได้เปรียบ คือ คลอโรพลาสต์มีจีโนมขนาดเล็ก ยีนในคลอโร

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) มีความเหมาะสมในการนำมาใช้การจำแนกพืชที่มีลักษณะใกล้เคียงกันในระดับพันธุ์ (variety level) หรือระดับประชากร (population level) [6]

มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและจำแนกพืชสกุลขมิ้น โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ 3 บริเวณ คือ *trnL-trnF psbA-trnH* และ *matK* รวมกับบริเวณ 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) ในการจัดจำแนกขมิ้นชัน (*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-psbJ*) พบว่าสามารถจำแนกกระชายได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกชนิดของพืชสกุลกระชายได้ [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] ชั่งพืชตัวอย่าง 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 หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แยกโปรตีนออกจากดีเอ็นเอโดยการเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลิตร และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสด้านบนใส่หลอดใหม่แล้วเติม absolute ethanol 2/3 เท่าของปริมาตรทั้งหมด และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 % ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว

10,000 rpmเป็นเวลา 10 นาที ตากตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติม RNase A (10 mg/ml) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm)

ตารางที่ 1 รายชื่อตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย

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

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trn*S (UGA)-*trnf*M(CAU) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

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

2.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ผล

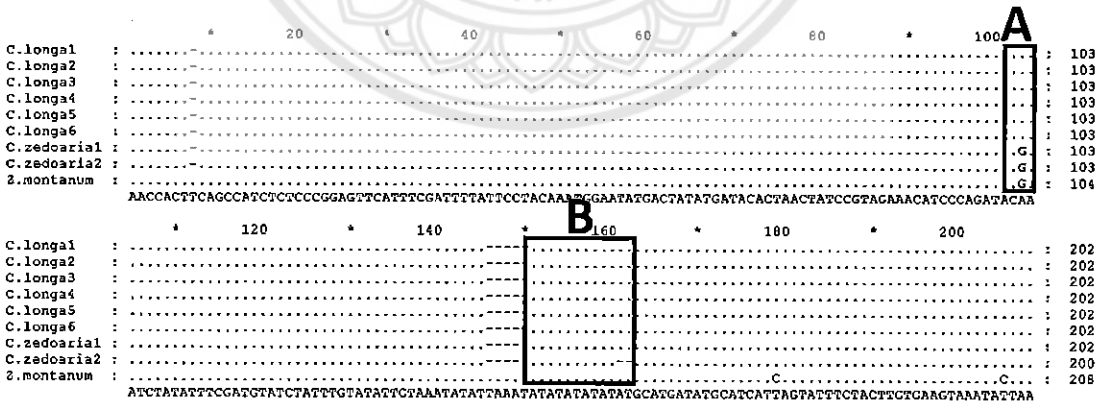
เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามที่ต้องการแล้ว ทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสำเร็จรูปของ Thermo scientific และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnS*(UGA)-*trnfM*(CAU) ของแต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ด้วยโปรแกรม BLAST นำผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 (molecular evolutionary genetics analysis) [14] ด้วยวิธี maximum likelihood แล้วเก็บข้อมูลลำดับดีเอ็นเอดังกล่าวไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยมีหมายเลขลำดับดีเอ็นเอเฉพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

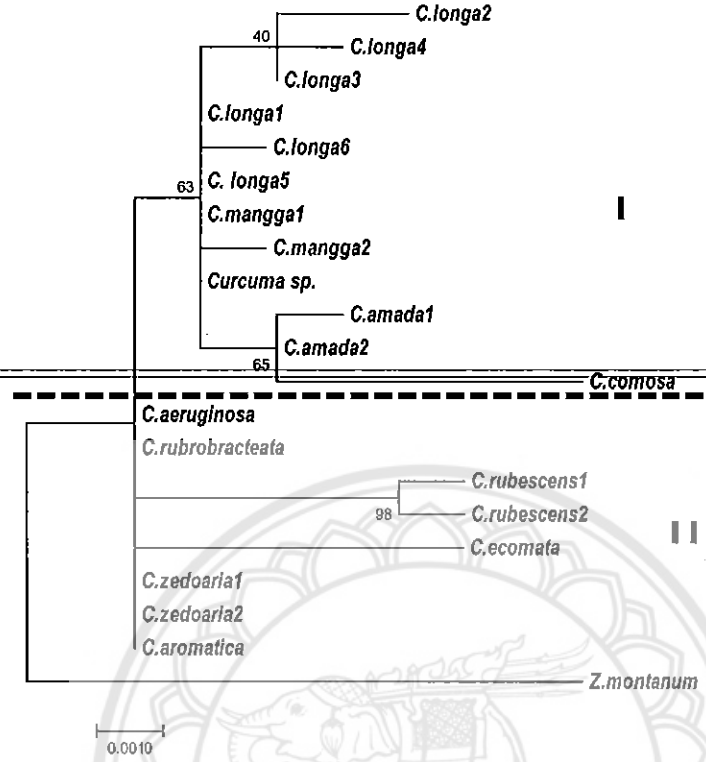
การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *trnS*(UGA)-*trnfM*(CAU) พบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 1,000 คู่เบส มีขนาดที่แตกต่างกับพืชสกุลอื่นในวงศ์ขิง [10] ซึ่งพืชจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ *trnS*(UGA)-*trnfM*(CAU) ระหว่าง 800-1,800 คู่เบส [15] และผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีขนาดอยู่ระหว่าง 997 (*C. rubescens* 2) ถึง 1,004 (*C. longa* 4) คู่เบส นำข้อมูลไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST ซึ่งพบว่าตรงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnS*(UGA)-*trnfM*(CAU) ของพืชสกุลขมิ้นและพืชชนิดอื่น และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 20 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบ (alignment) โดยใช้โปรแกรม ClustalW ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเปรียบเทียบเท่ากับ 1,070 คู่เบส มีค่าการแทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน (transition, Tv) คือ การแทนที่เบสพิวรีนด้วยเบสพิวรีน และการแทนที่เบสไพริมิดีนด้วยเบสไพริมิดีนเท่ากับ 4.134 และมีการแทนที่ระหว่างเบสต่างกลุ่ม (transversion, Ts) คือ การแทนที่เบสพิวรีนด้วยเบสไพริมิดีนและการแทนที่เบสไพริมิดีนด้วยเบสพิวรีนเท่ากับ 2.457 และอัตราส่วน Ts/Tv เท่ากับ 1.413 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปร (variation characters) 35 ตำแหน่ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลในการวิเคราะห์ (information characters) 8 ตำแหน่ง เพราะบริเวณระหว่างยีน *trn*S(UGA)-*trnf*M(CAU) ประกอบด้วยยีน *lhbA* และ *trn*G(UCC) จึงให้ข้อมูลในการวิเคราะห์ค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตาม บริเวณระหว่างยีน *trn*S(UGA)-*trnf*M(CAU) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ คือ AT ตั้งแต่ 2-9 ซ้ำ สามารถใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชได้ ซึ่งขมิ้นชัน (*C. longa*) 6 ตัวอย่าง ที่มาจากแหล่งต่างกัน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 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 *trn*S(UGA)-*trnf*M(CAU) ของพืชสกุลขมิ้น 4 ชนิด พบว่าขมิ้นอ้อยจากประเทศไทยมีจำนวนซ้ำของเบส AT 6 ซ้ำ ในขณะที่ขมิ้นอ้อยจากประเทศญี่ปุ่นจำนวนเบส AT 5 ซ้ำ อาจเป็นเพราะตัวอย่างที่ใช้มีแค่เพียงตัวอย่างเดียวจากประเทศไทย [15] ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trn*S(UGA)-*trnf*M(CAU) สามารถใช้ในการจำแนกขมิ้นชันกับขมิ้นอ้อยได้ ขมิ้นทั้ง 2 ชนิด นี้มีลักษณะของเหง้าที่คล้ายคลึงกันแต่สรรพคุณในการนำมาใช้เป็นสมุนไพรแตกต่างกัน [17]

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



รูปที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trn*S(UGA)-*trnf*M(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. mantanum* เป็น outgroup วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood ที่ค่า bootstrap 1,000

บริเวณ ITS และยีน *mat*K 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 เช่นเดียวกันกับ *C. amada* 1 (พิษณุโลก) *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* จัดอยู่ในกลุ่มบัวชั้น (Petiolata) ส่วน *C. ecomata* อยู่ในกลุ่มกระเจียวสุเทพ (Ecomata) อย่างไรก็ตาม พืชสกุลขมิ้นเหล่านี้มีจำนวนโครโมโซมมากกว่า 2 ชุด (polyploidy) เหมือนกัน [21] จากการจัดกลุ่มพบว่าขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยจัดอยู่คนละกลุ่ม สอดคล้องกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์

ทางพันธุกรรมและการจำแนกขมิ้นด้วยเทคนิคแฮต อาร์เอพีดีจากขมิ้นชัน 6 ชนิด จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยจัดอยู่คนละกลุ่ม [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 จากผลการศึกษายังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnS*(UGA)-*trnfM*(CAU) มีจำนวนซ้ำของเบส AT แตกต่างกัน สามารถใช้ในการจำแนกขมิ้นชันและขมิ้นอ้อย เพื่อแก้ปัญหาการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขมิ้นชัน ซึ่งมักจะมีการปนเปื้อนจากขมิ้นอ้อยเพราะเหง้าของพืชทั้งสองชนิดมีความคล้ายกันมาก อย่างไรก็ตาม การระบุชนิดของพืชสกุลขมิ้นควรเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นในคลอโรพลาสต์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อทำให้สามารถแยกความแตกต่างของพืชสกุลขมิ้นได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

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. (Zingibera ceae): Distribution and classification with reference to species diversity in Thailand, Gardens' Bull. Singapore 59: 203-220.

[3] จรัญ 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): Taxo nomic 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] Záveská, 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., Chusacultanachai, 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 poly morphisms in the *trn*S-*trn*fM 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, ธีระชัย ธนานันต์, บุญหงษ์ จงคิด และนฤมล ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกขมิ้นด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 3(1): 29-35.

[23] Theanphong, O. Thanakijcharoenpath, W., Palanuvej, C., Ruangrungsi, N. and Rungsihirunrat, K., 2016, RAPD marker for determination of phylogenetic relationship of 15 *Curcuma* species from Thailand, BHST 14: 45-56.